



UNIVERSIDAD DE OVIEDO
Vicerrectorado de Internacionalización
y Postgrado

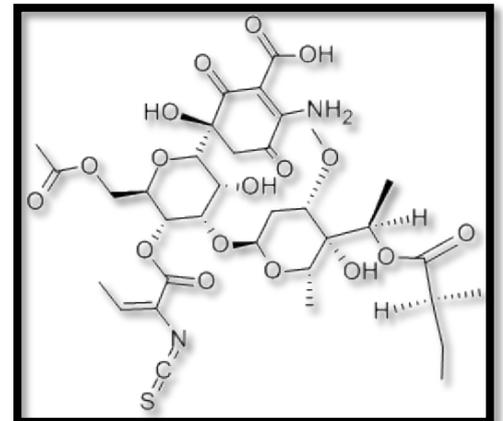
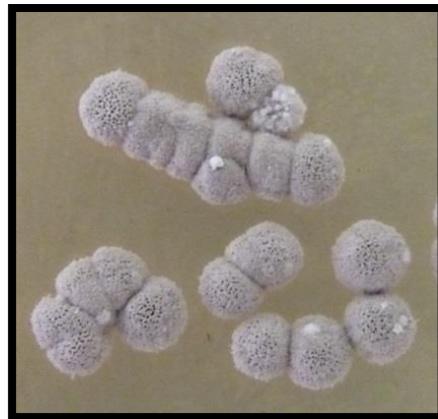


CENTRO INTERNACIONAL
DE POSTGRADO
CAMPUS DE EXCELENCIA
INTERNACIONAL

Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Producción de Antibióticos en *Streptomyces* Asociados a Organismos Marinos



Verónica González Iglesias
15 de Julio de 2013



UNIVERSIDAD DE OVIEDO
Vicerrectorado de Internacionalización
y Postgrado



**CENTRO INTERNACIONAL
DE POSTGRADO**
CAMPUS DE EXCELENCIA
INTERNACIONAL



UNIVERSIDAD DE OVIEDO
Vicerrectorado de Internacionalización
y Postgrado



CENTRO INTERNACIONAL
DE POSTGRADO
CAMPUS DE EXCELENCIA
INTERNACIONAL

Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Producción de Antibióticos en *Streptomyces* Asociados a Organismos Marinos

Verónica González Iglesias

Firma

Abelardo Casares Sánchez

Firma

Gloria Blanco Blanco

Firma



UNIVERSIDAD DE OVIEDO
Vicerrectorado de Internacionalización
y Postgrado



**CENTRO INTERNACIONAL
DE POSTGRADO**
CAMPUS DE EXCELENCIA
INTERNACIONAL

ÍNDICE

RESUMEN.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. MATERIAL Y MÉTODOS.....	6
2.1 Recogida de muestras y procesamiento.....	6
2.1.1 Organismos de la zona intermareal.....	6
2.1.2 Organismos del arrecife coralino.....	6
2.2 Medios de cultivo.....	7
2.2.1 Medios de cultivo para <i>Streptomyces</i>	7
2.2.2 Otros medios de cultivo.....	8
2.3 Aislamientos en medios selectivos.....	8
2.4 Ensayos de actividad antimicrobiana.....	8
2.4.1 Microorganismos utilizados como cepas reveladoras	8
2.4.2 Análisis de producción de compuestos antimicrobianos mediante bioensayos.....	8
2.5 Identificación de los compuestos antibióticos mediante UPLC.....	10
2.6 Conservación de las esporas.....	10
III. RESULTADOS.....	11
3.1 Aislamiento de especies <i>Streptomyces</i> a partir organismos de la zona intermareal.....	11
3.1.1 Producción de antibióticos en distintos medios de cultivo.....	12
3.2 Aislamiento de especies <i>Streptomyces</i> a partir de los organismos del arrecife coralino del Cañón de Avilés.....	13
3.2.1 Presencia de <i>Streptomyces</i> en los ejemplares procedentes de las distintas estaciones muestreadas.....	13
3.2.2 Cepas de <i>Streptomyces</i> encontradas en los diferentes organismos.....	14
3.2.3 Ensayos de actividad antimicrobiana.....	22
3.2.4 Antibióticos y antitumorales identificados.....	23
IV. DISCUSIÓN.....	24
4.1 Distribución de <i>Streptomyces</i> en los diferentes organismos marinos.....	24
4.2 Cepas de <i>Streptomyces</i> aisladas.....	25
4.3 Compuestos antibióticos producidos por las distintas cepas.....	26
V. CONCLUSIONES.....	27
BIBLIOGRAFÍA.....	28
ANEXOS	

RESUMEN

El género *Streptomyces*, dentro del grupo de los actinomicetos, se considera la “farmacia” de la naturaleza, ya que de este grupo se extraen la mayor parte de compuestos utilizados en la medicina actual, como antibióticos, antifúngicos, antitumorales, etc. Tradicionalmente han sido consideradas bacterias del suelo, pero en los últimos años se ha puesto de manifiesto la presencia de estreptomicetos en ecosistemas marinos asociados a muchos grupos de organismos, sobre todo a algas, corales y esponjas. Este medio presenta unas características muy diferentes al medio terrestre, por tanto es muy posible que los estreptomicetos que aquí encontremos tengan rutas metabólicas diferentes que sintetizen nuevas moléculas para usos biomédicos. En este trabajo hemos estudiado la presencia de estreptomicetos en dos ambientes diferentes, la zona intermareal de la costa asturiana, y el arrecife coralino situado en el Cañón de Avilés. Todas las muestras de vegetales y otros organismos recogidas de la zona intermareal presentaban *Streptomyces*, mientras que de los 90 ejemplares recogidos en el arrecife coralino, 32 mostraron presencia de estas bacterias. Se han encontrado en total 18 cepas con diferentes características fenotípicas, actividad antibiótica y perfil metabólico, asociadas en los vegetales y otros organismos analizados. En algunas de ellas se han identificado distintas familias de antibióticos, como paulomicinas, antraciclinas, lobofoquinas y maltofilinas. Estos resultados muestran por un lado la necesidad de profundizar en el estudio de los compuestos sintetizados por este género bacteriano, y por otro lado profundizar en las implicaciones ecológicas de las asociaciones entre organismo y bacteria.

SUMMARY

Among actinomycetes, the *Streptomyces* genus is considered the “pharmacy” of nature, since most compounds of medical use as antibiotics, antifungal, antitumor, etc. are produced by this bacterial group. Traditionally considered soil bacteria, in the last years became evident the presence of streptomyces in marine ecosystems and associated to very diverse organisms, mainly sponges, seaweeds and corals. Given the different features between marine and terrestrial environments it is possible that marine streptomyces that we find here present different metabolic pathways which synthesize novel molecules for biomedical use. In this study we have analyzed the the streptomyces presence in two different environments, the intertidal zone in the Asturian coast, and in the coral reef of the Avilés Canyon. *Streptomyces* strains were found to be present in all samples collected in the intertidal zone, whereas 32 samples out of 90 specimens collected in the coral reef showed the presence of these bacteria. In total, 18 strains displaying different phenotypic, antibiotic activity and metabolic profile features were found to be associated to these organisms. Different antibiotic families as paulomycins, anthracyclines, lobophorines and maltophilins have been identified in some of them. These results show the need of going further in the study of compounds produced by this bacterial genus, and in the ecological implications of marine organisms-bacteria associations.

