

Evaluación de la producción de compuestos con actividad antimicrobiana por *Tistlia consotensis* usando dos condiciones de cultivo diferentes

ANDRES FELIPE MARTINEZ RODRIGUEZ

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial
Para optar el título de

MICROBIOLOGO INDUSTRIAL

Pontificia Universidad Javeriana
Facultad de Ciencias
Microbiología Industrial
Mayo de 2017

NOTA DE ADVERTENCIA

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por los alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque la tesis no contenga ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Artículo 23 de la resolución N° 13 de Julio de 1946.

Agradecimientos

Carolina Díaz por su paciencia y ayuda

Sandra Baena por su colaboración

Tabla de contenido

Resumen	7
Introducción	7
Justificación y planteamiento del problema	8
Marco teórico	9
1. Metabolitos secundarios con actividad biológica	9
2. Mecanismos de activación de CGB	9
3. Microorganismos halófilos	10
4. <i>Tistlia consotensis</i> como posible productor de moléculas bioactivas	11
Metodología	12
Conservación y reactivación de <i>T. consotensis</i>	12
Elaboración de la curva de crecimiento de <i>T. consotensis</i>	12
Producción del inóculo	12
Evaluación de la cepa USBA 355 en medio básico (Control Biótico)	13
Evaluación de la cepa USBA 355 con adición de la resina polimérica para la estimulación de metabolitos secundarios	13
Evaluación de la concentración de Trimetropina como elicitador para la producción de metabolitos secundarios	14
Evaluación del antibiotico trimetropina como elicitador	15
Prueba de actividad antimicrobiana	15
Resultados y Discusión	16
Conclusiones	23
Perspectivas y Recomendaciones	24
Bibliografía	24

Resumen

Con este trabajo se buscó estimular la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana de *Tistlia consotensis* cepa USBA 355 mediante cambios en las condiciones de cultivo y la adición de señales químicas externas.

La estrategia de realizar cambios en las condiciones de cultivo para la producción de metabolitos secundarios se le conoce como estrategia OSMAC (*one strain many compounds*), en este estudio esta estrategia incluyó la adición al medio de cultivo de la resina polimérica Amberlite XAD 16N, que puede alterar las condiciones del medio por la retención de compuestos, mientras que la adición de señales químicas externas se realizó suplementando el medio de cultivo con el antibiótico trimetropina antes de que la cepa alcanzara la fase estacionaria de crecimiento.

Posterior al cultivo, los metabolitos secundarios producidos durante la fermentación se obtuvieron al centrifugar el medio de cultivo para extraer los metabolitos del sobrenadante con solventes de diferente polaridad que incluyen cloroformo, acetato de etilo y metanol. Este último fue utilizado para extraer los metabolitos secundarios que fueron absorbidos por la resina polimérica, luego de las extracciones con solventes, se realizó una re suspensión de los extractos obtenidos con cada uno de los solventes utilizados para su extracción y agregados por separado a placas de agar Mueller Hinton inoculadas con diferentes patógenos bacterianos para detectar la actividad antimicrobiana de estos extractos.

Se observó que los extractos en metanol provenientes del cultivo suplementado con la resina Amberlite XAD 16N presentaron actividad antimicrobiana al igual que los extractos en acetato de etilo proveniente del cultivo suplementado con trimetropina. Sin embargo, en los demás extractos no se encontró actividad antimicrobiana. De este estudio se concluye que ambas estrategias de cultivo promovieron la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana.

Introducción

Los productos naturales obtenidos a partir de microorganismos tienen diversas aplicaciones en la industria farmacéutica, alimentos y energética (Shivanand & Mugeraya, 2011; Yin et al., 2015), por lo cual son estudiados constantemente.

En particular en la industria farmacéutica se ha intensificado la búsqueda de sustancias antimicrobianas, las cuales pueden ser utilizadas como una alternativa a los antibióticos existentes, puesto que la resistencia de las bacterias frente a los antibióticos convencionales ha ido en aumento (Alos, 2015).

Razón por la cual se han investigado diversos tipos de organismos, centrándose en organismos halófilos y halótolerantes, ya que las diferentes condiciones de oligotrofia de los ambientes salinos pueden favorecer la diversidad de moléculas producidas por los microorganismos presentes como mecanismo de competencia y sobrevivencia en estos ambientes salinos.

En la última década se ha encontrado que los metabolitos secundarios obtenidos de microorganismos halófilos y halótolerantes tienen diversas aplicaciones en la industria farmacéutica, de alimentos y energética (Shivanand & Mugeraya, 2011; Yin et al., 2015).

Esto ha hecho que la descripción biológica de manantiales salinos localizados en la cordillera central y oriental de los Andes Colombianos realizada por Díaz-Cárdenas & Baena en 2015 tomara importancia ya que en estos ambientes predominan los organismos de las clases Gamma y Alfa-Proteobacteria, los cuales también han sido reportados en ambientes marinos. De esta investigación se aisló la cepa USBA 355, un organismo de la clase alfa-proteobacteria perteneciente al género *Tistlia*.

Estudios previos de la cepa USBA 355 han evidenciado potencial en cuanto a la producción de metabolitos secundarios de interés, ya que al cultivar *T. consotensis* en condiciones de exceso de nutrientes, hay producción de gránulos de polihidroxialcanoatos (Blanco,2010).

Adicionalmente, en el desarrollo del proyecto “Minería de datos genómicos para el descubrimiento de metabolitos secundarios de interés biotecnológico de especies bacterianas aisladas de hábitats naturales colombianos” se identificó en el genoma de *T. consotensis* la presencia de grupos de genes biosintéticos potenciales productores de compuestos antimicrobianos.

Como parte del proyecto mencionado anteriormente surge este trabajo de investigación cuyo interés es evaluar si los cambios en las condiciones de cultivo de la cepa USBA 355 favorecen la producción de compuestos con actividad antimicrobiana. Para este fin, se evaluó el efecto de la adición de la resina polimérica Amberlite XAD-16N al medio de cultivo, y el efecto de la suplementación del cultivo con una señal química externa que corresponde al antibiótico trimetropina. Estos ensayos se proponen ya que se ha reportado que tanto las resinas como los antibióticos tienen un efecto positivo en la estimulación de expresión de grupos de genes biosintéticos asociados a la producción de metabolitos bioactivos (Lu, Liu & Shen,2010; Cao et al,2011; Seyedsayamdost,2014).

Justificación y planteamiento del problema

La principal herramienta de defensa contra los diferentes patógenos bacterianos son los antibióticos, debido a que estos son el principal tratamiento contra infecciones bacterianas. Sin embargo, también son utilizados indiscriminadamente como suplemento dietario para el ganado, aves e incluso contra patógenos de plantas. Esto ha generado cambios dramáticos en la adaptación de las diferentes comunidades microbianas a su ambiente, permitiendo el desarrollo de mecanismos de resistencia a antibióticos que se reflejan en el aumento en la dosis mínima inhibitoria de antibióticos como la Eritromicina, Vancomicina, Ciprofloxacina y Tobramicina, los cuales son utilizados comúnmente para el tratamiento de enfermedades de origen bacteriano (Sandoval-Motta S & Aldana,2016)

Referente a la resistencia a antibióticos, la Organización Mundial de la Salud emitió el 27 de febrero de 2017 la primera lista de patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos con el fin de estimular la búsqueda de nuevos antibióticos frente a bacterias que representan un riesgo para la salud pública. Por lo tanto, surge la necesidad de investigar diversas fuentes con la finalidad de encontrar metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana. Una de las fuentes más reconocidas para el descubrimiento de moléculas con actividad biológica son los microorganismos. Debido a que la mayoría de antibióticos que existen en la actualidad provienen de hongos y actinomicetos, se ha subestimado el potencial que poseen los demás microorganismos para la producción de moléculas con actividad antimicrobiana (Reen et al,2015).

