

ARTÍCULO

# Actinomicetos aislados de *Argopecten purpuratus* productores de enzimas extracelulares y con actividad inhibitoria de patógenos marinos

Extracellular enzymes production and pathogen inhibitory activity of actinomycetes isolated from *Argopecten purpuratus*

Jorge León<sup>1</sup>, Juan José Aponte<sup>1</sup>, D' Lourdes Cuadra<sup>1</sup>, Nadia Galindo<sup>1</sup>,  
Liz Jaramillo<sup>1</sup>, Marisol Vallejo<sup>2</sup> y Emilio Marguet<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Ecología Microbiana, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Av. Venezuela s/n Ciudad Universitaria, Lima, Perú. jorgeleonq@yahoo.com

<sup>2</sup>Cátedra en Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Roca 115 (9100), Trelew, Argentina

**Abstract.** The present study was aimed at isolating *Argopecten purpuratus*-associated actinomycetes strains, and evaluating their capacity of production of extracellular enzymes (ECE), as well as inhibitory compounds against relevant pathogens in commercial aquaculture. Twenty seven strains were isolated from the gut of *A. purpuratus* adult specimens that were collected in the city of Pisco and Pucusana (Lima) – Peru; 81.5 and 59.2% of the isolates showed proteolytic and lipolytic activity, respectively. In addition, the strains ARG 9-II, ARG 10-II, ARG 12-II and ARG14-II evidenced broad-spectrum antimicrobial activity against the pathogens *Vibrio anguillarum*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus iniae*, *Carnobacterium piscicola*, and *Yersinia ruckeri*. The strain ARG 4-II produced the highest inhibitory effect against *S. iniae*. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the dichloromethane extract obtained from the strain ARG 12-II supernatant was 250 and 500 µg ml<sup>-1</sup> against *V. anguillarum* and *V. alginolyticus*, respectively. Based on 16S rRNA sequence analysis, strains ARG 9-II, ARG 12-II and ARG 14-II were identified as *Streptomyces variabilis*, *St. labedae* and *St. rochei*, respectively. Results indicate that *A. purpuratus* is a promissory source for the isolation of new strains of *Streptomyces* with high bioactivity and antagonistic capacity against relevant pathogens in aquaculture. These strains have high potential for being developed as probiotic agents in the future.

**Key words:** Biocontrol, probiotic, *Streptomyces*, aquaculture, Peru

**Resumen.** El presente trabajo tiene como objetivos evaluar actinomicetos aislados de *Argopecten purpuratus* y su capacidad de producir enzimas extracelulares (EEC), así como determinar su actividad antagonista frente a patógenos de importancia en acuicultura. Se aislaron 27 cepas de actinomicetos a partir de la masa visceral de especímenes adultos de *A. purpuratus* colectados en la localidad de Pisco y Pucusana (Lima) - Perú. El 81,5 y 59,2% de los aislados mostraron actividad proteolítica y lipolítica, respectivamente. Asimismo, las cepas señaladas como ARG 9-II, ARG 10-II, ARG 12-II y ARG 14-II mostraron mayor actividad antimicrobiana contra los patógenos *Vibrio anguillarum*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus iniae*, *Carnobacterium piscicola* y *Yersinia ruckeri*. La cepa ARG 4-II exhibió la mayor actividad inhibitoria. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto diclorometánico de la cepa ARG 12-II frente a *V. anguillarum* y *V. alginolyticus* fue calculada en 250 y 500 µg ml<sup>-1</sup> respectivamente. Las cepas ARG 9-II, ARG 12-II y ARG 14-II sobre la base del análisis de su ARNr 16S fueron identificadas como *Streptomyces variabilis*, *St. labedae* y *St. rochei*, respectivamente. Los resultados señalan a *A. purpuratus* como una fuente promisoría de aislamiento de nuevas cepas de *Streptomyces* con alta capacidad bioactiva y antagonista contra patógenos de importancia en acuicultura y con posibilidades de ser desarrolladas como potenciales agentes probióticos en el futuro.

**Palabras clave:** Biocontrol, probiótico, *Streptomyces*, acuicultura, Perú

## INTRODUCCIÓN

La acuicultura es uno de los sectores productivos con mayor crecimiento y rápida expansión en la industria internacional. Según cifras de la FAO (2014), la industria acuícola para el 2012 produjo alrededor de 90,43 millones de toneladas de productos hidrobiológicos, comprendiendo peces, crustáceos,

moluscos entre otros organismos, tanto de agua dulce como de mar. Este desarrollo ha sido muy evidente en los últimos 10 años y Perú ha experimentado un crecimiento importante y sostenido de su acuicultura, la cual alcanzó en el 2013 poco más de 105 mil toneladas, lo cual es superior en 45% con

relación al 2012. Del total de las cosechas el 72% de la producción corresponde al ámbito marino, destacando 'concha de abanico' *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) y 'camarón blanco del Pacífico' *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), cuyas producciones son destinadas principalmente a la exportación (PRODUCE 2014)<sup>1</sup>.

Uno de los principales problemas de la industria acuícola es la presencia de brotes de patógenos, los cuales suelen diseminarse en gran proporción del cultivo, generando pérdidas cuantiosas (Patil *et al.* 2001). Por la forma de cultivo, los animales acuáticos están constantemente expuestos a los patógenos ocasionales, los cuales en densidades suficientes pueden provocar la enfermedad (Moriarty 1998). Asimismo, el hacinamiento y las pobres condiciones de cultivo contribuyen a la destrucción del equilibrio 'hospedero - patógeno - ambiente', lo que desencadena la aparición de patologías (Das *et al.* 2008).

Los microorganismos marinos, en particular los actinomicetos, son de considerable interés en biotecnología debido a la capacidad de producir diversos metabolitos secundarios bioactivos con actividad antimicrobiana, antitumoral, inmunoestimulante, antiparasitaria, entre otros (Solanki *et al.* 2008). Se trata de un grupo de bacterias ambientales, Gram positivas muy prolíficas, cuyo aislamiento a partir de ecosistemas marinos es cada vez más frecuente (Lee *et al.* 2001, Anand *et al.* 2006, Gandhimathi *et al.* 2008, Mahyudin 2008).