I. INTRODUCCIÓN

El *Phylum Actinobacteria* es uno de los más amplios dentro del Reino *Bacteriae*, son bacterias Gram-positivas con alto contenido en guanina-citosina (GC) (tienen un porcentaje en GC en su DNA mayor del 50-55%). Poseen un complejo ciclo de vida formando células filamentosas llamadas hifas. Esta red de hifas se ramifica tanto dentro del sustrato como en superficie. Las hifas del sustrato se pueden diferenciar en hifas de crecimiento ascendente, formando el micelio aéreo en el cual se formarán esporas (10).

Dentro de los actinomicetos el género *Streptomyces* es el más representativo, pertenecen a la familia *Streptomycetaceae* y son bacterias aerobias estrictas, quimio-organotrófas, con metabolismo de tipo oxidativo, catalasa positivos y cuyo complejo ciclo de vida puede relacionarse con el crecimiento micelial de los hongos (11).

Este género se encuentra ampliamente distribuido en el medio terrestre confiriendo el olor característico a tierra húmeda debido a la producción de un compuesto llamado geosmina el cual no tiene actividad antibiótica, pero su producción está

muy conservada en todas las especies de *Streptomyces*, por lo que debe de tener un papel muy importante para esta bacteria (9). Recientes estudios ponen en evidencia que esta bacteria no sólo se encuentra en hábitats terrestres, ya que se encuentra ampliamente distribuida en el medio marino tanto en la columna de agua, en los sedimentos marinos o asociados a diversos organismos, animales o vegetales (1).

Los *Streptomyces* tienen un papel ecológico muy importante en el ecosistema marino, ya que aparte de participar en la mineralización de la materia orgánica (2), muchas de estas bacterias se encuentran en simbiosis con diversos organismos marinos (vegetales y animales). Aunque la función biológica de esta simbiosis en muchos casos no está bien estudiada, ya que *Streptomyces* es una de las bacterias productoras de antibióticos más importantes se cree que la función de esta bacteria sería ofrecer al hospedador protección frente a organismos patógenos (9). El grupo de

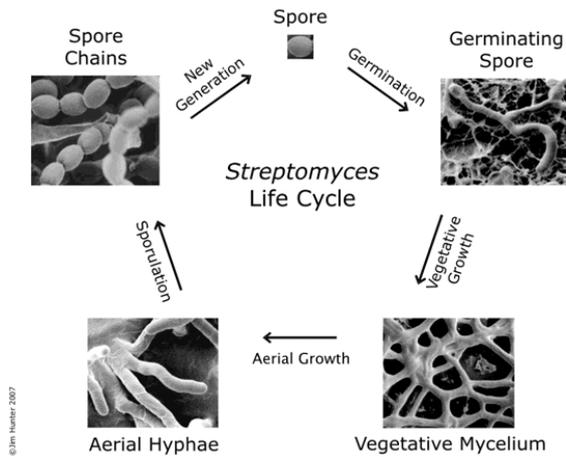


Figura 1. Ciclo de vida de los actinomicetos representado por el género *Streptomyces* (*Streptomyces* community at the University of East Anglia).

organismos marinos en el que más se han estudiado estas asociaciones es el de las esponjas y corales, pero dado que en ambientes terrestres se han encontrado asociaciones de *Streptomyces* con diversos artrópodos (avispa, hormiga y otros insectos) y vegetales (9), es posible que en el medio marino también se encuentren asociados a una amplia gama de grupos de invertebrados y vegetales.

Los actinomicetos tienen una gran importancia en medicina, ya que aproximadamente el 45% de los compuestos bioactivos procedentes de microorganismos provienen de este grupo y dentro de ellos el género *Streptomyces* produce el 80% de estos compuestos. Entre estos metabolitos encontramos compuestos antibióticos, antifúngicos, antitumorales antivirales y con otras funciones de gran interés para los humanos (3). En la actualidad debido a diversos inconvenientes como pueden ser los serios problemas que conlleva la quimioterapia, el incremento de la aparición de resistencias bacterianas a los antibióticos conocidos, la aparición de nuevos patógenos y otra serie de problemas, se requiere la aparición de nuevas sustancias bioactivas (3).

Actualmente la tasa de descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos en *Streptomyces* procedentes de ecosistemas terrestres ha decrecido, por eso es importante el estudio de la presencia de estos organismos en ecosistemas distintos a los terrestres (1). Aunque el aislamiento de *Streptomyces* y otros actinomicetos procedentes de fuentes marinas se conoce desde 1969, durante mucho tiempo se pensó que estos organismos no eran muy diferentes de sus congéneres terrestres y por tanto tenían un origen terrestre (4). Datos recientes sugieren que existen actinomicetos únicos adaptados a las condiciones del medio marino (5), el cual ofrece unas condiciones muy diferentes a las del medio terrestre, por tanto este medio y los organismos marinos ofrecen una fuente muy valiosa para el descubrimiento de nuevas moléculas bioactivas procedentes de *Streptomyces* (1).

La zona intermareal es un hábitat muy variable, ya que al estar sometida a la acción de las mareas la temperatura, salinidad, concentración de oxígeno y otras variables varían mucho a lo largo del tiempo. Trabajos previos han demostrado la existencia de poblaciones muy variadas de actinomicetos asociados a algas de la zona intermareal del Cantábrico (Blanco G., manuscrito en preparación).

El denominado Cañón de Avilés situado en el mar Cantábrico al sur de la Bahía de Vizcaya (noroeste de la Península Ibérica), es un valle sumergido que atraviesa transversalmente la plataforma y el talud, situándose de forma oblicua a la línea de costa a menos de 15 Km de ella. Es uno de los cañones más profundos del mundo,

avanzando desde los 140 metros sobre la plataforma, hasta los 4.750 metros en la base del talud y su anchura es de 32 Km. El cañón de Avilés presenta una gran diversidad en la comunidad bentónica, encontrando gran abundancia de especies de cnidarios formadoras de arrecifes de coral, (6). En recientes estudios realizados en el Mar de China y en el Golfo de Mannar, al sur de la India, se han encontrado actinomicetos asociados a diversas especies tanto de corales blandos (7) como corales duros (8). Debido a la gran riqueza biológica del Cañón de Avilés y a la presencia de diversas especies formadoras de arrecifes de coral (6), este medio ofrece un hábitat muy adecuado para explorar asociaciones entre estreptomicetos y organismos marinos.

En el presente trabajo se realizará un estudio de la presencia de *Streptomyces* en diversos organismos marinos, procedentes de dos hábitats diferentes: la zona intermareal de la costa asturiana y el arrecife coralino del Cañón de Avilés. Posteriormente con las cepas encontradas se realizará un análisis para determinar el tipo de sustancias bioactivas que producen.