En la actualidad han sido reportadas diferentes estrategias para estimular la producción de metabolitos secundarios, entre ellas se encuentran OSMAC y la adición de señales químicas externas. OSMAC hace referencia a cambios de condiciones de cultivo (Concentración de nutrientes, temperatura, aireación) mientras que la adición de señales químicas externas hace referencia como su nombre lo indica a la adición de moléculas o sustancias que generen estrés y estimulan la producción de metabolitos secundarios (Reen et al,2015).

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente con este trabajo se evalúa la producción de compuestos con actividad antimicrobiana por *T. consotensis* USBA 355 al someterla a dos condiciones de cultivo diferentes, donde se emplean las estrategias mencionadas anteriormente.

Marco teórico

1. Metabolitos secundarios con actividad biológica

Los metabolitos secundarios son compuestos que no hacen parte del metabolismo habitual para la obtención de energía y desarrollo del organismo. Estos compuestos suelen producirse en condiciones adversas para el organismo con el fin de garantizar la sobrevivencia en su nicho ecológico (Tyc et al., 2017). Las condiciones que se conocen como estimulantes de la secreción de estas sustancias son: la presencia de competidores, predadores, alta irradiación de luz ultravioleta y cambios químicos en su entorno (Lv et al.,2016).

Los metabolitos secundarios están codificados al igual que las enzimas involucradas en su producción en genes que se agrupan conformando clústeres, cuyo tamaño puede ser superior a los 100 kb. Dichos clústeres se encuentran presentes en diferentes regiones del genoma microbiano y se les denomina clústeres de genes biosintéticos (CGB).

Existen diferentes clases de CGB dadas por la entidad molecular que producen como: péptidos no ribosomales, policetidos, péptidos con modificaciones post-traduccionales y péptidos ribosomales (Reen et al,2015). Los péptidos no ribosomales (PNR) son péptidos o cadenas de péptidos que sufren modificaciones estructurales (Adenilación, adición de grupos tiol, condensación) mediadas por enzimas multifuncionales conocidas como sintetetas de PNR (Sheridan, Dolan & Doyle,2015), en cambio los policétidos son moléculas que son ensambladas por módulos por la acción de una sinteteta de policetidos (Keatinge-Clay,2017).

2. Mecanismos de activación de CGB

Para la expresión de CGB se han desarrollado diferentes aproximaciones y estrategias, las cuales se pueden dividir en modificaciones del medio de cultivo y en el uso de métodos moleculares (Reen et al,2015). Dentro de las aproximaciones basadas en el medio de cultivo se encuentra la estrategia "OSMAC" (*one strain many compounds*, una cepa muchos compuestos) (Bode et al, 2002), basada en los cambios fisiológicos que sufre el microorganismo por el ambiente en el que se encuentra, como lo es la composición del medio de cultivo, la temperatura y la aireación. Dentro de esta estrategia

se ubica la suplementación del medio de cultivo con resinas poliméricas las cuales cumplen la función de absorber compuestos e iones metálicos presentes en el medio en el que se encuentren (Ahmad *et al*,2015), lo cual estimula la síntesis de metabolitos secundarios ya que la presencia de la resina evita la toxicidad que puedan generar estos compuestos al microorganismo productor y además evitan la degradación de dichos compuestos por catálisis enzimática y la inhibición por *feedback* (Ströch, et al.,2005). También se ha reportado que el uso de estas resinas puede mantener el equilibrio de iones y pH dependiendo del material de la resina (Lee et al.,2003), lo cual puede influenciar el metabolismo microorganismo estimulando la producción de metabolitos secundarios.

Otra aproximación para la expresión de CGB es el uso de sustancias químicas que desvíen el metabolismo celular hacia la producción de metabolitos secundarios, ya que al agregar sustancias ajenas a la composición del medio de cultivo se genera estrés en las células estimulando la expresión de CBG (Reen *et al*,2015), entre las sustancias utilizadas se encuentran los antibióticos (Seyedsayamdost,2014)

El uso de antibióticos como elicitores de genes crípticos está basado en los cambios fisiológicos que causa la presencia de concentraciones sub-letales de antibióticos en el medio, se ha reportado que el uso de concentraciones sub-letales de antibióticos en bacterias generan cambios en la expresión génica alterando por completo la expresión de proteínas, lo cual se puede ver reflejado en la producción de metabolitos secundarios. Por lo cual se le considera al uso de antibióticos en concentraciones no inhibitorias como una estrategia de screenig para la identificación de nuevas moléculas con actividad biológica (Davies,Spiegelman & Yim,2006)

3. Microorganismos halófilos

Un microorganismo halófilo es aquel que requiere una determinada concentración de sal para su desarrollo. Según esta necesidad y capacidad de tolerar la salinidad, los microorganismos halófilos se pueden clasificar seis grupos diferentes: No halófilos (<0.2M NaCl), ligeramente halófilos (0.2-0.5M NaCl), moderadamente halófilos (0.5 – 2.5M NaCl), cercanos a halófilos extremos (2.5 – 4M NaCl), halófilos extremos (4- 5.9 M NaCl) y halótolerantes los cuales no necesitan sal, pero son viables a 2,5M de NaCl (Edbeib, Wahab & Huyop, 2016).

3.1 Interés en los microorganismos halófilos

Los múltiples cambios en los ambientes salinos han dotado a los microorganismos presentes en estos ambientes con la capacidad de soportar diversas condiciones adversas, como lo son: cambios en la temperatura, composición química, falta o exceso de nutrientes, ataque de patógenos. Lo cual ha determinado la supervivencia de estos microorganismos por su capacidad de producir moléculas que le permitan adaptarse a dichos cambios (Romano *et al*,2016), generando así una amplia diversidad de microorganismos lo que a su vez sugiere una amplia diversidad de compuestos biológicamente activos (Reen et al.,2015).

Los metabolitos secundarios provenientes de microorganismos halófilos y halótolerantes tienen diversas aplicaciones en la industria farmacéutica y biotecnológica. Un ejemplo son las celulasas provenientes de estos microorganismos que son funcionales en materiales con baja actividad de agua y además su cultivo es más simple que al emplear hongos filamentosos para la obtención de estas enzimas (Shivanand & Mugeraya,2011).