El uso de bacterias marinas, en particular de actinomicetos como probióticos en acuicultura, ha sido tema de estudios de los últimos años. Investigaciones previas se llevaron a cabo en diferentes lugares del mundo; existe la experiencia de Riquelme *et al.* (2000), quienes determinaron la actividad inhibitoria de 3 cepas aisladas a partir de *A. purpuratus* contra vibrios marinos potencialmente patógenos de peces, moluscos y crustáceos, cuyos resultados fueron prometedores. Patil *et al.* (2001) lograron aislar *Streptomyces* a partir de sedimento marino con actividad inhibitoria de patógenos acuáticos como *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda* y *Aeromonas sobria*, sugiriendo que estos hallazgos podrían ser utilizados en la producción de antibióticos y en futuras aplicaciones como probióticos. Wan & Darah (2005), señalan el aislamiento de *Vibrio ruber* (S2A1), con actividad antibacteriana muy significativa frente a Gram positivas y Gram negativas, entre ellas algunos patógenos acuáticos. Asimismo, You *et al.* (2005)

reportan el aislamiento de *Streptomyces* y *Micromonospora* antagonistas a vibrios patógenos, resaltando además que podrían ser fuentes promisorias de agentes de biocontrol en la acuicultura. El desarrollo de microorganismos probióticos capaces de controlar patógenos en ambientes acuáticos constituye una alternativa biotecnológica para disminuir la mortalidad en cultivos de mariscos de importancia comercial (Irianto & Austin 2002). En este sentido, los actinomicetos marinos se han considerado como posibles biocontroladores, gracias a su alta capacidad de producir metabolitos antimicrobianos y a la vez exoenzimas, que en el medio acuático contribuirían a reducir la presencia de patógenos y la carga orgánica respectivamente (Das *et al.* 2008), siendo destacada esta actividad en los últimos años por otros autores (You *et al.* 2005, 2007; Kumar *et al.* 2006, Das *et al.* 2006a,b, 2008).

Es aún incierto el uso de actinomicetos marinos asociados a invertebrados en prácticas acuícolas, pero dado los resultados experimentales que se tiene a la fecha, este grupo de bacterias prometen ser útiles en diferentes aspectos de la acuicultura, tales como la sanidad acuícola, la biorremediación de ambientes acuáticos, agentes probióticos y en especial en el control de patógenos en la industria de la larvicultura de *A. purpuratus* en el marco de una acuicultura ambientalmente amigable y desarrollo sustentable.

Siendo el cultivo de *A. purpuratus* de gran importancia para el desarrollo de la maricultura peruana, el presente estudio tuvo como objetivo principal contribuir en la selección de actinomicetos nativos aislados del bivalvo *A. purpuratus*, que mostraran capacidad de producir enzimas extracelulares (EEC) y compuestos antagonistas frente a patógenos potenciales de organismos acuáticos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### COLECCIÓN DE MUESTRAS

Especímenes adultos de *Argopecten purpuratus*, capturados en la zona de Pisco (Ica) y Pucusana (Lima) fueron adquiridos en el muelle de pescadores artesanales de Ventanilla (Callao). Los especímenes fueron congelados y luego trasladados al laboratorio para su procesamiento microbiológico inmediato. El tiempo transcurrido entre la colecta de especímenes marinos y el procesamiento de muestras no fue mayor de 24 h.

<sup>1</sup>PRODUCE. 2014. La acuicultura, crecimiento sostenido, futuro de la alimentación mundial e importancia para el Perú. Red Nacional de Información Acuicola. Ministerio de la Producción-Perú. <[http://rnia.produce.gob.pe/index.php?option=com\\_content&id=245:perucrecimientoacuicola2013&catid=22:actividades&Itemid=76](http://rnia.produce.gob.pe/index.php?option=com_content&id=245:perucrecimientoacuicola2013&catid=22:actividades&Itemid=76)>

### AISLAMIENTO DE ACTINOMICETOS

Se procedió a extraer asépticamente la masa visceral de 24 especímenes, los cuales se homogenizaron en agua de mar estéril (membrana de filtración de 0,22 µm de porosidad), luego se realizaron diluciones seriadas al décimo hasta 10<sup>-3</sup>. Las dos últimas diluciones se sometieron a shock térmico a 60°C por 25 min y luego se sembró 0,1 ml de inóculo por diseminación en placas de Agar Marino (modificado) y Agar Almidón Caseína, ambos con adición de cicloheximida (50 µg ml<sup>-1</sup>) más ácido nalidíxico (40 µg ml<sup>-1</sup>) siguiendo la metodología aplicada por Takizawa *et al.* (1993). Cada siembra se realizó por duplicado y se mantuvo en incubación a 28°C hasta por 21 días.

### CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS ACTINOMICETOS

Los actinomicetos aislados fueron caracterizados por su comportamiento cultural en los medios de aislamiento luego de una incubación a 28°C por 10 a 15 días. Se determinó las características de colonia por su tamaño, forma, color, textura, elevación, pigmentación del micelio aéreo y del substrato según Reddy *et al.* (2011). Las observaciones microscópicas se realizaron principalmente para determinar la tinción Gram, la forma y tamaño celular y sobre todo para observar la ornamentación y disposición de las esporas como estructuras de reproducción, utilizando la técnica de los microcultivos (Williams & Cross 1971).

### ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EXTRACELULAR

La capacidad de producir enzimas extracelulares se realizó según la metodología descrita por León *et al.* (2000). Brevemente, las cepas aisladas fueron sembradas en un medio de cultivo base preparado con agua de mar y luego suplementado independientemente con sustratos como leche descremada, yema de huevo, tween 80, almidón y gelatina nutritiva, a fin de evaluar la actividad de caseinasa, lecitinasa, lipasa, amilasa y gelatinasa, respectivamente. Las cepas fueron incubadas a una temperatura de 28°C por 7 días. Para determinar la actividad de caseinasa y lecitinasa se procedió a medir el tamaño de los halos que se observaron como zonas transparentes o de opacidad (según sea el caso) alrededor de cada colonia. Para determinar la actividad amilolítica y proteolítica (gelatinasa) se agregó al medio de cultivo la solución de Lugol y la solución de cloruro mercúrico, respectivamente.

### CEPAS DE PATÓGENOS EN PRUEBA

Las cepas testigo corresponden a patógenos potenciales de importancia en patología acuícola. Los patógenos Gram negativos fueron *Vibrio anguillarum* (cepas 01 y 02), *V. vulnificus* (BT3), *V. alginolitycus* (038525) y *Yersinia ruckeri*

ATCC 29473, *Y. ruckeri* (cepas 6, 7 y 8) y los Gram positivos *Streptococcus iniae* 2378, *Lactococcus garvieae* 03/8460 (cepa española), *L. garvieae* 03/8702 (cepa italiana) y *Carnobacterium piscicola* 4020 (donación hecha por el Dr. José Francisco Fernández-Garayzabal de la Universidad Complutense de Madrid, España)

### PRUEBAS DE ANTAGONISMO DE ACTINOMICETOS FRENTE A PATÓGENOS

Se determinaron por dos métodos: método I o de 'doble capa' según León *et al.* (2010); y el método II o de 'pocillos' según Parente *et al.* (1994). Para el primer caso, los actinomicetos aislados fueron cultivados en Agar Marino e incubados a una temperatura de 30°C durante 7 días. A continuación, se agregó una segunda capa de medio conteniendo Agar BHI más un cultivo testigo en fase exponencial. Se incubaron a 30°C por 24 h. Pasado el tiempo, se realizaron las lecturas correspondientes observando los halos de actividad antagonista. El método II se aplicó solamente para los actinomicetos que fueron seleccionados por ser los mejores antagonistas a las cepas testigo. Los cultivos fueron puestos a fermentar en Caldo Marino suplementado con almidón (1%) (p/v) y glucosa (0,5%) (p/v) en agitación constante a 180 rpm por 7 días a 28°C. Al cabo de este tiempo fue centrifugado a 4000 rpm por 20 min; luego, 100 µL del sobrenadante de cada cultivo fue colocado sobre pocillos preparados con antelación en placas de agar BHI sembrados previamente con la cepa testigo. Las placas se incubaron a 30°C por 18-24 h. La presencia de halos de inhibición alrededor de los pocillos fue considerada como resultado positivo de antibiosis. En ambos métodos las pruebas se realizaron por duplicado.