Los objetivos de este trabajo son:

- 1) Confirmar la existencia de asociaciones de *Streptomyces* con distintos grupos de organismos marinos en ambos hábitats, intermareal y arrecife coralino.
- 2) La caracterización inicial de las cepas aisladas a partir de los organismos anteriormente mencionados.
- 3) El análisis de la producción de compuestos con actividad biológica producidos por las cepas de *Streptomyces* aisladas en estos organismos.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Recogida de muestras y procesamiento

2.1.1 Organismos de la zona intermareal

Se partió de cepas previamente aisladas de organismos recogidos en la playa de San Lorenzo (Gijón) durante los meses de Abril, Mayo y Junio del 2012 las cuales se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Códigos de las cepas encontradas en los organismos de la zona intermareal.

GRUPO TAXONÓMICO		AISLADO
División Chorophyta		
	<i>Codium tomentosum</i>	M-108 y M-109
División Rhodophyta		
	<i>Plocamium cartilagineum</i>	M-87
División Heterokontophyta		
	<i>Leathesia difformis</i>	M-64
Clase Cnidaria		
	<i>Aurelia aurita</i>	M-118
Clase Mollusca		
	<i>Gibbula umbilicalis</i>	M-100

2.1.2 Organismos del arrecife coralino

Los ejemplares analizados fueron recogidos durante la campaña BIOCANT 3 que fue realizada del 28/04/2013 al 04/05/2013 en el Cañón de Avilés. Los organismos fueron recogidos a distintas profundidades 1500, 1800, 2000 y 4700 m, con distintos tipos de redes:

- Agassiz: Red utilizada para muestrear organismos bentónicos
- Mocness: Red utilizada para muestrear mesozooplankton
- iKMT: Red utilizada para muestrear macrozooplankton

En la Figura 1 de la sección Anexos se muestra un mapa con la situación de las estaciones de muestreo.

Todos los organismos fueron recogidos individualmente con guantes estériles desechables y posteriormente se lavaron 3 veces con agua de mar estéril, para eliminar los posibles contaminantes que pudieran haber contraído durante su recogida en la red.

Los organismos que poseían estructuras duras fueron troceados con la ayuda de un martillo, mientras que los organismos con estructuras blandas fueron troceados con un bisturí, en ambos casos esterilizados previamente con etanol. Estas muestras

orgánicas se pasaron a un tubo Falcon y se añadió 1 ml de agua de mar estéril, posteriormente se agitaron durante varios minutos con la ayuda de un agitador de tubos (Vortex), para su posterior análisis.

2.2 Medios de cultivo

2.2.1 Medios de cultivo para *Streptomyces*

- Medio R5A (Fernández et al., 1998): Medio de cultivo utilizado para la producción de compuestos bioactivos. Composición: sacarosa (103 gr/l), K_2SO_4 (0.25 gr/l), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (10.12 gr/l), glucosa (10 gr/l), casaminoácidos (0.1 g/l), extracto de levadura (5gr/l) MOPS (21 gr/l), oligoelementos (2ml/l), agar (22 gr/l), pH=6.85.

Medio R5A-marino: Composición igual al anterior pero preparado con agua marina estéril.

- Medio GHSA (Braña, comunicación personal): Medio de cultivo utilizado para la producción de compuestos bioactivos. Composición: MOPS (21 gr/l), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.6 gr/l), extracto de levadura (0.5 gr/l), glucosa (10 gr/l), harina de soja (10 gr/l), oligoelementos (2 ml/l), agar (22 gr/l). Después de autoclavar añadir: $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 5M (4 ml/l) pH=6.75, estéril.

- Medio GAE (Braña, comunicación personal): Medio de cultivo para la producción de compuestos bioactivos. Composición: Glucosa (10 gr/l), extracto de levadura (0.5 gr/l), asparragina (1 gr/l), agar (22 gr/l). Después de autoclavar añadir: K_2HPO_4 10% (5 ml/l), $MgSO_4$ 10% (5 ml/l), $FeSO_4$ 0.2% (5 ml/l), estéril.

- Medio BLED (casa comercial OXOID CM1071): Medio de cultivo de selección utilizado para el crecimiento de *Streptomyces*, al cual se añaden 80µg/ml de cicloheximida (antifúngico) y 20µg/ml de ácido nalidíxico (antibiótico frente a Gram-negativas).

- Medio TSA (Triphone Soya Broth, casa comercial Merck): Medio de cultivo de selección utilizado para el crecimiento de *Streptomyces* al cual se añaden 80µg/ml de cicloheximida (antifúngico) y 20µg/ml de ácido nalidíxico (antibiótico frente a Gram-negativas).

Medio TSA-marino: Medio de la misma casa comercial que el anterior pero preparado con agua marina estéril.

2.2.2 Otros medios de cultivo

- Medio TSA 1/2. Medio utilizado para el cultivo de *Escherichia coli* y *Micrococcus luteus*
- Medio Saboraud (casa comercial Sabouraud Dextrose Agar, Difco) Medio utilizado para el cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*

2.3 Aislamientos en medios selectivos

Se sembró un volumen de 200 μ l procedentes de los tubos Falcon con las muestras procesadas en medio TSA, TSA-marino y BLED. Estas placas se incubaron incubando a 28°C durante al menos una semana. Pasados los días de incubación se observaron al microscopio óptico y lupa las colonias con aspecto de actinomiceto y se anotaron como muestras positivas aquellas en las que se observaba la estructura característica de estas bacterias. Se anotaron el número de colonias en esta placa inicial, y su fenotipo.

Posteriormente se sembraron en R5A y R5A-marino por sectores varios tipos de las colonias observadas inicialmente y se incubaron durante 5 días a 28°C. Pasados estos días se procedió a seleccionar las cepas con distinto fenotipo procedentes de los sectores y asignarles un código. Para definir las distintas cepas se utilizó inicialmente la descripción de la colonia: color del micelio sustrato, color del micelio aéreo y producción de pigmento.

Las siembras fueron realizadas bajo condiciones de esterilidad utilizando una campana de flujo laminar.

2.4 Ensayos de actividad antimicrobiana

2.4.1 Microorganismos utilizados como cepas reveladoras

- *Micrococcus luteus*
- *Escherichia coli*
- *Saccharomyces cerevisiae*

2.4.2 Análisis de la producción de compuestos antimicrobianos mediante bioensayos

Los bioensayos se realizaron al 5^o día de incubación de las cepas.

- Bioensayos mediante bloques de agar.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

Con la ayuda de una punta de micropipeta se extraen bloques de agar directamente de la zona de crecimiento, y se depositan en las placas con las cepas reveladoras. Las placas con los bioensayos se incuban durante un día a 28°C la cepa de *S. cerevisiae* y a 37°C las cepas de *M. luteus* y *E. coli* y posteriormente se midió el diámetro del halo de inhibición de crecimiento de la cepa reveladora alrededor del bloque de agar.

Mediante esta técnica se analizan todos los compuestos presentes en la colonia.