En el caso de la industria farmacéutica, se han descubierto múltiples antibióticos como la Hormaomicina B y C, Bacteriocina PSY2, Etamicina, Salinamida A y F, Lobofoquina E y F, Talaromicesona A and B, Macrolactinas X, Y, Z, Lindgomicina y ascosetin, los cuales tienen actividad antimicrobiana frente a diferentes patógenos bacterianos (Auckloo & Wu, 2016), también se han encontrado múltiples compuestos provenientes de microorganismos halófilos y halótolerantes con actividad citotóxica frente a diferentes líneas celulares de cáncer (Reen F & Gutiérrez-Barranquero et al.,2015; Auckloo & Wu, 2016) al igual se han encontrado moléculas con actividad parasitocida y anti fúngica (Gomes et al. 2013; Huffman et al. 2010; Auckloo & Wu, 2016).

Adicionalmente, el cultivo de microorganismos halófilos es menos contaminante para el medio ambiente ya que no se necesita esterilidad por la alta concentración de sal que se emplea, lo cual evita el lavado constante de los tanques de fermentación y adicionalmente permite el uso de agua proveniente del mar, evitando así el uso de agua potable (Yin et al,2015).

4. *Tistlia consotensis* como posible productor de moléculas bioactivas

Teniendo en cuenta los diferentes escenarios en que pueden verse involucrados los microorganismos halófilos y halótolerantes como *T. consotensis* cepa USBA355, nace el interés de conocer si este microorganismo está en la capacidad de producir metabolitos secundarios con actividad biológica.

T. consotensis es un microorganismo halótolerante aislado de un manantial salino localizado en departamento de Risaralda, Colombia (Diaz-Cardenas et al.,2010) al cual se le ha descrito parte de su proteoma bajo diferentes condiciones de salinidad (Rubiano-Labrador C et al., 2015). Estudio en el cual se determinó que hay cambios superiores al 10% en el exoproteoma dependiendo de la concentración externa de sal y que adicionalmente se producen proteínas que al ser categorizadas según su funcionalidad en la base de datos KEGG se encuentra que cerca del 20% de las proteínas producidas no tienen una función definida o su función es hipotética (Kawasaki,2016) sugiriendo una importante novedad metabólica.

Como parte del proyecto “Minería de datos genómicos para el descubrimiento de metabolitos secundarios de interés biotecnológico de especies bacterianas aisladas de hábitats naturales colombianos” se identificó en el genoma de *T. consotensis* la presencia de CGB relacionados con los compuestos kirromicina, siringomicina, epotilona y tirocidina, los cuales presentan actividad antimicrobiana o anti fúngica (Musiol et al.,2013; Kawasaki et al,2016; Ristow et al.,1975).

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, con este proyecto se esclarece la capacidad de *T. consotensis* en cuanto a la producción metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana por medio del uso de antibióticos y resinas poliméricas como condiciones para favorecer la expresión de los clústeres de genes biosintéticos asociados

a moléculas con actividad antimicrobiana. Ya que se desconocen las condiciones en las que este microorganismo puede llegar a producir este tipo de compuestos, este proyecto pretende aportar información útil para evaluar a futuro la expresión de estos clústeres de genes biosintéticos

Objetivo General:

Determinar si la adición de un antibiótico o una resina polimérica adsorbente al medio de cultivo de *Tistlia consotensis* favorece la formación de sustancias con actividad antimicrobiana.

Objetivos Específicos:

Evaluar la producción de sustancias con actividad antimicrobiana por *Tistlia consotensis* al suplementar el medio de cultivo con un antibiótico.

Evaluar la producción de sustancias con actividad antimicrobiana por *Tistlia consotensis* al suplementar el medio de cultivo con la resina Amberlite XAD 16N.

Metodología

Conservación y reactivación de *T. consotensis*

La cepa *Tistlia consotensis* USBA 355 se crio-preservó en banco de trabajo a - 80°C 20% v/v de glicerol en el medio de cultivo. La reactivación de la cepa se hizo en medio de cultivo base (MB) compuesto por: 20 mM D-glucosa y 0.1 % (m/v) extracto de levadura. Este medio base contiene por litro de agua des-ionizada: 1 g NH₄Cl, 0.3 g K₂HPO₄, 0.3 g KH₂PO₄, 3 g MgCl₂·6H₂O, 0.1 g CaCl₂·2H₂O, 0.1 g KCl, 23 g NaCl y 10 ml de solución de elementos traza SL-10 (Widdel, Kohring & Mayer, 1983). El pH del medio se ajusta a 7,1 con 1M NaOH (Diaz-Cárdenas et al., 2010). El procedimiento para la reactivación de la cepa a partir del banco consistió en descongelar el crio vial e inmediatamente vaciar su contenido en un tubo tapa rosca de 16 x150 mm que contiene 5mL de medio MB e incubar por 24 horas a 30°C en agitación constante a 150 rpm, posteriormente se verificó el crecimiento celular por medio de microscopia de contraste de fases (Nikon eclipse 50i).

Elaboración de la curva de crecimiento de *T. consotensis*

La curva de crecimiento se realizó en 200 mL de medio MB teniendo en cuenta una relación 1:5 de aireación, la cepa se incubó a 30°C y 150 rpm durante 72 horas. El seguimiento del crecimiento se realizó por monitoreo de la densidad óptica a 580nm del medio de cultivo tomando alícuotas de 0,8mL. Las lecturas se realizaron durante 72 horas a las 12,16,20,36,38,41,44,60,64,68 horas de cultivo. La prueba se realizó por triplicado.

Producción del inóculo

La estandarización del inóculo se llevó a cabo tomando 5 colonias de *T. consotensis*, las cuales fueron inoculadas en 5mL de caldo MB. Este caldo fue incubado por 12 horas a 30°C y 150 rpm y este pre-inoculo se transfirió a 70mL de caldo MB contenidos en Erlenmeyer de 250 mL y se llevó a incubación bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente por 18 horas. A partir de este cultivo se tomaron alícuotas de 20mL para inocular los diferentes tratamientos.

Tratamientos evaluados

Se evaluaron tres tratamientos que consistieron en: el crecimiento de la cepa USBA 355 en caldo MB suplementado con la resina Amberlite XAD16N, el crecimiento de USBA 355 influenciado por trimetropina en caldo MB y el crecimiento de la cepa en caldo MB (Control biótico), como control abiótico se tuvo el medio de cultivo sin inocular en los tres tratamientos. Estos tratamientos se describen a continuación

Evaluación de la cepa USBA 355 en medio básico (Control Biótico)

Este tratamiento consistió en inocular 180mL de caldo MB con 20mL provenientes del inóculo estandarizado. Este se llevó a incubación durante 72 horas a 30°C y 150rpm, luego fue centrifugado a 9000 rpm por 10 minutos a 4°C. Posteriormente el medio se mezcló tres veces con cloroformo manteniendo una relación líquido: líquido 1:1 y entre cada mezclado se recuperó el solvente y se llevó a evaporación a presión reducida utilizando un rota- evaporador (Buchi Rotavapor R114, Switzerland) hasta obtener un volumen de <1mL, este volumen se transfirió a un vial de vidrio para su secado a temperatura ambiente y su posterior almacenamiento a – 20°C. El medio de cultivo mezclado con cloroformo, fue mezclado tres veces con acetato de etilo manteniendo una relación 1:1 con el medio de cultivo, entre cada mezcla se recuperó el acetato de etilo y se llevó a evaporación a presión reducida utilizando un rota- evaporador Buchi Rotavapor R114 (Buchi, Switzerland) hasta obtener un volumen de <1mL, este volumen se transfirió a un vial de vidrio para su secado a temperatura ambiente y su posterior almacenamiento a – 20°C

Este tratamiento se realizó por triplicado al igual que las mezclas con cloroformo y acetato de etilo para obtener un total de 6 extractos, 3 extractos en cloroformo y 3 extractos en acetato de etilo provenientes de los cultivos de USBA 355.