### EXTRACCIÓN DEL COMPUESTO ACTIVO Y SU ACTIVIDAD INHIBITORIA

La extracción se realizó a partir de actinomicetos que fueron previamente seleccionados por presentar los mejores halos de actividad antagonista frente a las cepas testigo. Los cultivos se realizaron en las mismas condiciones que en el paso anterior. Para la obtención de extractos se utilizó di-clorometano (vv<sup>-1</sup>) como solvente orgánico según procedimientos descritos por Zheng *et al.* (2004). La fase orgánica fue separada y luego evaporada hasta sequedad en un rotaevaporador. El residuo se pesó y re-suspendido en Dimetilsulfóxido (DMSO) al 5% para ser usado posteriormente en la determinación de la actividad antibacteriana frente a especies patógenas de *Vibrio*.

### CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

Para esta prueba se utilizó como cepa testigo cultivos de *V. anguillarum*, *V. vulnificus* y *V. alginolitycus* mantenidos en

Caldo Tripticasa Soya (TSB, Britania) a 30°C de incubación. Se realizó siguiendo la metodología de pocillos en placas de micro-dilución según NCCLS (2008). Se eligió el extracto diclorometánico del actinomiceto (ARG 12-II) que mostró mayor actividad antagonista a las cepas patrones. El extracto fue re-suspendido en DMSO al 5% para preparar diluciones de 1:2. Muestras (10 µL) de cada dilución fue colocada en pocillos de la microplaca, a los que se adicionó 80 µL de TSB; luego de ser mezclados se agregó 10 µL de la suspensión de las cepas testigo (0,5 de escala Mc Farland). El material se colocó en incubación a 30°C por 24 h. Transcurrido el tiempo se vertió 20 µL de una solución de Cloruro de Trifenil Tetrazolio (TTC) en cada pocillo, incubando a 30°C por 30 min adicionales. El viraje del medio a rojo indicó crecimiento microbiano. Se usó DMSO al 5% como control negativo y Oxitetraciclina como control positivo.

#### IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA

Tres cepas seleccionadas por su mayor antagonismo frente a las cepas testigo fueron sembrados en TSB, luego incubados en agitación a 30°C durante 48 h. Los cultivos se centrifugaron a 12000 g a 4°C durante 5 min y el ADN genómico se extrajo utilizando el kit comercial de purificación Wizard Genomics (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Mediante la reacción de PCR se amplificó el gen que codifica 16S ARNr con un termociclador Multigene Gradient (Labnet International Inc., Woodbridge, NJ, EE.UU.), usando los cebadores universales para procarionotas 27f (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') y 1492r (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACTT-3', según lo describe

DeLong (1992). Ambas hebras de los productos de PCR se secuenciaron utilizando los servicios comerciales de Macrogen Inc. (Seúl, Corea). Las secuencias obtenidas se compararon con las depositadas en la base de datos del NCBI utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.* 1990). El árbol filogenético fue construido con el programa Mega versión 6 (Tamura *et al.* 2013) de acuerdo al método estadístico Neighbor-Joining (Saitou & Nei 1987), utilizando el modelo de sustitución de Tamura-Nei y con un valor de bootstrap de 1000 réplicas. Las secuencias para la construcción del árbol filogenético pertenecen a cepas de colección y fueron obtenidas de la base de datos del Ribosomal Database Project y Nacional Center for Biotechnology. Las secuencias de los géneros *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Nocardia* y *Mycobacterium* fueron elegidas por su relación filogenética cercana con el género *Streptomyces* mientras que la secuencia de la cepa *Bacillus subtilis* fue elegida arbitrariamente como especie por fuera del grupo en estudio.

Las secuencias del gen 16S ARNr de los actinomicetos seleccionados y signados como cepas ARG 14 II (1309 pb), ARG 12 II (1328 pb) y ARG 9 II (1061 pb) fueron depositadas en la base de datos del GenBank bajo los números de acceso KM386827, KM386828 y KM386829 respectivamente.

#### RESULTADOS

##### AISLAMIENTO DE ACTINOMICETOS Y CARACTERÍSTICAS DE COLONIAS

Se logró aislar y caracterizar un total 27 cepas de actinomicetos, cuyas principales características se describen en la Tabla 1.

**Tabla 1. Características generales de actinomicetos marinos aislados de *Argopecten purpuratus* / General characteristics of marine actinomycetes isolated from *Argopecten purpuratus***

Actinomicetos	Colonia				Actinomicetos	Colonia			
	Color	Forma	Tamaño	Pigmento difusible (color)		Color	Forma	Tamaño	Pigmento difusible (color)
ARG 1	Blanco	Liquenoide	G	Marrón tenue	ARG 10-II	Marrón tenue	Aplanoide	P	Amarillo claro
ARG 2	Blanco-gris	Compacta	P	-	ARG 11-II	Blanco	Rizoide	I	-
ARG 3	Blanco	Rizoide	P	Amarillo claro	ARG 12-II	Blanco-gris	Rizoide	P	-
ARG 4	Blanco-gris	Liquenoide	I	-	ARG 13-II	Blanco-gris	crateriforme	I	-
ARG 5	Gris	Compacta	I	Marrón tenue	ARG 14-II	Gris	Aplanoide	P	rojizo
ARG 1-II	Gris	Rizoide	P	-	ARG 15-II	Gris	Aplanoide	I	-
ARG 2-II	Blanco	Compacta	I	-	ARG 16-II	Blanco	Compacta	I	Amarillo tenue
ARG 3-II	Blanco	Compacta	G	-	ARG 18-II	Blanco	Compacta	G	-
ARG 4-II	Blanco-gris	Liquenoide	P	Marrón tenue	ARG 2-III	Blanco-gris	Rizoide	P	-
ARG 5-II	Blanco-gris	Liquenoide	P	Marrón tenue	ARG 4-III	Blanco	Rizoide	I	-
ARG 6-II	Blanco	Aplanoide	G	-	ARG 5-III	Blanco	Rizoide	P	-
ARG 7-II	Blanco	Rizoide	I	-	ARG 6-III	Gris	Compacta	I	-
ARG 8-II	Blanco	Compacta	P	-	ARG 3-III	Blanco-gris	Compacta	P	Marrón tenue
ARG 9-II	Blanco	Compacta	P	-					

Tamaño (diámetro en mm): P= pequeñas (< 2 mm); I= intermedias (2 a 3 mm); G= grandes (> 3 mm)

El morfotipo predominante fue de colonias blanco-grisáceas. En general, el tamaño de las colonias fue relativamente pequeño (promedio de 2 mm de diámetro después de 21 días de incubación a 28°C); sin embargo, en subcultivos posteriores se lograron alcanzar dimensiones mayores (3 a 5 mm de diámetro). La mayoría de los cultivos (66,6%) no presentaron pigmentación difusible en el medio, aunque el marrón tenue y amarillo claro del micelio vegetativo fue muy evidente en algunos cultivos. Todas las cepas crecieron después de 7 días de incubación.