– Extracciones de compuestos antimicrobianos

Previo a los bioensayos con discos antibiograma se realiza una extracción de los compuestos con actividad antimicrobiana, en este caso solo se extraerán los compuestos con carácter hidrofóbico.

Esta extracción se realizó por un lado, en condiciones neutras y por otro lado en condiciones ácidas, para ello se tomó aproximadamente la mitad de la zona de crecimiento de las colonias cultivadas en los medios de producción, colocando estos extractos en dos tubos Falcon. En uno de estos tubos se añadieron 3 ml de acetato de etilo, mientras que en el otro se añadieron 3 ml de acetato de etilo con 1% ácido fórmico.

Los tubos Falcon con los extractos se mantuvieron en agitación durante 45 minutos, después de este tiempo se tomó 2 ml de cada tubo, este volumen se traspasó a 2 tubos eppendorf diferentes y posteriormente se evaporó en una centrífuga acoplada a una bomba de vacío (Speed-Vac) obteniendo así el extracto seco. Se obtiene así 4 extractos de cada cepa, 2 extraídas en condiciones neutras y 2 extraídas en condiciones ácidas. Este extracto seco se conservó a 4°C.

Una parte de los extractos se utilizó para los bioensayos con discos antibiograma y la otra parte se conservó para la identificación de los compuestos antibióticos mediante UPLC.

– Bioensayos mediante discos antibiograma

Para la realización de los bioensayos se resuspendieron los extractos secos añadiendo 70 µl de DMSO•MeOH y posterior agitación durante 5 min. Después se inocularon 15 µl de cada uno de los extractos en discos antibiograma y se colocaron sobre placas con las 3 cepas reveladoras e incubaron en las mismas condiciones que

II. MATERIAL Y MÉTODOS

los bioensayos con bloques de agar. Posteriormente se midió el halo de inhibición de crecimiento de la cepa reveladora alrededor de los discos antibiograma.

Este análisis es complementario al bioensayo mediante bloques de agar, ya que es posible detectar actividades que no se detectaron en el anterior análisis debido a la mayor concentración de los compuestos, aunque solo detectarían aquellos compuestos hidrofóbicos extraíbles con acetato de etilo.

2.5 Identificación de los compuestos antibióticos mediante UPLC

Para analizar los posibles compuestos con actividad antibiótica, se realizó una UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*, cromatografía líquida de alto rendimiento). Se utilizó un equipo *Acquity (Waters)*, con una columna BEH c18 de tamaño 2,1x100 mm y tamaño de partícula de 1,7 µm. Las condiciones se indican a continuación:

Tiempo (minutos)	0-1	2-8	8-10
Eluyente	10% acetonitrilo: 90% ácido trifluoroacético	Paso de los extractos en las mismas condiciones	100% acetonitrilo para eluir los compuestos retenidos

El software utilizado es el programa *Empower (Waters)*, que permite obtener un perfil con todos los compuestos detectados en todas las longitudes de onda (MaxPlot).

2.6 Conservación de las esporas

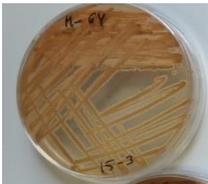
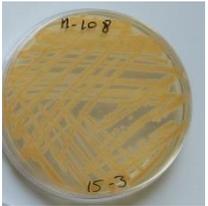
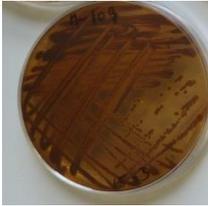
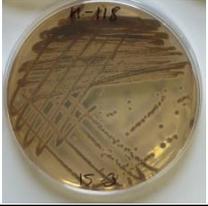
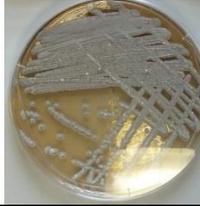
Para la conservación de los cultivos se recogerán las esporas a partir de cultivos en medio sólido conservándose en glicerol al 20%, y almacenándose a -20°C.

III. RESULTADOS

3.1 Aislamiento de especies *Streptomyces* a partir organismos de la zona intermareal

Las cepas previamente aisladas de los organismos de la zona intermareal, se resembraron en R5A, para hacer una descripción en detalle de su fenotipo, Tabla 2.

Tabla 2: Descripción fenotípica de las cepas de *Streptomyces* encontradas en los organismos de la zona litoral.

Cepa tipo	FENOTIPO		
	Color del micelio	Color de las esporas	Pigmento
M-64	Marrón 	Crema 	-
M-87	Naranja 	Rosado 	-
M-100	Gris/verdoso 	Gris 	Verdoso
M-108	Melocotón 	Melocotón 	-
M-109	Marrón 	Crema 	Cobrizo
M-118	Marrón oscuro 	Gris oscuro 	Marrón

-, sin pigmento

III. RESULTADOS

3.1.1 Producción de antibióticos en distintos medios de cultivo

Para los bioensayos se probaron en este caso tres medios de producción diferentes: R5A, GHSA y GAE, estos resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Actividad antimicrobiana medida mediante el diámetro (en mm) del halo de inhibición de crecimiento de las cepas reveladoras, producido por las cepas de *Streptomyces* asociadas a los organismos de la zona intermareal.

CEPA TIPO	MEDIO		Diámetro del halo de inhibición de crecimiento en las 3 cepas reveladoras		
			<i>M. luteus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>
M-64	R5A	B. A.	20	-	-
		D. A. (N/Ac)	-/-	-/-	-/-
	GHSA	B. A.	16	-	-
		D. A. (N/Ac)	-/-	-/-	-/-
	GAE	B. A.	22	-	-
		D. A. (N/Ac)	7/-	-/-	-/-
M-87	R5A		11	-	-
			11/9	-/-	-/-
	GHSA		11	-	-
			9/8	-/-	-/-
	GAE		-	-	-
			9/7	-/-	-/-
M-100	R5A		-	-	-
			-/-	-/-	-/-
	GHSA		-	-	-
			-/-	-/-	-/-
	GAE		-	-	-
			-/-	-/-	-/-
M-108	R5A		11	-	-
			9/8	-/-	-/-
	GHSA		-	-	-
			-/-	-/-	-/-
	GAE		-	-	-
			-/-	-/-	-/-

(Continúa)

III. RESULTADOS

Tabla 1 (Cont.): Actividad antimicrobiana medida mediante el diámetro (en mm) del halo de inhibición de crecimiento de las cepas reveladoras, producido por las cepas de *Streptomyces* asociadas a los organismos de la zona intermareal.

CEPA TIPO	MEDIO	Diámetro del halo de inhibición de crecimiento en las 3 cepas reveladoras		
		<i>M. luteus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>
M-109	R5A	11	-	-
		8/11	-/-	-/-
	GHSA	11	-	-
		8/10	-/-	-/-
	GAE	15	-	-
		8/8	-/-	-/-
M-118	R5A	-	-	15
		10/9	-/8	18/13
	GHSA	-	-	19
		7/8	-/-	12/8
	GAE	-	-	-
		-/19	-/10	-/14

B. A.: Bloques de Agar; D. A.: Discos Antibiograma; N: neutras; A: ácidas; -, sin halo.

La mayor parte de cepas mostraron actividad frente alguno de los 3 organismos, fundamentalmente frente a *M. luteus*. Las cepas sembradas en R5A, presentaron siempre algún tipo de actividad antimicrobiana, excepto la cepa M-100, la cual no presenta actividad en ninguno de los 3 medios utilizados, por tanto, a tenor de estos resultados, será el medio R5A el utilizado en posteriores bioensayos.