Los controles abióticos se prepararon por triplicado haciendo extracciones con cloroformo y acetato de etilo siguiendo los protocolos descritos anteriormente para obtener finalmente 6 extractos, correspondientes a tres extractos con cloroformo y tres extractos con acetato de etilo.

Evaluación de la cepa USBA 355 con adición de la resina polimérica para la estimulación de metabolitos secundarios

Para este tratamiento se adiciono la resina Amberlite XAD16N (hydrophobic polyaromatic resins, SigmaAldrich) absorbente a los cultivos microbianos para la retención hidrofóbica de compuestos como antibióticos y otras moléculas. Esta resina se activó siguiendo el protocolo de González-Menéndez et al (2014), que consiste en sumergir la resina en un volumen de metanol equivalente a dos veces el volumen de la resina y agitar por una hora teniendo la resina sumergida en metanol, luego se hacen seis lavados con agua destilada y se guarda a 4°C por 48h teniendo la resina sumergida en agua, posteriormente se filtra la resina y se seca a 72°C para luego ser agregada al medio MB a una concentración final de 2% (p/v) (Frykman et al,2002) (Cao *et al*,2011), previo a la esterilización del medio. Posterior a la esterilización del medio MB con la resina adicionada por autoclave a 121°C por 15 minutos se agregaron 20mL del inóculo para obtener un volumen final de 200mL en un Erlenmeyer de 1L.

Este montaje se realizó por triplicado al igual que los controles que consistían en el medio de cultivo con adición de la resina, pero sin inóculo.

Para la extracción de metabolitos secundarios que fueron retenidos por la resina polimérica se filtró el medio de cultivo para separar la resina, posterior a esto se centrifugó el medio de cultivo sin resina a 9000 rpm por 10 minutos a 4°C. Para la remoción de los metabolitos secundarios retenidos en la resina esta se lavó una vez con agua desionizada utilizando un volumen igual a 10 veces el peso de la resina (Ej: 2g Resina = 20mL de agua destilada) luego se lavó con 100mL de metanol y se agitó por 15 minutos a 200 rpm (Frykman et al,2002;Khosla et al.,2008) posterior a la agitación se agregaron 100mL de metanol al recipiente que contiene la resina y se llevó a agitación por 15 minutos a 200rpm, este paso se repitió, para un total de 3 lavados para obtener un volumen final de 300mL, posteriormente, se filtró el metanol utilizando una membrana de nylon con tamaño de poro 0,2µm (Whatman, GE Health care) con el fin de retener la resina y se llevó a evaporación bajo presión reducida utilizando un rota-evaporador Buchi Rotavapor R114 (Buchi, Switzerland) hasta obtener un volumen de <1 mL, este volumen se transfiere a un vial de vidrio para su secado a temperatura ambiente y su posterior almacenamiento a – 20°C.

El medio de cultivo centrifugado y sin resina se mezcló tres veces con cloroformo manteniendo una relación 1:1 y entre cada mezclado se recuperó el solvente y se llevó a evaporación a presión reducida utilizando un rota-evaporador Buchi Rotavapor R114 (Buchi, Switzerland) hasta obtener un volumen de <1mL, este volumen se transfirió a un vial de vidrio para su secado a temperatura ambiente y su posterior almacenamiento a – 20°C. El medio de cultivo mezclado con cloroformo, fue mezclado tres veces con acetato de etilo manteniendo una relación 1:1 con el medio de cultivo, entre cada mezcla se recuperó el acetato de etilo y se llevó a evaporación a presión reducida utilizando un rota-evaporador Buchi Rotavapor R114 (Buchi, Switzerland) hasta obtener un volumen de <1mL, este volumen se transfirió a un vial de vidrio para su secado a temperatura ambiente y su posterior almacenamiento a – 20°C

Este tratamiento se realizó por triplicado al igual que las mezclas con cloroformo y acetato de etilo para obtener un total de 6 extractos a partir del medio de cultivo sin resina, 3 extractos en cloroformo y 3 extractos en acetato de etilo provenientes de los cultivos de USBA 355 con la resina, a partir de la resina se obtienen 3 extractos cada uno correspondiente a cada una de las réplicas.

Los controles abióticos se prepararon por triplicado haciendo extracciones con cloroformo, acetato de etilo y metanol (la extracción con metanol se realiza únicamente a la resina Amberlite XAD 16N) siguiendo los protocolos descritos anteriormente para obtener finalmente 6 extractos, correspondientes a tres extractos con cloroformo y tres extractos con acetato de etilo.

Evaluación de la concentración de Trimetropina como elicitor para la producción de metabolitos secundarios

Antes de realizar el tratamiento donde se utiliza como elicitor el antibiótico trimetropina, se evaluó si la concentración de trabajo presentaba efecto inhibitorio en la cepa USBA 355 y en las cepas utilizadas en la prueba de actividad antimicrobiana (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa*).

Se preparó una concentración stock de Trimetropina de 23 mg/ml en dimetil sulfoxido (DSMO), la solución fue esterilizada por filtración usando membrana de nylon con poro de 0,22 μm (Captiva, Agilent Technologies).

La evaluación del efecto de la trimetropina en la cepa USBA 355 se realizó inoculando 5 mL de medio MB en tubo tapa rosca con 4 colonias de *T. consotensis* provenientes de medio MB sólido, luego de doce horas de incubación a 30°C y 150 rpm, se realizó el pase de 0,5mL del cultivo a 4,5mL de caldo MB suplementado con el antibiótico trimetropina a concentraciones de 8.8, 20 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por triplicado. Los diferentes tratamientos fueron incubados por 36 horas, 30°C y 150 rpm.

Las cepas *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* se cultivaron en caldo Luria Bertani (Mo Bio) a 37°C, 24 horas para la evaluación de las concentraciones subletales de trimetropina utilizando la misma metodología mencionada anteriormente, donde se utiliza caldo LB en vez del caldo MB.

El efecto del antibiótico fue evaluado por turbidez del medio y microscopia de contraste de fases (Nikon eclipse 50i).

Evaluación del antibiotico trimetropina como elicitor

Para la evaluación de la adición de trimetropina como elicitor se siguió la misma metodología de cultivo empleada para la evaluación de resina polimérica, pero en este caso no se utilizó la resina.

Los cultivos se mantuvieron en agitación a 150 rpm a 30°C, transcurridas 36 horas de cultivo se adicionó trimetropina a una concentración final de 8,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se llevó nuevamente a incubación a 150 rpm a 30°C hasta finalizar el tiempo correspondiente a la fase estacionaria (72 horas). Luego los cultivos se sometieron al proceso de extracción de metabolitos secundarios usando cloroformo y acetato de etilo como fue descrito anteriormente.

Los procedimientos de extracción realizados con todos los caldos de los tres tratamientos dan como resultado la obtención en total 36 extractos, 18 extractos correspondientes a los controles abióticos y 18 extractos correspondientes a los cultivos de USBA 355.