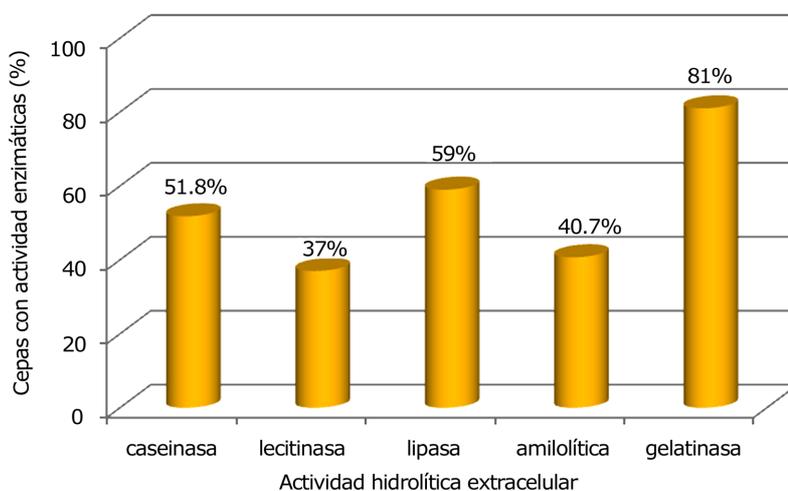
#### ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE LOS ACTINOMICETOS

La producción de enzimas extracelulares (EEC) fue otra

característica evaluada en los actinomicetos aislados. La totalidad de los aislados resultaron ser productoras de algún tipo de EEC (Tabla 2); sin embargo, un alto porcentaje muestran tener prioritariamente actividad proteolítica sobre la gelatina (81%) y caseína (51,8%); así como actividad lipolítica sobre tween 80 (59%) y lecitina (37%) del yema de huevo. Asimismo, el 40,7% de los aislados mostraron capacidad hidrolítica sobre el almidón (Fig. 1). En la Tabla 2 se resalta las cepas de actinomicetos con mayor potencial multi-enzimático (ARG 4-II, ARG 5-II, ARG 13-II, ARG 6-III y ARG 3-III), entre ellas destacan ARG 5-II y ARG 6-III las que lograron alcanzar los halos de actividad de mayor tamaño sobre la caseína.

**Tabla 2. Actinomicetos aislados de *A. purpuratus* y su capacidad de producción de enzimas extracelulares / Actinomycetes isolated from *A. purpuratus* and production capacity of extracellular enzymes**

Actinomicetos	Actividad enzimática extracelular (diámetro de halos de actividad en mm)					Actinomicetos	Actividad enzimática extracelular (diámetro de halos de actividad en mm)				
	Caseínasa	Lecitinasa	Lipasa	Amilasa	Gelatinasa		Caseínasa	Lecitinasa	Lipasa	Amilasa	Gelatinasa
ARG 1	-	-	28	-	22	ARG 10-II	-	-	21	-	28
ARG 2	-	-	17	17	18	ARG 11-II	-	17	21	-	24
ARG 3	-	-	21	19	16	ARG 12-II	-	-	20	-	34
ARG 4	-	-	25	-	-	ARG 13-II	37	28	24	22	-
ARG 5	-	-	25	19	13	ARG 14-II	20	-	-	-	26
ARG 1-II	19	19	-	-	20	ARG 15-II	27	-	-	23	20
ARG 2-II	25	-	-	12	22	ARG 16-II	34	11	15	-	-
ARG 3-II	-	28	14	-	21	ARG 18-II	13	-	-	-	25
ARG 4-II	16	10	31	-	18	ARG 2-III	17	-	10	-	30
ARG 5-II	43	21	20	31	12	ARG 4-III	-	-	-	13	18
ARG 6-II	29	-	-	-	-	ARG 5-III	-	12	-	-	-
ARG 7-II	15	-	-	-	32	ARG 6-III	40	21	25	31	19
ARG 8-II	-	-	-	-	26	ARG 3-III	-	18	19	10	21
ARG 9-II	22	-	-	15	33						



**Figura 1. Frecuencia de actinomicetos aislados de *A. purpuratus* con actividad hidrolítica extracelular / Frequency of actinomycetes isolated from *A. purpuratus* with extracellular hydrolytic activity**

**Tabla 3. Actinomicetos aislados de *A. purpuratus* y su actividad inhibitoria de potenciales patógenos marinos Gram positivos (método de doble capa) / Actinomycetes isolated from *A. purpuratus* and their inhibitory activity against potential marine Gram-positive pathogens (double layer method)**

Actinomicetos	<i>Streptococcus iniae</i>	<i>Lactococcus garvieae</i> (cepa española)	<i>Lactococcus garvieae</i> (cepa italiana)	<i>Carnobacterium piscicola</i>	Actinomicetos	<i>Streptococcus iniae</i>	<i>Lactococcus garvieae</i> (cepa española)	<i>Lactococcus garvieae</i> (cepa italiana)	<i>Carnobacterium piscicola</i>
ARG2	-	34	46	-	ARG 7-II	8	3	28	-
ARG3	-	38	42	-	ARG 9-II	-	31	42	10
ARG4	-	17	-	-	ARG 10-II	17	9	10	12
ARG5	38	21	-	-	ARG 12-II	29	8	41	12
ARG 4-II	40	-	-	-	ARG 13-II	-	-	24	-
ARG 5-II	-	9	-	-	ARG 14-II	46	18	-	-

Los resultados se expresan como halos de inhibición (mm de diámetro)

**Tabla 4. Actinomicetos aislados de *A. purpuratus* y su actividad inhibitoria de patógenos marinos Gram negativos (método de doble capa) / Actinomycetes isolated from *A. purpuratus* and their inhibitory activity against Gram negative marine pathogens (double-layer method)**

Actinomicetos	<i>Vibrio anguillarum</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Yersinia ruckeri</i> *	Actinomicetos	<i>Vibrio anguillarum</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Yersinia ruckeri</i> *
ARG1	-	25	-	-	ARG 7-II	-	21	-	4
ARG2	-	-	-	36	ARG 9-II	20	9	25	30
ARG3	-	7	-	37	ARG 10-II	-	25	-	37
ARG5	-	9	-	25	ARG 12-II	20	26	26	16
ARG 4-II	-	27	-	-	ARG 14-II	-	38	-	21

Los resultados se presentan en mm de halos de inhibición; \**Yersinia ruckeri*, es considerado un patógeno de agua dulce

#### ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS ACTINOMICETOS

De la totalidad de actinomicetos aislados (27), 13 cepas (48%) presentaron actividad antagonista contra al menos una cepa de bacterias patógenas en prueba. Doce aislados (44,4%) mostraron actividad inhibitoria de patógenos Gram positivos (Tabla 3) con halos de actividad de gran tamaño como es el caso de las cepas ARG2 y ARG 14-II que alcanzan los 46 mm de diámetro frente a *Lactococcus garvieae* (cepa española) y *Streptococcus iniae*, respectivamente. Se resalta la actividad antagonista de ARG 10-II y ARG 12-II por ser inhibitorios de las 4 cepas de patógenos testigo. El comportamiento antagonista frente a Gram negativos de los actinomicetos aislados se muestra en la Tabla 4. Diez cepas (37%) fueron evaluadas por su carácter inhibitorio frente a especies de *Vibrio* comúnmente patógenos a organismos marinos, en particular en cultivos de larvas de *A. purpuratus*. Entre ellas se destacan las cepas ARG 9-II y ARG 12-II (Fig. 2) por ser inhibitorias de las 4 cepas testigo, así como ARG 14-II la que mostró una marcada actividad inhibitoria contra *Vibrio vulnificus*, con un halo de inhibición de 38 mm de diámetro. En general, ARG 12-II se considera como la de mayor actividad frente a los patógenos en prueba, dado que logró inhibir a la totalidad de 8 cepas

indicadoras (Gram positivas y Gram negativas) (Tabla 3 y 4). Los patógenos más sensibles fueron *Lactococcus garvieae* (cepa española), *Vibrio vulnificus* y *Yersinia ruckeri* ATCC 29473. No obstante, *Lactococcus garvieae* (cepa italiana) mostró mayor sensibilidad frente a ARG2 y ARG3 (halos de inhibición de 46 y 42 mm, respectivamente).

#### EXTRACCIÓN DEL COMPUESTO ACTIVO Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA

La Tabla 5 muestra la actividad antibacteriana *in vitro* de extractos diclorometánicos de tres actinomicetos (ARG 9-II, ARG 12-II y ARG 14-II) que fueron previamente seleccionados en base a su mayor actividad antibacteriana. Como se observa en la Fig. 3, se ratifica el amplio espectro inhibitorio de estos actinomicetos frente a los principales patógenos Gram positivos, así como los Gram negativos en especial frente a *V. vulnificus* y *V. alginolyticus*, siendo ARG 12-II y ARG 14-II las cepas con mayor espectro de actividad tal como se muestra en la Fig. 4. La Tabla 6 muestra la CMI del actinomiceto cepa ARG 12-II frente a especies representativas del género *Vibrio*, destacando la actividad sobre *V. anguillarum* 01 (CMI de 250 µg ml<sup>-1</sup>).

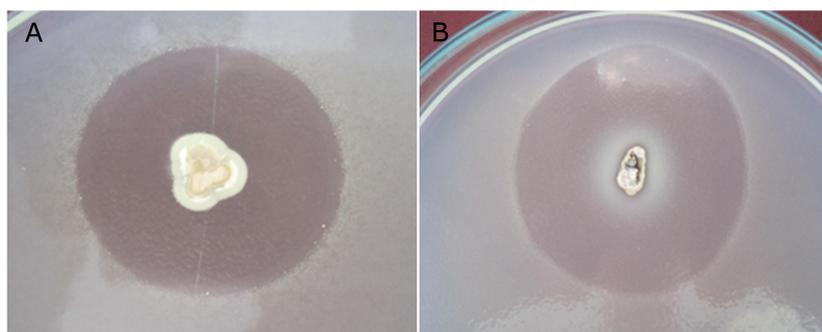


Figura 2. Actividad antagonista de actinomicetos ARG 12-II (A) y ARG 9-II (B) formando halos de inhibición frente a *Vibrio anguillarum* 02 / Antagonistic activity of actinomycetes ARG 12-II (A) and ARG 9-II (B) forming zones of inhibition against *Vibrio anguillarum* 02

Tabla 5. Actividad inhibitoria de extractos diclorometánicos de tres cepas de actinomicetos aisladas de *A. purpuratus* frente a ictiopatógenos (Método de difusión en pocillo) / Inhibitory activity of dichloromethane extracts of three actinomycete strains isolated from *A. purpuratus* against fish pathogenic strains (well diffusion method)

Ictiopatógenos en prueba	Halo de inhibición (mm de diámetro)		
	ARG 9 II	ARG 12 II	ARG 14 II
<i>Streptococcus iniae</i>	-	12	18
<i>Lactococcus garvieae</i> (España)	18	6	14
<i>Lactococcus garvieae</i> (Italia)	18	14	18
<i>Carnobacterium piscicola</i>	10	6	-
<i>Yersinia ruckeri</i> ATCC 29473	10	12	8
<i>Yersinia ruckeri</i> 6	12	12	10
<i>Yersinia ruckeri</i> 7	13	12	8
<i>Yersinia ruckeri</i> 8	15	13	11
<i>Vibrio anguillarum</i> 01	12	15	14
<i>Vibrio anguillarum</i> 02	13	14	-
<i>Vibrio alginolyticus</i>	16	11	14
<i>Vibrio vulnificus</i>	16	22	16

#### IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO

La identificación a nivel de especies de las cepas ARG 14 II, ARG 12 II y ARG 9 II se logró sobre la base de la comparación de las respectivas secuencias del gen 16S ARNr con las pertenecientes a cepas de colección existentes en la base de datos de Ribosomal Database Project<sup>2</sup>.

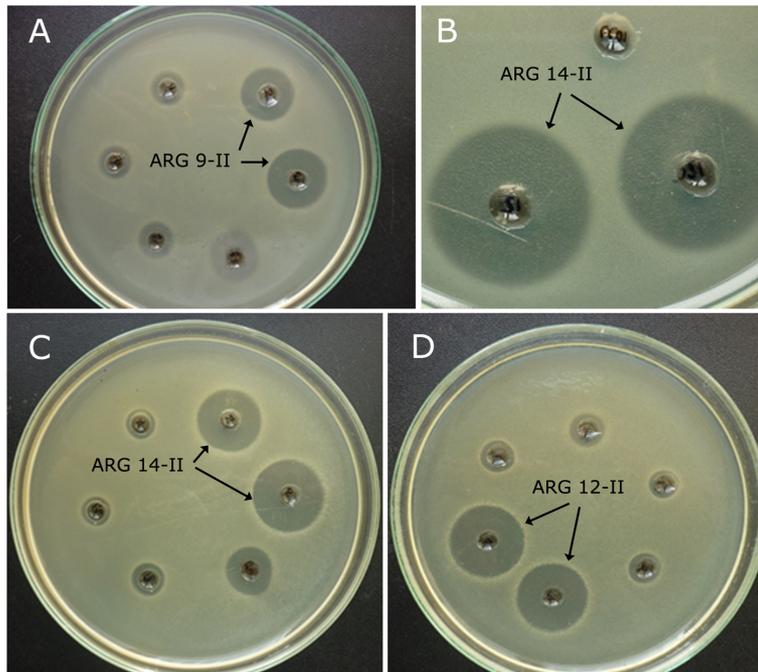
<sup>2</sup>Cole JR, Q Wang, JA Fish, B Chai, DM McGarrell, Y Sun, CT Brown, A Porras-Alfaro, CR Kuske & JM Tiedje. 2014. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. Nucleic Acids Research 42(Database issue): D633-D642; <doi: 10.1093/nar/gkt1244> [PMID: 24288368] <http://rdp.cme.msu.edu>

La Fig. 5 muestra el árbol filogenético construido según lo descrito en la parte de materiales y métodos. En ella se aprecia que la cepa ARG 14 II muestra una homología de 99,92% con respecto a la secuencia del gen 16S ARNr de la cepa *S. rochei* NBRC 12908. En el caso del actinomiceto cepa ARG 12 II la homología fue de 99,92% con respecto a la cepa de colección *S. labedae* IFO 15864, mientras que en la cepa ARG 9 II se halló una homología del 100% cuando su secuencia fue comparada con la de la cepa *S. variabilis* JN180216.