En todos los extractos procedentes de las cepas se encuentran compuestos de distintas familias de antibióticos pero hasta el momento no han podido ser identificados.

3.2 Aislamiento de especies de *Streptomyces* a partir de los organismos del arrecife coralino del Cañón de Avilés

3.2.1 Presencia de *Streptomyces* en los ejemplares procedentes de las distintas estaciones muestreadas

El medio TSA fue el que presentó un mejor resultado, ya que fue aquí en donde se encontraron la mayor parte de colonias de actinomicetos.

La Tabla 1 recogida en la sección Anexos, muestra todos los ejemplares recogidos durante la campaña BIOCANT 3 y en cuales se ha detectado la presencia de actinomicetos. De las 94 muestras recogidas (entre las que se encuentran 4

III. RESULTADOS

muestras de agua a distintas profundidades) se ha detectado la presencia del género *Streptomyces* en 32 de ellas (Figuras 2 a 32 de la sección Anexos).

En la Figura 2 se muestra el porcentaje de organismos en los que se aislaron estreptomicetos en las distintas estaciones muestreadas ordenadas de las menos profundas a las más profundas.

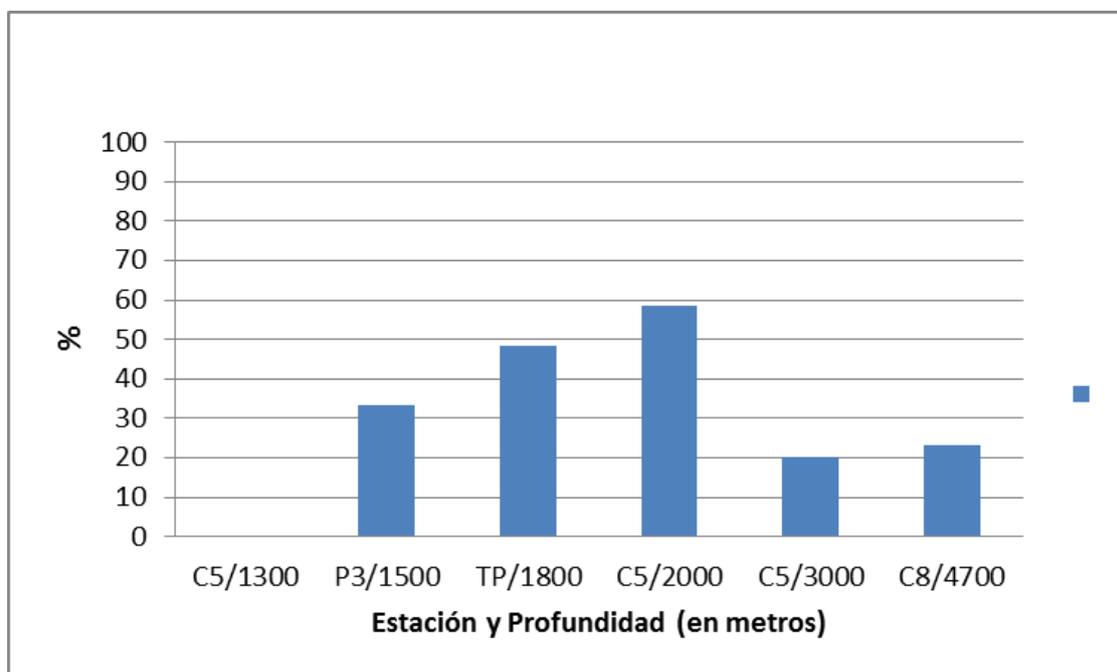


Figura 2: Porcentaje de organismos en los que se detectó presencia de *Streptomyces* en las diferentes estaciones muestreadas.

3.2.2 Cepas de *Streptomyces* encontradas en los diferentes organismos

De los dos medios de cultivo, utilizados para el aislamiento de las distintas colonias encontradas, el medio R5A fue en dónde se obtuvieron mejores resultados.

De los 32 ejemplares en los que se encuentra presencia de estreptomicetos, el grupo de los cnidarios es el que presenta un mayor número de positivos con 14 ejemplares, seguido del grupo equinodermos, con 7 positivos y el de los poliquetos con 3 positivos. El resto de los grupos solo presenta un ejemplar positivo por taxón. Se han encontrado 12 fenotipos distintos de cepas de estreptomicetos entre los organismos muestreados y 2 fenotipos en la muestra de agua de 3000 m. El número inicial de colonias varía mucho entre los distintos ejemplares, yendo desde más de 400 en algún tipo de coral a solo 1 o 2 en otros organismos. Estos resultados se recogen en la Tabla 4.

III. RESULTADOS

La Tabla 5 muestra la distribución de las cepas en función de la profundidad a la que se encontraba la estación. Las cepas encontradas a todas las profundidades muestreadas son la "Beige", la "Verde" y la cepa "Naranja/Rojo". Las cepas "Marrón", "Melocotón", "Terracota", "Azul marino", "Marrón/negro", "Amarillo", "Dorado" y "Crema" solamente se encuentran a una profundidad determinada.

Las cepas denominadas "Beige", "Naranja" y "Verde", son las que aparecen con mayor frecuencia en los diferentes organismos, mientras que las cepas denominadas "Marrón", "Melocotón", "Rojo intenso", "Marrón oscuro", "Gris" y "Blanco", sólo se encuentran en un único ejemplar cada una, datos mostrados en la Tabla 6.

III. RESULTADOS

Tabla 4 : Número inicial de colonias de *Streptomyces* encontradas en los diferentes ejemplares muestreados clasificadas según su fenotipo

TAXÓN	FENOTIPO DE LAS CEPAS													
	Marrón	Beige	Naranja/Rojo	Melocotón	Verde	Terracota	Azul marino	Marrón/Negro	Amarillo	Rojo	Gris	Blanco	Dorado	Crema
F. Poríferos														
76 Porífero	-	-	-	-	1	7	-	-	-	-	-	-	-	-
F. Cnidarios														
8 <i>P. periphyla</i>	-	2	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14 Coral	1	4	2	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30 Coral	-	3	5	2	2	-	-	-	16	-	-	-	-	-
31γ Coral	-	-	250	-	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32 Coral	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33 Coral	-	-	-	-	-	-	-	-	150	-	-	-	-	-
51 <i>P. periphyla</i>	-	3	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52 Actinia	-	-	400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
58A Gorgonia	-	-	400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
59 Coral	-	3	5	-	38	-	3	2	-	-	-	-	-	-
61 Coral	-	-	-	-	-	-	-	-	-	400	-	-	-	-
62 Coral	-	4	-	-	27	-	-	-	-	-	-	-	-	-
64 Gorgonia	-	-	-	-	10	-	4	-	-	-	-	-	-	-
66A Coral	-	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
79 Actinia	-	2	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. Sipuncúlidos														
12 <i>Sipunculus sp</i>	-	2	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
F. Moluscos														
15 Escafópodo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16	-	-	-	-