Prueba de actividad antimicrobiana

Esta prueba se realizó con cada uno los extractos obtenidos de los cultivos de *T. consotensis*, al igual se realizó los extractos provenientes de los controles abióticos, también se sometió la prueba cada uno de los solventes utilizados para las extracciones. Todos los extractos fueron re suspendidos a una concentración final de 10mg/mL en el solvente del cual provienen, es decir se agregó el volumen necesario de solvente utilizado para su extracción del medio de cultivo, para obtener una concentración final de 10 mg/mL.

Para la prueba de actividad antimicrobiana se empleó el método de difusión en pozo (Balouiri, Sadiki & Ibnsouda,2016; Amraoui et al.,2014) el cual consiste en inocular en agar Mueller Hinton (MHA) una suspensión celular del patógeno en solución salina 0,85% del patógeno con turbidez igual a patrón número dos de Mc Farland y posteriormente realizar pozos de 6mm de diámetro y agregar 50 μL de cada extracto y llevar a incubación

refrigeración a 4°C por 8 horas y posteriormente incubar por 20 - 24 horas a 37°C, se utilizaron 5 extractos por placa de agar en cajas de Petri de 9cm de diámetro, los microorganismos a evaluados fueron *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis*, los cuales provienen de la colección de microorganismos de la Pontificia Universidad Javeriana.

Resultados y Discusión

Con el fin de determinar la cinética de crecimiento de *T. consotensis* bajo las condiciones del ensayo y determinar los intervalos de tiempo en que se presentan las diferentes etapas del crecimiento bacteriano, se elaboró la curva de crecimiento presentada en la figura 1. Esta curva fue relevante para este estudio debido a que era necesario determinar el momento en que *T. consotensis* entraba en fase de crecimiento estacionario con el fin de establecer la hora a la cual se debía adicionar la trimetropina al medio de cultivo. Además, la curva fue realizada para poder determinar en qué momento se detenía el crecimiento del microorganismo y se procedería con la extracción de metabolitos secundarios con cloroformo, acetato de etilo y metanol

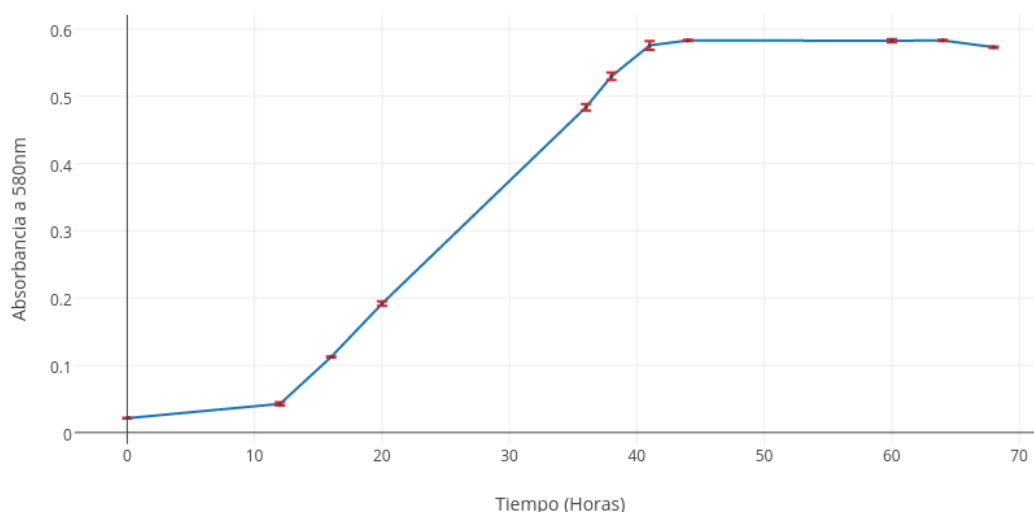


Figura 1. Curva de crecimiento para *T. consotensis* en 200mL de medio de cultivo

La cinética de *T. consotensis* representada en la Figura 1 muestra las etapas de crecimiento para este microorganismo. Sin embargo, estos resultados difieren con lo presentado por Rubiano-Labrador en 2014, quien reporta que *T. consotensis* alcanzó la fase estacionaria a las 25 horas de cultivo en volúmenes de 5mL de cultivo. Este estudio muestra que *T. consotensis* alcanzó la fase estacionaria a las 42 horas de cultivo, lo cual podría explicarse por el aumento en volumen del medio de cultivo utilizado. Esta es la primera vez que se realiza la curva de crecimiento de *T. consotensis* a volúmenes mayores a 5mL.

Los estudios de cinética de crecimiento realizados anteriormente (Rubiano-Labrador, 2014) eran elaborados en tubo de ensayo de 16X150mm con tapa rosca, por lo cual la aireación cambia por completo debido a que la superficie de contacto del medio de cultivo

con el oxígeno aumenta, influenciando la cinética de crecimiento (Doran, 1998). Además, la cinética se pudo ver afectada por la concentración de NaCl utilizada (23g/L) ya que Rubiano-Labrador 2014 utiliza una concentración de 5 gramos de NaCl por litro de caldo MB, concentración a la cual se obtiene una mayor velocidad de crecimiento.

Al determinar la cinética de *T. consotensis* bajo las condiciones de cultivo del ensayo, se estipuló el tiempo de incubación para los tratamientos evaluados, debido a que era necesario determinar el tiempo que le tomaba al microorganismo en finalizar su crecimiento, para poder proceder con la extracción de metabolitos secundarios. Además para el tratamiento con trimetropina era necesario establecer el momento en que el microorganismo cambiaba de fase de crecimiento exponencial a fase estacionaria de crecimiento debido a que en este momento era necesario suplementar el medio de cultivo con la trimetropina

Debido a que los solventes utilizados para la extracción de metabolitos secundarios son tóxicos, se consideró necesario su evaluación frente a los patógenos utilizados en la prueba de actividad antimicrobiana para evitar falsos positivos de la inhibición del crecimiento de los patógenos utilizados en dicha evaluación. Los resultados obtenidos presentan en la tabla 1.

Tabla 1 Control de solventes utilizados en prueba de actividad antimicrobiana

Microorganismo	Solvente		
	Acetato de Etilo	Cloroformo	Metanol
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-

+ = Presencia de halo de inhibición de crecimiento

- = Ausencia de halo de inhibición de crecimiento

Estos resultados demuestran que los solventes no inhibieron el crecimiento de los microorganismos seleccionados para las pruebas de actividad antimicrobiana, permitiendo continuar esta evaluación.

En la tabla 2 se presentan los resultados de la actividad antimicrobiana obtenidos del crecimiento de la cepa USBA 355 sin modificación del medio base, es decir el control biótico.