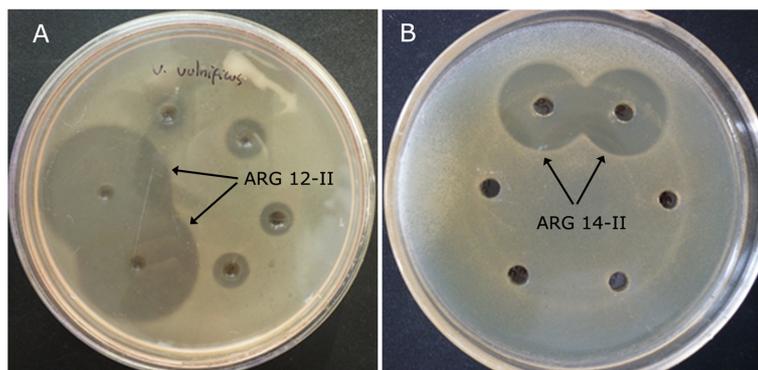
#### DISCUSIÓN

Los actinomicetos son organismos ubicuos en la naturaleza, saprofitos por excelencia, que utilizan diversas fuentes de carbono y energía para su desarrollo (Williams *et al.* 1984). Investigaciones previas señalan que los actinomicetos, en especial *Streptomyces* marinos productores de EEC, son capaces de hidrolizar diferentes polímeros tales como almidón, gelatina, celulosa, caseína o degradar urea. La presencia de actinomicetos productores de EEC en macroorganismos estaría relacionado con el aspecto nutricional de su hospedero, ya que complementarían el metabolismo de aquellos nutrientes poliméricos no aprovechados por su propia digestión (Das *et al.* 2008).

Estudios similares al presente señalan la presencia de cepas de actinomicetos fuertemente inhibitorios para otros patógenos de peces como *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria* y *Edwardsiella tarda* (Patil *et al.* 2001). Un parámetro de comparación son los halos de inhibición, siendo en el caso del presente trabajo de gran consideración, ocurre con la cepa ARG 14-II frente a *Streptococcus iniae* (46 mm de zona de inhibición). Otros reportes señalan a *Streptomyces* y *Micromonospora* como posibles controladores de bacterias patógenas de peces, algunas de ellas resistentes a antibióticos



**Figura 3. Actividad antibacteriana de extractos diclorometánicos de algunos actinomicetos aislados de *A. purpuratus* y su efecto inhibitorio (por duplicado) de patógenos de importancia en acuicultura. Cepas: *C. piscicola* (A); *St. inaeae* (B); *L. garvieae* (cepa española) (C) y *L. garvieae* (cepa italiana) (D) / Antibacterial activity of dichloromethane extracts of some actinomycetes isolated from *A. purpuratus* and its inhibitory effect (in duplicate) against pathogens of importance in aquaculture. Strains: *C. piscicola* (A); *St. inaeae* (B); *L. garvieae* (Spanish strain) (C) and *L. garvieae* (Italian strain) (D)**



**Figura 4. Efecto inhibitorio (por duplicado) de extractos diclorometánicos de actinomicetos contra los patógenos *V. vulnificus* (A) y *V. alginolyticus* (B) / Inhibitory effect (in duplicate) of dichloromethane extracts of actinomycetes against the pathogens *V. vulnificus* (A) and *V. alginolyticus* (B)**

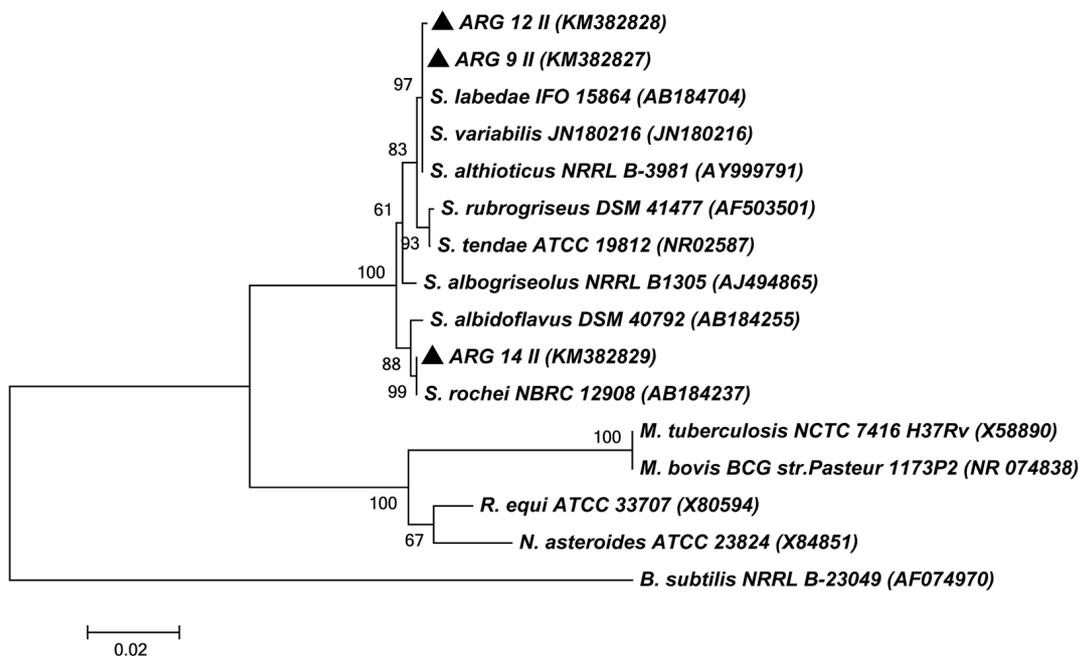


Figura 5. Árbol filogenético construido según el método estadístico Neighbor-Joining basado en la relación entre las secuencias del gen ARNr 16S de cepas aisladas desde *A. purpuratus* (▲) y especies relacionadas de *Streptomyces*. Los números internos de los nodos corresponden a los valores de soporte de bootstrap ( $\geq 60\%$ ). Entre paréntesis se muestran los números de acceso al GenBank. La secuencia de gen ARNr 16S de la cepa de *Bacillus subtilis* fue elegida arbitrariamente como secuencia externa al grupo. (barra, 0,02 sustituciones por posición de nucleótido) / Phylogenetic tree constructed by Neighbor-Joining method based on the relationship between the 16S rRNA gene sequences of strains isolated from *A. purpuratus* (▲) and related species of *Streptomyces*. The numbers at internal nodes are bootstrap support values ( $\geq 60\%$ ). GenBank accession numbers are given in parentheses. The 16S rRNA sequence of *Bacillus subtilis* was chosen arbitrarily as the outgroup sequence. (bar, 0.02 substitution per nucleotide position)