(Continúa)

III. RESULTADOS

Tabla 4 (Cont.) : Número inicial de colonias de *Streptomyces* encontradas en los diferentes ejemplares muestreados clasificadas según su fenotipo

TAXÓN	FENOTIPO DE LAS CEPAS													
	Marrón	Beige	Naranja/Rojo	Melocotón	Verde	Terracota	Azul marino	Marrón/Negro	Amarillo	Rojo	Gris	Blanco	Dorado	Crema
F. Anélidos														
17 Tubo vacío de poliqueto	-	-	-	-	1	-	-	-	-	12	-	-	-	-
31β Poliqueto	-	350	-	-	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
70 Poliqueto tubícula	-	3	12	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. Artrópodos														
16 Cirrípedo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-
20 <i>Stereomastis sp</i>	-	2	-	-	-	-	-	-	-	14	-	-	-	-
56 Decápodo	-	3	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. Equinodermos														
13 <i>Hedingia sp</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37 <i>Ceramaster sp</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	27	-	-	-	-	-
58B Ofiuroides	-	-	400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63 Ofiuroides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	70	-	-	-
72 Ofiuroides	-	5	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
73 Asteroideo	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
87 Ofiuroides	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. Cordados														
4 <i>A. hemygymus</i>	-	2	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Agua 3000 m.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	4

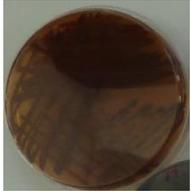
III. RESULTADOS

Tabla 5 : Presencia de las cepas de *Streptomyces* en diferentes profundidades

Prof.	Cepas													
	Marrón	Beige	Naranja/rojo	Melocotón	Verde	Terracota	Azul marino	Marrón/negro	Amarillo	Rojo	Gris	Blanco	Dorado	Crema
1500	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
1800	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-
2000	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
3000	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
4700	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Prof., profundidad en metros; +: presencia, -: no presencia

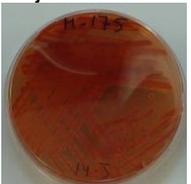
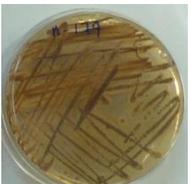
Tabla 6: Descripción fenotípica de las diferentes cepas de *Streptomyces* asociadas a los organismos del arrecife coralino

Cepa Tipo	Fenotipo			Aislados similares y ejemplares en donde se encuentran
	Color del micelio	Color de las esporas	Pigmento	
M-157	Marrón 	Cobrizo 	Cobrizo	14.Coral
M-166	Beige 	Beige 	-	30.Coral; M-150 4. <i>Argyropelecus hemygymus</i> ; M-152 8. <i>P. periphyla</i> ; M-154 12. <i>Sipunculus sp.</i> ; M-156 13. <i>Hedingia sp.</i> ; M-161 14.Coral; M-165 20. <i>Stereomastis sp.</i> ; M-171 51. <i>P. periphyla</i> ; M-173 56.Decápodo; M-182 y M-225 66.Coral; M-183 72.Ofiuroides; M-187 59.Coral; M-196 62.Coral; M-208 87.Ofiuroides; M-210 70.Poliqueto; M-212 73.Asteroideo; M-215 79.Actinia; M-220 31β.Poliqueto

Continúa

III. RESULTADOS

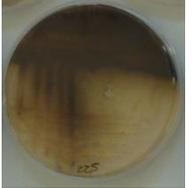
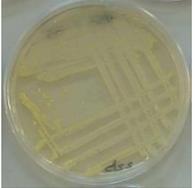
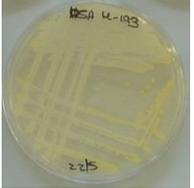
Tabla 6 (Cont.): Descripción fenotípica de las diferentes cepas de *Streptomyces* asociadas a los organismos del arrecife coralino

Cepa Tipo	Fenotipo		Pigmento	Aislados similares y ejemplares en donde se encuentran
	Color del micelio	Color de las esporas		
M-167	Naranja 	Rosado 	Naranja	30.Coral; M-158 y M-160 14.Coral; M-174 58A.Gorgonia; M-176 58B.Ofiuroideo; M-180 y M-181 70.Poliqueto; M-189 59.Coral; M-192 52.Actinia; M-222 31.Coral
M-169	Melocotón 	Melocotón transparente 	Melocotón	30.Coral
M-175	Rojo intenso 	Rosado 	Rojo	58A.Gorgonia
M-178	Terracota 	Blanco 	Anaranjado	76.Porífero; M-155 12. <i>Sipunculus sp.</i>
M-179	Verde 	Verdoso 	Verde	70.Poliqueto; M-151 4. <i>A. hemygymus</i> ; M-153 8. <i>P. periphyla</i> ; M-159 14.Coral; M-162 y M-163 14.Coral; M-164 17.Tubo de poliqueto; M-168 30.Coral; M-170 51. <i>P. periphyla</i> ; M-172 56.Decápodo; M-177 76.Porífero M-184 64.Gorgonia; M-188 59.Coral; M-195 y M-206 62.Coral; M-205 59.Coral; M-209 87.Ofiuroideo; M-211 73.Asteroideo; M-218 32.Coral; M-219 72.Ofiuroideo; M-221 31β.Poliqueto; M-223 31.Coral; M-224 70.Poliqueto

Continúa

III. RESULTADOS

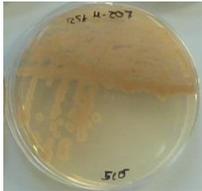
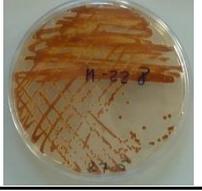
Tabla 6 (Cont.): Descripción fenotípica de las diferentes cepas de *Streptomyces* asociadas a los organismos del arrecife coralino

Cepa Tipo	Fenotipo		Pigmento	Aislados similares y ejemplares en donde se encuentran
	Color del micelio	Color de las esporas		
M-185	Azul marino 	Blanco azulado 	Azul marino	64.Gorgonia; M-191 59.Coral
M-186	Marrón oscuro 	Gris 	Marrón oscuro	59.Coral
M-193	Amarillo limón 	Amarillo 	-	37. <i>Ceramaster</i> sp.; M-199 30.Coral; M-201 33.Coral
M-194	Rojo 	Rojo oscuro 	-	61.Coral; M-197 17.Tubo de poliqueto; M-200 20. <i>Stereomastis</i> sp.; M-202 15.Escafópodo; M-203 16.Cirrípedo
M-204	Gris 	Gris 	-	63.Ofiuroideo

Continúa

III. RESULTADOS

Tabla 6 (Cont.): Descripción fenotípica de las diferentes cepas de *Streptomyces* asociadas a los organismos del arrecife coralino

Cepa Tipo	Fenotipo		Pigmento	Aislados similares y ejemplares en donde se encuentran
	Color del micelio	Color de las esporas		
M-207	Blanco	Blanco	-	66.Coral
				
M-227	Marrón rojizo	Crema dorado	Bronce	Control de agua a 3000 m de profundidad
				
M-228	Ocre	Crema	-	Control de agua a 3000 m de profundidad
				

-, sin producción de pigmento

III. RESULTADOS

3.2.3 Ensayos de actividad antimicrobiana

La Tabla 7 recoge los resultados de actividad antimicrobiana de las distintas cepas.