Evaluación de la cepa USBA 355 en medio básico

Tabla 2 Efecto antimicrobiano de los extractos obtenidos a partir del crecimiento de la USBA355 en caldo MB

Esta tabla muestra los resultados de la prueba de actividad antimicrobiana al someter cada uno de los extractos obtenidos al cultivar USBA 355 en caldo MB, cada uno de los extractos se estandarizó a una concentración final de 10 mg/mL

	<i>P. aeruginosa</i>			<i>B. subtilis</i>			<i>S. aureus</i>		
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
	Cloroformo								
MB	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBU	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Acetato de Etilo								
MB	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBU	-	-	-	-	-	-	-	-	-

MB= Medio Base (Control abiótico), MBU = Medio Base + USBA 355

+ = Presencia de halo de inhibición de crecimiento

- = Ausencia de halo de inhibición de crecimiento

De la tabla 2 se evidencia que en las condiciones de este estudio sin adición de elicitores no hubo detección de actividad antimicrobiana. Este hecho se podría relacionar con la no producción de metabolitos secundarios con dicha actividad. Esto ocurre con diversos microorganismos con CGB, que para la activación de sus CGB suele ser necesario modificar las condiciones de cultivo (Reen et al.,2015). Estos CGB son llamados clústeres silenciosos porque están presentes en el genoma, pero no son expresados (Reen et al 2015). Esto se afirma con los resultados de actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos a partir de los tratamientos con modificaciones en cuanto a las condiciones de cultivo, los cuales se presentan en las tablas 3 y 5

Evaluación de la cepa USBA 355 con adición de la resina polimérica para la estimulación de metabolitos secundarios

La tabla 3 muestra los resultados de la prueba de actividad antimicrobiana al someter cada uno de los extractos obtenidos en el tratamiento de USBA 355 con la resina Amberlite XAD 16N.

Tabla 3 Actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos a partir del tratamiento de USBA 355 con la resina Amberlite XAD 16N. Esta tabla muestra los resultados de la prueba de actividad antimicrobiana al someter cada uno de los extractos obtenidos en el tratamiento con la resina Amberlite XAD 16N

	Metanol								
	<i>P. aeruginosa</i>			<i>B. subtilis</i>			<i>S. aureus</i>		
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
MBA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBAU	-	-	-	-	-	-	+	-	+
	Cloroformo								
MBA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBAU	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Acetato de Etilo								
MBA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBAU	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Abreviaciones:

MBA = Medio base + Amberlite 16N (Control abiótico), MBAU = Medio base + Amberlite 16N + USBA355

+ = Presencia de halo de inhibición de crecimiento

- = Ausencia de halo de inhibición de crecimiento

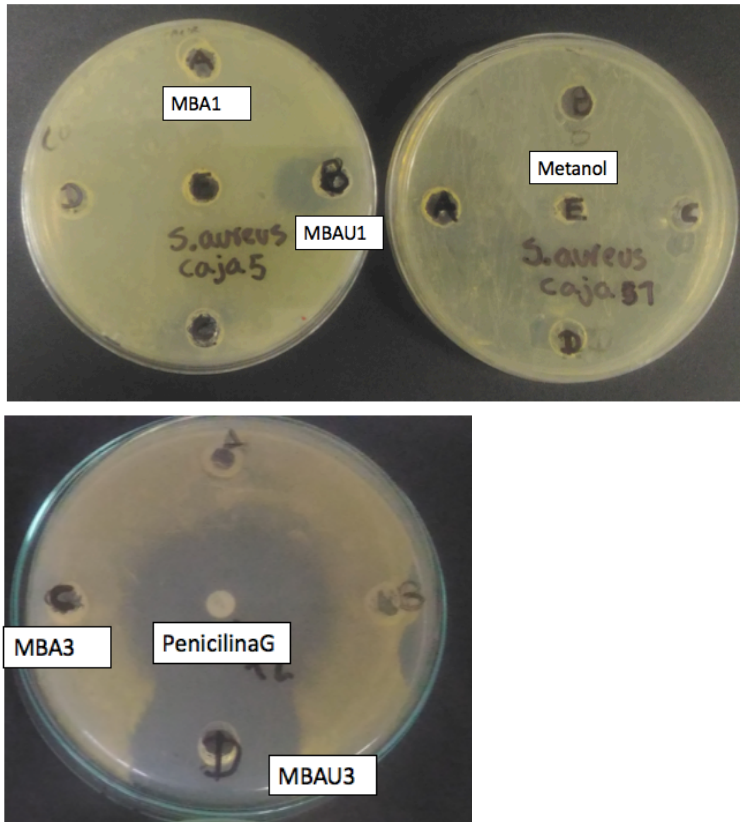


Figura 2 Halos de inhibición de crecimiento *S. aureus* en la prueba de actividad antimicrobiana

La figura 2 muestra los halos de inhibición del crecimiento de *S. aureus* frente a los extractos en metanol y frente al sensi disco de penicilina G, el cual es usado como control positivo de la prueba

Teniendo en cuenta que el metanol no presentó un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *S. aureus* (Tabla 1), como tampoco lo presentó el extracto control (MBA), por lo cual la presencia del halo de inhibición de crecimiento de *S. aureus* en los extractos en metanol (MBAU1 y MBAU2) permitió evidenciar la producción de compuestos antimicrobianos por *T. consotensis* cuando el medio es suplementado con la resina Amberlite XAD 16N. Dicha resina pudo haber reteniendo compuestos con actividad antimicrobiana. Esto se ha mostrado anteriormente con diferentes microorganismos donde se ha aumentado la producción de compuestos como la retimicina, galtamicina, saquamicina y ribofuranocil (Ströch et al.,2005), teicoplanina (Lee et al.,2003) al suplementar el medio de cultivo con resinas poliméricas, incluso para la producción de micrastatin se ha patentado un método que utiliza la resina Amberlite XAD 16N en el medio de cultivo del microorganismo productor de este compuesto (Koshla et al.,2008)

La producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana puede deberse a que la resina polimérica con la que se suplementó el medio de cultivo disminuyó el efecto tóxico que tiene la acumulación de los compuestos producidos por *T. consotensis* en el medio de cultivo. Se ha encontrado que determinada concentración de un metabolito secundario puede causar toxicidad sobre el microorganismo que lo produce, lo cual detiene la síntesis de dicho compuesto. Aunque se conoce que la síntesis de metabolitos

secundarios también puede verse inhibida por retro alimentación de la ruta metabólica (*feedback*) que lo produce, lo cual se evita al suplementar el medio de cultivo una resina polimérica que disminuye la concentración de metabolitos secundarios en el medio de cultivo al absorberlos en su superficie (Lee et al.,2003).

Con respecto a la réplica 1 del extracto con metanol, que no presentó actividad antimicrobiana, se podría sugerir una baja retención de compuestos por el metanol. En esta réplica se obtuvo la menor recuperación de masa de las tres réplicas (datos no presentados), esto teniendo en cuenta que al realizar la resuspension de los extractos todos fueron llevados a una concentración de 10 mg/mL, por lo que al haber poca retención de todos los compuestos por parte del metanol al lavar la resina con este solvente dichos compuestos pueden haberse diluido al agregar el solvente y por ende no presentar un halo de inhibición.