como *V. harveyi*, *V. fischeri*, *A. hydrophila* y *A. sobria*; sin embargo, el tamaño de la zona de actividad respecto al presente es menor (28 mm para *Micromonospora* sp. frente a *V. harveyi*) (Saravanakumar *et al.* 2010). Por otro lado, Thirumurugan & Vijayakumar (2013) reportan que de un total de 82 actinobacterias aisladas de suelo marino, solo 26% presentaron actividad antibacteriana frente a *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *Aeromonas* sp. y *Pseudomonas* sp. con zonas de inhibición máximo de 17 mm frente a *V. alginolyticus*. No se ha reportado literatura referente a la actividad antagonista de actinomicetos marinos frente a bacterias como *Streptococcus iniae*, *Lactococcus garvieae* y *Carnobacterium piscicola*; este grupo de bacterias lácticas forman parte de la microbiota normal de organismos continentales, siendo algunos de ellos patógenos potenciales de peces de agua dulce (Denev *et al.* 2009).

Los invertebrados marinos han sido considerados como fuentes potenciales de actinomicetos bioactivos; en este sentido Selvakumar *et al.* (2010), aislaron cepas de *Streptomyces* a partir de esponjas marinas, cuyos extractos crudos obtenidos

con acetato de etilo mostraron amplia actividad antibacteriana frente a patógenos como *A. hydrophila*, *Serratia* sp., *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus*, logrando alcanzar zonas de inhibición mayores a 30 mm (método del disco difusión). En este trabajo, si bien se utilizó el método del pocillo se logró alcanzar hasta un máximo de 22 mm de diámetro (ARG 12-II frente a *V. vulnificus*).

Tabla 6. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto diclorometánico de la cepa de actinomiceto ARG 12-II frente a *Vibrios* marinos / Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of dichloromethane extracts of actinomycete strain ARG 12-II against marine *Vibrios*

Cepas de <i>Vibrio</i>	CMI de extractos diclorometánicos ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	CMI de Oxitetraciclina* ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )
<i>Vibrio anguillarum</i> 01	250	0,9
<i>Vibrio anguillarum</i> 02	>500	0,9
<i>Vibrio vulnificus</i>	>500	1,9
<i>Vibrio alginolyticus</i>	500	1,9

\*Control positivo

Trabajos previos similares al presente señalan que los actinomicetos marinos como *Streptomyces* sp. LCJ94 tienen actividad antagonista contra *V. harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. vulnificus* (patógenos de mariscos) cuya CMI de sus extractos crudos de acetato de etilo presentan valores de 250, 500 y 250  $\mu\text{gml}^{-1}$  respectivamente (Mohanraj & Sekar 2013). En este sentido, dichos resultados son muy similares al presente estudio (Tabla 6).

Respecto al estudio filogenético de los actinomicetos marinos seleccionados y evaluados en el presente trabajo, estas 3 especies identificadas como *Streptomyces rochei*, *St. labelae* y *St. variabilis* se han descrito en medios terrestres; sin embargo, la bibliografía verifica su aislamiento de ambientes marinos, poniendo de manifiesto la capacidad de estos microorganismos de tolerar y desarrollarse en diferentes ambientes (Thomas *et al.* 2010, Reddy *et al.* 2011, Meena *et al.* 2013). En los trabajos citados se describen además sus propiedades fisiológicas de interés biotecnológico en especial su capacidad de sintetizar metabolitos activos contra potenciales patógenos humanos y/o animales.

En la última década del presente siglo se resalta posibles usos de actinomicetos marinos en otros aspectos de la acuicultura, tales como la producción de antibióticos para ser incorporados en alimentos de camarones para controlar al virus causante de la 'mancha blanca' (Kumar *et al.* 2006) o en el control de biofilms provocados por especies de *Vibrio* causantes de vibriosis (You *et al.* 2007).

En trabajos previos realizados por Riquelme *et al.* (1995) sobre bacterias asociadas a estadios tempranos de *A. purpuratus* se indica la presencia predominante de bacterias Gram negativas como *Pseudomonas*, *Moraxella* y *Vibrio*, las cuales serían responsables de la disminución larvaria de estos bivalvos en los hatcheries. Por otro lado, Jorquera *et al.* (2001) resaltan la importancia de la microbiota bacteriana asociada a *A. purpuratus* no solo por su efecto negativo como patógenos, también por ser benéficos y productores de compuestos bioactivos que promueven un mejor desarrollo especialmente durante su fase larvaria.

Asimismo, trabajos realizados por León *et al.* (2011) muestran que el sedimento marino es fuente muy importante para el aislamiento de actinomicetos bioactivos; sin embargo, los invertebrados también serían muestras ideales para su aislamiento. El presente es el primer reporte de actinomicetos marinos aislado de *A. purpuratus*. Este hallazgo confirma que los actinomicetos no solo son microorganismos que predominan exclusivamente en suelos y sedimentos. Diversos estudios muestran la asociación de este grupo microbiano con invertebrados marinos (Mahyudin 2008). Asimismo, en el presente estudio se ha podido apreciar que la capacidad

inhibitoria de actinomicetos marinos frente a los patógenos es elevada. La presencia de actinomicetos en el contenido visceral de *A. purpuratus* sugiere que estas bacterias en su afán de colonizar el epitelio intestinal, producen diferentes metabolitos activos frente a la predominante microbiota Gram negativa incluida especies patógenas de *Vibrio*. Reportes sobre el control de *Vibrio* en acuicultura de camarones han señalado que estos patógenos disminuyen cuando incrementa la población de *Streptomyces* (Das *et al.* 2006b, You *et al.* 2005), Las pruebas *in vitro* no solo ratifica el marcado antagonismo a los patógenos, muestra a la vez la alta capacidad hidrolítica de polímeros sugiriendo como potenciales candidatos a probióticos y a la vez biorremediantes del ecosistema acuático sobre todo en sistemas controlados.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC-Perú) y Ministerio de Ciencia y Tecnología (MINCYT- Argentina), quienes a través de Programa de Investigación en el Marco del Acuerdo de Cooperación Científica-Tecnológica han financiado parcialmente estudios conjuntos e intercambios bilaterales entre Perú-Argentina el año 2011.

## LITERATURA CITADA

- Altschul SF, W Gish, M Miller, EW Myers & DJ Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Anand PT, AW Bhat, YS Shouche, U Roy, J Siddharth & SP Sarma. 2006. Antimicrobial activity of marine bacteria associated with sponges from the waters off the coast of South East India. *Microbiological Research* 161: 252-262.
- Das S, PS Lyla & S Ajmal-Khan. 2006a. Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives. *Current Science* 25: 1325-1335.
- Das S, PS Lyla & S Ajmal-Khan. 2006b. Application of *Streptomyces* as a probiotic in the laboratory culture of *Penaeus monodon* (Fabricius). *Israel Journal of Aquaculture* 58: 198-204.
- Das S, L Ward & C Burke. 2008. Prospects of using marine actinobacteria as probiotics in aquaculture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81: 419-429.
- DeLong EF. 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 5685-5689.
- Denev S, Y Staykov, R Moutafchieva & G Beev. 2009. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture. *International Aquatic Research* 1: 1-29.