Tabla 7: Actividad antimicrobiana medida mediante el diámetro (en mm) del halo de inhibición de crecimiento de las cepas reveladoras, producido por las cepas de *Streptomyces* asociadas a los organismos del arrecife coralino

CEPA TIPO		Diámetro del halo de inhibición de crecimiento en las 3 cepas reveladoras		
		<i>M. luteus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>
M-157	B. A.	30	22	-
	D. A. (N/Ac)	24/29	19/28	-/16
M-166		27	-	-
		27/22	-/-	-/-
M-167		26	20	-
		24/22	18/14	-/-
M-169		11	15	-
		8/	8/8	-/-
M-175		20	20	-
		21/21	16/15	-/-
M-177		-	-	-
		-/-	-/-	-/11
M-178		-	-	-
		-/-	-/-	-/-
M-179		15	-	-
		23/23	-/-	-/11
M-185		15	-	-
		11/12	-/-	-/-
M-186		11	-	-
		-/-	-/-	-/-
M-193		-	-	-
		-/12	-/16	-/11
M-194		-	-	-
		-/17	-/18	-/12
M-204		13	-	12
		11/11	-/-	20/20
M-207		30	12	-
		33/21	-/20	-/15
M-227		30	23	-
		25/23	20/25	-/16
M-228		15	-	-
		-/10	-/16	-/13

B. A.: Bloques de Agar; D. A.: Discos Antibiograma; N: neutras; A: ácidas; -, sin halo.

III. RESULTADOS

. Dentro del fenotipo “Verde” hay diversidad en cuanto a la producción de compuestos antimicrobianos. La cepa M-177, no presenta actividad frente a *M. luteus*, mientras que la cepa M-179 si presenta actividad.

Todas las cepas presentan actividad frente a los 3 microorganismos reveladores excepto la cepa “Terracota” (M-178) y un grupo dentro de cepa “Verde” (M-177), las cuales no presentan actividad frente a ninguno de los microorganismos. En todos los casos en donde se detectó actividad antibiótica también se pudo extraer alguno de los compuestos responsables de esta actividad, excepto en cepa “Marrón/negro” (M-186).

3.2.4 Antibióticos y antitumorales identificados

Mediante técnicas de cromatografía de UPLC se han podido llegar a identificar algunos de los compuestos antibióticos procedentes de tres de las cepas, en los demás casos se observa también la presencia de gran número de metabolitos secundarios pero éstos no se han podido llegar a identificar en búsquedas preliminares. Estos compuestos y las cepas de dónde provienen se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: Compuestos antibióticos identificados en cepas de *Streptomyces* aisladas de los organismos del arrecife coralino

CEPA TIPO	COMPUESTOS
“Beige” M-166	Loboforinas
“Naranja” M-167	Antraciclinas y maltofilinas
“Verde” M-179	Paulomicinas, maltofilinas, antimicinas y polienos

IV. DISCUSIÓN

4.1 Distribución de *Streptomyces* en los diferentes organismos marinos

En este trabajo se analizaron las poblaciones de *Streptomyces* asociadas a organismos marinos del hábitat intermareal y de arrecife coralino del Cañón de Avilés.

Las estaciones situadas a mayor profundidad, C5/3000 y C8/4700, muestran menor proporción de organismos con asociación de estreptomicetos, esto puede deberse a que las condiciones de temperatura limiten el crecimiento de estas bacterias. El caso de la estación C5/1300, es posible que no se detectara ningún positivo debido a que los ejemplares muestreados pertenecen todos al grupo de los teleósteos, y no hay ningún ejemplar de invertebrado bentónico que es en el grupo en el cual se han localizado mayor número de positivos.

De las muestras de agua de mar recogidas a diferentes profundidades fueron analizados inicialmente 3 ml de cada una y no se encontraron cepas de *Streptomyces* a excepción de la muestra de agua recogida a 3000 m. estas cepas son diferentes a las encontradas en el resto de organismos marinos. Estos resultados sugieren que las cepas que describimos en el presente trabajo no provendrían de la columna de agua, sino que estarían asociadas a los invertebrados marinos, ya sea de manera temporal o permanente.

En los casos en los que el número de colonias iniciales en los aislamientos a partir de los organismos marinos es muy elevado, mayor de 100, por lo general sólo se encuentran una o dos cepas, lo que sugiere una asociación más estrecha entre el invertebrado y la bacteria; en cambio en los casos en los que el número inicial de colonias es muy bajo, 1 o 2, no podemos afirmar que la cepa de *Streptomyces* esté asociada de una manera permanente con el organismo correspondiente.

De todos los grupos en los que se ha detectado la presencia de *Streptomyces*, el que mayor número de positivos ha dado ha sido el grupo de los corales, en dónde también encontramos números elevados de colonias iniciales, siendo esto acorde con estudios previos en los cuales se había detectado la presencia de diversos actinomicetos en gorgonias y corales tanto duros como blandos (7, 8). Además en este trabajo encontramos la presencia de esta bacteria también asociada a corales solitarios. Los posibles beneficios de la asociación de estreptomicetos con estos organismos marinos está siendo estudiada siendo la hipótesis de protección frente a patógenos y depredadores la más aceptada (8, 9) .

Otro taxón en el cual se han encontrado diversos ejemplares positivos y con gran número inicial de colonias es en el de los ofiuroideos, esto puede ser debido a que estos invertebrados se encuentran muchas veces agarrados con gran firmeza en las gorgonias, por ejemplo en caso de 58A-Gorgonia y 58B-Ofiuroideo, en el que se encuentran las mismas cepas y en proporción similar. En cambio un resultado interesante es el del 31 β -Poliqueto y 31 γ -Coral. Estos dos organismos se encontraban juntos en el muestreo (el poliqueto se encontraba enrollado sobre el eje del coral), pero a pesar de ello, presentan cepas de estreptomicetos diferentes, esto apunta a una especificidad en la asociación entre la bacteria e invertebrado correspondiente.

4.2 Cepas de *Streptomyces* aisladas

De las cepas encontradas en los organismos del arrecife coralino, las denominadas “Beige”, “Verde” y “Naranja”, son las más extendidas entre los diferentes invertebrados, encontrándolas también en la mayoría de las profundidades muestreadas. Aislados de estas mismas cepas fueron encontrados en algas del intermareal, en las playas de la localidad asturiana de Gijón, analizadas en un trabajo previo (Blanco G., manuscrito en preparación). El Cañón de Avilés difiere mucho con la zona intermareal en cuanto a las condiciones abióticas se refiere, mientras que el primero es un hábitat estable, la zona intermareal, está sometida a la influencia de las mareas, y por tanto es un medio en donde las condiciones ambientales varían mucho a lo largo del tiempo. El encontrar aislados de las mismas cepas en ambos hábitats pone de manifiesto la gran capacidad de este género para colonizar ambientes muy diversos.