Como evaluación preliminar para los ensayos realizados con trimetropina, se determinó si la concentración de trimetropina utilizada como elicitador no producía efecto inhibitorio en el crecimiento de *T. consotensis* y de los patógenos a utilizar en la prueba de antimicrobianos, ya que al realizar la extracción con cloroformo y acetato de etilo puede haber recuperación del antibiótico. Los resultados de dicha evaluación se presentan en la tabla 4

Tabla 4. Crecimiento de *T. consotensis* y cepas utilizadas en la prueba de actividad antimicrobiana en presencia de diferentes concentraciones de Trimetropina

Microorganismo	µg/mL Trimetropina en medio de cultivo		
	8,8	20	50
<i>Tistlia consotensis</i>	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	-
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+

- = Ausencia de crecimiento / + = Crecimiento

Teniendo en cuenta que la concentración de antibiótico a utilizar como elicitador no generó inhibición del crecimiento de *T. consotensis*, se continuó con el tratamiento con trimetropina. Los resultados en la prueba de actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos con el tratamiento mencionado se presentan a continuación.

Evaluación del antibiótico trimetropina como elicitor

Tabla 5 Actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos a partir del tratamiento de USBA 355 con trimetropina. Esta tabla muestra los resultados de la prueba de actividad antimicrobiana. Cada uno de los extractos se estandarizó a una concentración final de 10 mg/mL

	<i>P. aeruginosa</i>			<i>B. subtilis</i>			<i>S. aureus</i>		
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
	Cloroformo								
MBT(Control abiótico)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBUT	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Acetato de Etilo								
MBT (Control abiótico)	-	-	-	-	-	-	-	+	+
MBUT	-	-	-	-	-	-	+	+	+

MBT= Medio base + Trimetropina, MBUT= Medio base + USBA 355+Trimetropina

+ = Presencia de halo de inhibición de crecimiento

- = Ausencia de halo de inhibición de crecimiento

+* = Presencia de Halo con mayor diámetro que el control

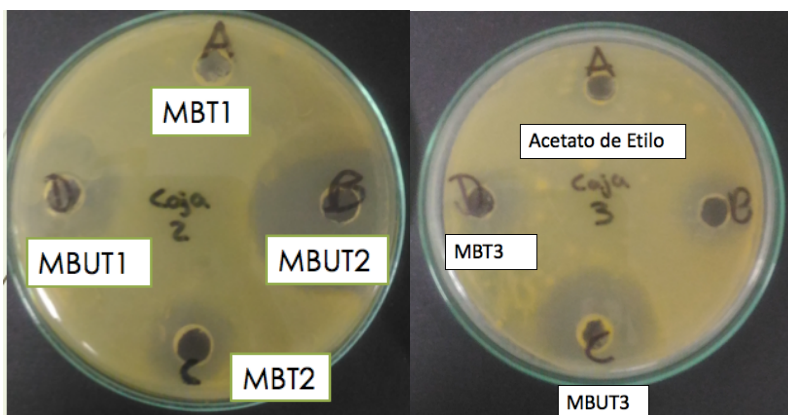


Figura 3 Halo de inhibición de crecimiento de *S. aureus* en prueba de actividad antimicrobiana

Esta figura muestra los halos de inhibición de crecimiento de frente al extracto en acetato de etilo proveniente del cultivo suplementado con trimetropina

MBT1 = Medio base + Trimetoprima, MBUT= Medio base + USBA 355+Trimetoprima, los números representan las réplicas correspondientes a los extractos

Los resultados obtenidos a partir de los extractos en acetato de etilo del cultivo suplementado con trimetoprima frente a *S. aureus* (Figura 3) evidencian la formación de compuestos antimicrobianos por *T. consotensis*. Aunque los controles abióticos de los extractos en acetato de etilo del medio de cultivo también mostraron un halo de inhibición del crecimiento de *S. aureus*, la diferencia de tamaño entre ambos es considerable. En la

figura 3 se observa que los halos de inhibición presentados por los extractos en acetato provenientes del cultivo con *T. consotensis* tienen una mayor extensión que los extractos en acetato del medio de cultivo (control abiótico), lo cual puede deberse a la presencia de sustancias antimicrobianas en el extracto en acetato de etilo proveniente del cultivo de *T. consotensis*.

La suplementación del medio de cultivo con concentraciones subletales de antibióticos para la formación de metabolitos secundarios con actividad biológica ha demostrado ser un método útil para el descubrimiento de nuevas moléculas con actividad antimicrobiana (Davies, Spiegelman & Yim, 2006). Estudios como el de Seyedsayamdost en 2014 muestra mejores resultados en cuanto a la producción de malleilactona por *Burkholderia thailandensis* al suplementar el medio de cultivo con Trimetropina frente al uso de otras sustancias con actividad antimicrobiana. La trimetropina al bloquear la síntesis de tetrahidrofolato afecta la síntesis de ADN y ARN (Neu & Gootz, 1996) lo cual estimula la producción de sustancias antimicrobianas. Este mecanismo se ha reportado también para otros antibióticos que afectan la síntesis de ADN y ARN, aunque se ha encontrado que antibióticos que afectan la síntesis proteica tienen efectos sobre la producción de metabolitos secundarios (Davies, Spiegelman & Yim, 2006; Seyedsayamdost, 2014),

En la Prueba de actividad antimicrobiana se encontró que ninguno de los extractos produjo inhibición del crecimiento en *P. aeruginosa* ni en *B. subtilis*, sin embargo, esto difiere a lo observado en los extractos en metanol y acetato de etilo frente a *S. aureus* (Figura 2 y 3) donde hubo inhibición del crecimiento bacteriano. También se encontró que ninguno de los solventes inhibió el crecimiento de los microorganismos utilizados en la prueba de actividad antimicrobiana por lo cual se puede asumir que no interfieren en los resultados presentados.

Los resultados obtenidos en la prueba de actividad antimicrobiana con *P. aeruginosa* y *B. subtilis*, pueden deberse a que la acción antimicrobiana de los metabolitos secundarios producidos por *T. consotensis* pueden presentar espectro reducido de acción frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos. Esto se ha observado también en microorganismos halótolerantes (El Amraouia et al, 2013)

Estudios como el de Mazalan et al. en 2012 muestran que hay una mayor tasa de recuperación de compuestos antimicrobianos al utilizar solventes polares para la extracción de metabolitos secundarios de microorganismos halófilos y halótolerantes. Este hecho también se observó en este trabajo ya que ninguno de los extractos en cloroformo presentó actividad antimicrobiana. Este resultado era de esperarse porque los posibles compuestos que *T. consotensis* puede llegar a producir están relacionados con CGB codificantes para compuestos polares, sin embargo, las extracciones con cloroformo (solvente no polar) se realizaron con el fin de no discriminar la posibilidad de encontrar compuestos no polares, acorde con los objetivos establecidos para este trabajo.

Conclusiones

- El uso de elicitores para la producción de compuestos con actividad antimicrobiana por *Tistlia consotensis* cepa USBA 355 frente a la ausencia de los mismos fue efectiva para la detección de actividad antimicrobiana, lo cual podría indicar la expresión de alguno de los CGB que posee este microorganismo

- La suplementación del medio de cultivo de *T. consotensis* con trimetropina y la resina Amberlite XAD 16N permitió la producción de compuestos polares con actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*

Perspectivas y Recomendaciones

El trabajo realizado recalca el potencial biotecnológico que posee *T. consotensis* en cuanto a la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana. Por lo cual se sugiere dar continuidad al estudio realizado, al investigar la composición de los extractos que presentaron actividad antimicrobiana como también la optimización de las condiciones de cultivo que permitieron la obtención de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana.