- FAO. 2014.** Global aquaculture production volume and value statistics database updated to 2012. Fisheries and Aquaculture Department, FAO, Rome. <ftp://ftp.fao.org/fi/stat/Overviews/AquacultureStatistics2012.pdf>
- Gandhimathi R, M Arunkumar, J Selvin, T Thanqavelu, S Sivaramakrishnan, GS Kiran S Shanmughapriya & K Natarajaseenivasan. 2008.** Antimicrobial potential of sponge associated marine actinomycetes. *Journal of Medical Mycology* 18: 16-22.
- Irianto A & B Austin. 2002.** Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases* 25: 633-642.
- Jorquera MA, FR Silva & CE Riquelme. 2001.** Bacteria in the culture of the scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture International* 9(4): 285-303.
- Kumar SS, R Philip & CT Achuthankutty. 2006.** Antiviral property of marine actinomycetes against white spot syndrome virus in penaeid shrimps. *Current Sciences* 91: 807-811.
- Lee YK, JH Lee & HK Lee. 2001.** Microbial symbiosis in marine sponges. *The Journal of Microbiology* 39: 254-264.
- León J, F Pellón, V Unda, J David, C Anaya & V Mendoza. 2000.** Producción de enzimas extracelulares por bacterias aisladas de invertebrados marinos. *Revista Peruana de Biología* 7(2): 202-210.
- León J, L Liza, I Soto, M Torres & A Orosco. 2010.** Bacterias marinas productoras de compuestos antibacterianos aisladas de invertebrados intermareales. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 27(2): 215-221.
- León J, JJ Aponte, R Rojas, DL Cuadra, N Ayala, G Tomas & M Guerrero. 2011.** Estudio de actinomicetos marinos aislados de la costa central del Perú y su actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes y *Enterococcus faecalis* vancomicina resistentes. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 28(2): 237-246.
- Mahyudin NA. 2008.** Actinomycetes and fungi associated with marine invertebrates: a potential source of bioactive compounds. Thesis Doctor of Philosophy in Microbiology, University of Canterbury, Christchurch, 231 pp.
- Meena B, L Anbu, N Valsalan & R Kirubakaran. 2013.** Novel marine actinobacteria from emerald Andaman & Nicobar Islands: a prospective source for industrial and pharmaceutical by products. *BCM Microbiology* 13: 145.
- Mohanraj G & T Sekar. 2013.** Antagonistic activity of marine *Streptomyces* sp LCJ94 against the shrimp pathogens. *Annals of Biological Research* 4(4): 224-227.
- Moriarty D. 1998.** Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture* 164: 351-358.
- NCCLS. 2008.** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Ninth Informational Supplement. NCCLS Document M100-S9. National Committee for Clinical Laboratory Standard, Wayne, pp. 120-126.
- Parente E, C Brienza, M Moles & A Ricciardi. 1994.** A comparison of methods for the measurement of bacteriocin activity. *Journal of Microbiological Methods* 22: 95-108.
- Patil R, G Jeyasekaran, SA Shanmugan & R Jeya-Shakila. 2001.** Control of bacterial pathogens, associated with fish diseases, by antagonistic marine actinomycetes isolated from marine sediments. *Indian Journal of Marine Sciences* 30: 264-267.
- Reddy NC, DPN Ramakrishna & SV Raja-Gopal. 2011.** A morphological, physiological and biochemical studies of marine *Streptomyces rochei* (MTCC 10109) showing antagonistic activity against selective human pathogenic microorganisms. *Asian Journal of Biological Sciences* 4(1): 1-14.
- Riquelme C, G Hayashida, N Vergara, A Vásquez, Y Morales & P Chávez. 1995.** Bacteriology of the scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) cultured in Chile. *Aquaculture* 138(1): 49-60.
- Riquelme C, R Araya & R Escribano. 2000.** Selective incorporation of bacteria by *Argopecten purpuratus* larvae: implications for the use of probiotics in culturing systems of the Chilean scallop. *Aquaculture* 181: 25-36.
- Saitou N & Nei M 1987.** The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Saravanakumar R, HS Moomeen, J Ronald & M Kannan. 2010.** Control of fish bacterial pathogens by antagonistic marine actinomycetes isolated from Gulf of Mannar coast. *World Journal of Fish and Marine Sciences* 2(4): 275-279.
- Selvakumar D, K Arun, S Suguna, D Kumar & K Dhevendaran. 2010.** Bioactive potential of *Streptomyces* against fish and shellfish pathogens. *Iranian Journal of Microbiology* 2(3): 157-164.
- Solanki R, M Khanna & R Lal. 2008.** Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Indian Journal of Microbiology* 48: 410-431.
- Takizawa M, R Colwell & R Hill. 1993.** Isolation and diversity of Actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Applied and Environmental Microbiology* 5(4): 997-100.
- Thirumurugan D & R Vijayakumar. 2013.** A potent fish pathogenic bacterial killer *Streptomyces* sp. isolated from the soils of east coast region, South Indian. *Journal of Coastal Life Medicine* 1(3): 175-180.
- Thomas TR, DP Kaylekar & PA LokaBharathi. 2010.** Marine drugs from sponge-Microbial association - A review. *Marine Drugs* 8(4): 1417-1468.
- Wan N & Darah J. 2005.** *Vibrio ruber* (S2A1), a marine bacterium that exhibits significant antimicrobial activity. *Malaysian Journal of Microbiology* 1(1): 25-30.
- Williams ST & T Cross. 1971.** Actinomycetes. In: Williams ST & T Cross (eds). *Methods in microbiology* 4: 294-334. Academic Press, New York.

**Williams ST, S Lanning & EMH Wellington. 1984.** Ecology of actinomycetes. In: Goodfellow M, M Mordarski & ST Williams (eds). The biology of the actinomycetes, pp. 481-528. Academic Press, London.

**You J, LX Cao, GF Liu, SN Zhou, HM Tan & YC Lin. 2005.** Isolation and characterization of actinomycetes antagonistic to pathogenic *Vibrio* spp. from nearshore marine sediments. World Journal of Microbiology and Biotechnology 21: 679-682.

**You JL, XL Xue, LX Cao, X Lu, J Wang, LX Zhang & SN Zhou. 2007.** Inhibition of *Vibrio* biofilm formation by a marine actinomycete strain A66. Applied Microbiology and Biotechnology 76: 1137-1144.

**Zheng L, W Lin, X Yan & H Chen. 2004.** A primary study on antimicrobial and cytotoxic activity of marine bacteria. Ying Yong Sheng Tai Xue Bao 15(9): 1633-1636.

---

Recibido el 22 junio 2015 y aceptado el 4 de enero de 2016

Editor: Claudia Bustos D.