Bibliografía

- Ahmad A, Siddique JA, Laskar MA, Kumar R, Mohd-Setapar SH, Khatoon A, et al. New generation Amberlite XAD resin for the removal of metal ions: A review. *Journal Environmental Science (China)*. 2015
- Auckloo BN, Wu B. Antibiotics Derived from Marine Organisms: Their Chemistry and Biological Mode of Action. *Antibiotics Derived From Marine Organisms*. 2016. p. 483–515
- Bode, H.B.; Bethe, B.; Hofs, R.; Zeeck, A. Big effects from small changes: Possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBioChem* 2002, 3, 619–627.
- Baltz RH. Gifted microbes for genome mining and natural product discovery. *Journal Industrial Microbiology Biotechnology*. 2016;44(4):1–16.
- Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal Pharmaceutical Analysis*. 2016;6(2):71–9.
- Blanco K. Detección de Granulos de polihidroxicanoatos en la cepa USBA 355. *Repositorio Pontificia Universidad Javeriana*. 2010
- Cao W, Gong G, Liu X, Hu W, Li Z, Liu H, et al. Optimization of epothilone B production by *Sorangium cellulosum* using multiple steps of the response surface methodology. *African Journal Biotechnology*. 2011;10(53):11058–70.
- Davies J, Spiegelman GB, Yim G. The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Current Opinion in Microbiology*. 2006;9(5):445–53.
- Doran, P.M. *Principios de ingeniería de los bioprocesos*. Zaragoza, España, Acribia S. A. 1998
- Díaz-Cárdenas C, Baena S. Manantiales salinos: Inventarios de Diversidad Metabólica filogenética de microorganismos de ambientes salinos. *Revista la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 2015;39(152):358.

El Amraoui B, El Amraoui M, Cohen N, Fassouane A. Antifungal and antibacterial activity of marine microorganisms. *Annales pharmaceutiques francaises*. 2014;72(2):107–11.

Frykman S, Tsuruta H, Lau J, Regentin R, Ou S, Reeves C, et al. Modulation of epothilone analog production through media design. Vol. 28. *Journal of industrial Microbiology & Biotechnology*; 2002

González-Menéndez V, Asensio F, Moreno C, de Pedro N, Monteiro MC, de la Cruz M, et al. Assessing the effects of adsorptive polymeric resin additions on fungal secondary metabolite chemical diversity. *Mycology*. 2014;5(3):179–91.

Gomes ES, Schuch V, de Macedo Lemos EG. Biotechnology of polyketides: new breath of life for the novel antibiotic genetic pathways discovery through metagenomics. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2013

Huffman J, Gerber R, Du L. Recent advancements in the biosynthetic mechanisms for polyketide-derived mycotoxins. *Biopolymers*. 2010

Imhoff JF, Labes A, Wiese J. Bio-mining the microbial treasures of the ocean: New natural products. *Biotechnology Advances*. 2011;29(5):468–82.

Keatinge-Clay AT. Polyketide Synthase Modules Redefined. *Angew Chemie Int Edition* . 2017

Khosla C, Licari P, Carney J. Fermentation and purification of micrastatin and analog. United States; US 7,375,230 B2, 2008.

Kawasaki Y, Nischwitz C, Grilley MM, Jones J, Brown JD, Takemoto JY. Production and Application of Syringomycin E as an Organic Fungicide Seed Protectant against Pythium Damping-off. *Journal Phytopathology*. 2016;164(10):801–10.

Lee JC, Park HR, Park DJ, Lee HB, Kim YB, Kim CJ. Improved production of teicoplanin using adsorbent resin in fermentations. *Lett Applied Microbiology*. 2003;37(3):196–200.

Lv H, Li J, Wu Y, Garyali S, Wang Y. Transporter and its engineering for secondary metabolites. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2016;100(14):6119-30

Mazalan N, Zain MM, Hamzah AS. Antimicrobial activity of marine bacteria from Malaysian coastal area. 2012 EEE Symposium on Humanities, Science and Engineering Research. 2012;1273–7.

Musiol EM, Greule A, Härtner T, Kulik A, Wohlleben W, Weber T. The AT2 domain of KirCI loads malonyl extender units to the ACPs of the kirromycin PKS. *ChemBioChem*. 2013;14(11):1343–52.

Neu HC, Gootz TD. Antimicrobial Chemotherapy. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.

Ristow H, Schazschneider B, Vater J, Kleinkauf H. Some characteristics of the DNA tyrocidine complex and a possible mechanism of the gramicidin action. *BBA Sect*

Nucleic Acids Protein Synthesis.1975

Rubiano-Labrador C. Análisis comparativo de la expresión de proteínas de *Tistlia consotensis* en respuesta a cambios en la salinidad externa. Repositorio Pontificia Universidad Javeriana. 2014

Rubiano-Labrador C, Bland C, Miotello G, Armengaud J, Baena S. Salt stress induced changes in the exoproteome of the halotolerant bacterium *Tistlia consotensis* deciphered by proteogenomics. PLoS One. 2015;10(8):1–17.

Romano G, Costantini M, Sansone C, Lauritano C, Ruocco N, Ianora A. Marine microorganisms as a promising and sustainable source of bioactive molecules. Marine Environmental Research. 2016

Reen F, Gutiérrez-Barranquero J, Dobson A, Adams C, O’Gara F. Emerging Concepts Promising New Horizons for Marine Biodiscovery and Synthetic Biology. Vol. 13, Marine Drugs. 2015

Reen FJ, Romano S, Dobson ADW, O’Gara F. The sound of silence: Activating silent biosynthetic gene clusters in marine microorganisms. Marine Drugs. 2015;13(8):4754–83.

Sandoval-Motta S, Aldana M. Adaptive resistance to antibiotics in bacteria: A systems biology perspective. Wiley Interdisciplinary Review Systematic Biology and Medicine. 2016;8(3):253–67

Seyedsayamdost MR. High-throughput platform for the discovery of elicitors of silent bacterial gene clusters. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2014;111(20):7266–71.

Sheridan KJ, Dolan SK, Doyle S. Endogenous cross-talk of fungal metabolites. Frontiers in Microbiology. 2015;6(JAN):1–11.

Ströch K, Zeeck A, Antal N, Fiedler H-P. Retymicin, galtamycin B, saquayamycin Z and ribofuranosyllumichrome, novel secondary metabolites from *Micromonospora* sp. Tü 6368. II. Structure elucidation. Journal Antibiotics (Tokyo). 2005;58(2):103–10.

Tyc O, Song C, Dickschat JS, Vos M, Garbeva P. The Ecological Role of Volatile and Soluble Secondary Metabolites Produced by Soil Bacteria. Trends Microbiology.2017;25(4):280–92.

Walsh CT, O’Connor SE, Schneider TL. Polyketide-nonribosomal peptide epothilone antitumor agents: The EpoA, B, C subunits. Journal Industrial Microbiology Biotechnology. 2003;30(8):448–55.

Widdel F, Kohring G-W, Mayer F. Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. Archives of Microbiology. 1983.134:286-294

Ziemert N, Alanjary M, Weber T. Natural Product Reports The evolution of genome mining in microbes – a review. Natural Product Report. 2016