Entre los 1800 y 2000 m de profundidad encontramos a 11 de las 14 cepas, siendo ésta la zona muestreada de mayor diversidad dentro del género. Este hecho, a falta de una exploración más exhaustiva del Cañón de Avilés, puede deberse a que esta bacteria sea aerobia estricta, ya que en la columna de agua existen dos máximos de concentración de oxígeno, uno se encuentra en superficie mientras que el segundo de ellos se encuentra, a mayor profundidad, en el caso del mar Cantábrico, a unos 1500 m . Esta profundidad coincide con la zona de mayor diversidad de cepas encontradas en el trabajo.

Las características morfológicas observadas al microscopio de las cepas encontradas concuerdan con las características morfológicas del género *Streptomyces*, excepto la cepa denominada “Rojo”, la cual presenta una morfología característica del género *Micromonospora* , otro género dentro del grupo de los actinomicetos que también es productor de antibióticos.

A pesar de que algunas de las cepas encontradas en los organismos de la zona intermareal comparten características fenotípicas similares con los aislados encontrados en los invertebrados del Cañón de Avilés, como la cepa M-118 y M-204 (ambas con micelio de color gris) los resultados obtenidos tras los bioensayos sugieren que se tratan de cepas diferentes o bien la misma cepa que en función del hábitat produce diferentes compuestos.

La cepa "Rojo intenso" tiene un fenotipo y una actividad antimicrobiana muy similares a la cepa denominada "Naranja" y al comparar el perfil metabólico obtenido al realizar el análisis con UPLC, se observó que éste es similar, por lo tanto es posible que estas dos cepas con un fenotipo ligeramente diferente pertenezcan a la misma especie de *Streptomyces*.

En cualquier caso es necesaria una identificación de los aislados mediante una secuenciación del RNA16S para la confirmación de estas últimas hipótesis.

4.3 Compuestos antibióticos producidos por las diferentes cepas

Las cepas denominadas "Verde", "Beige" y "Naranja" descritas en este trabajo son similares a cepas previamente aisladas a partir de algas intermareales en un trabajo previo (Blanco, G., manuscrito en preparación). La cepa "Verde" produce paulomicinas, antibióticos frente a Gram-positivas y a clamidias, también varios antifúngicos miembros de la familia de las maltofilinas y de la familia de las antimicinas y por último polienos tipo candicidina. La cepa "Naranja" produce diferentes compuestos miembros de la familia de las antraciclinas que son antibióticos con actividad antitumoral y extractos de estas cepas presentan fuertes actividades citotóxicas frente a diferentes líneas celulares, también producen varias maltofilinas, al igual que la cepa "Verde". La cepa denominada "Beige" sintetiza varios compuestos miembros de la familia de las lobofoquinas los cuales tienen actividad antiinflamatoria, recientemente se ha descubierto que estos compuestos tienen propiedades antituberculosas, esta cepa también produce germicidinas compuestos importantes en la germinación de las esporas de los estreptomicetos.

El hecho de que solo se hayan identificado 6 compuestos con actividades antibióticas puede ser debido a que la base de datos a la que se tiene acceso para análisis preliminares, sea reducida y por tanto no mostraría alguno de los compuestos encontrados, o bien debido a que son compuestos completamente nuevos y por tanto todavía no se encuentren registrados en ninguna base de datos.

Este trabajo abre la puerta a estudios más a fondo para poder purificar e identificar los compuestos más relevantes producidos por las cepas de *Streptomyces* procedentes de los dos hábitats marinos estudiados, la zona intermareal y el arrecife coralino.

V. CONCLUSIONES

- 1) La existencia de determinadas cepas ubicuas en cuanto a su distribución en hábitats de la zona intermareal y del arrecife coralino del Cañón de Avilés.
- 2) Los *Streptomyces* se encuentran asociados principalmente a corales, gorgonias y algas y también a otros grupos de invertebrados marinos como las ofiuras.
- 3) La necesidad de profundizar en el estudio de la extraordinaria diversidad de compuestos bioactivos producidos por las especies de este género y por tanto la posibilidad de descubrir cepas productoras de nuevos compuestos de interés farmacológico.
- 4) Es necesario profundizar en el estudio de las asociaciones establecidas entre los *Streptomyces* y los diferentes organismos marinos para determinar sus implicaciones ecológicas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Dharmaraj S. Marine streptomyces as a novel source of bioactive substances. *World J Microbiol Biotechnol.* 2010 DEC;26(12):2123-39.
2. Subramani R, Aalbersberg W. Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiol Res.* 2012;167(10):571-80.
3. Berdy J. Bioactive microbial metabolites - A personal view. *J Antibiot.* 2005 JAN;58(1):1-26.
4. Zotchev SB. Marine actinomycetes as an emerging resource for the drug development pipelines. *J Biotechnol.* 2012 APR 30;158(4):168-75.
5. Jensen P, Gontang E, Mafnas C, Mincer T, Fenical W. Culturable marine actinomycete diversity from tropical pacific ocean sediments. *Environ Microbiol.* 2005 JUL;7(7):1039-48.
6. Louzao M, Anadon N, Arrontes J, Alvarez-Claudio C, Maria Fuente D, Ocharan F, et al. Historical macrobenthic community assemblages in the aviles canyon, N iberian shelf: Baseline biodiversity information for a marine protected area. *J Mar Syst.* 2010 FEB 20 2010;80(1-2):47-56.
7. Sun W, Peng C, Zhao Y, Li Z. Functional gene-guided discovery of type II polyketides from culturable actinomycetes associated with soft coral scleronephthya sp. *Plos One.* 2012 AUG 7 2012;7(8):e42847.
8. Nithyanand P, Manju S, Pandian SK. Phylogenetic characterization of culturable actinomycetes associated with the mucus of the coral acropora digitifera from gulf of mannar. *FEMS Microbiol Lett.* 2011 JAN 2011;314(2):112-8.
9. Seipke RF, Kaltenpoth M, Hutchings MI. Streptomyces as symbionts: An emerging and widespread theme? *FEMS Microbiol Rev.* 2012 JUL;36(4):862-76.
10. Willey J, Sherwod L., Woolverton C. *Microbiología de Prescott, Harley y Kley*, 7ª Ed. McGraw-Hill-Interamericana de España, SAU. 2009; 589-600.
11. Sialer Guerrero, CA. 2011. Aislamiento y caracterización de actinomicetos asociados a hormigas de la tribu Attini. Tesis doctoral.
12. Streptomyces community at the University of East Anglia.
http://streptomyces.openwetware.org/Other_Bits/An_Introduction_to_Streptomyces.html.

<Consultado: 24/04/2013>

ANEXOS

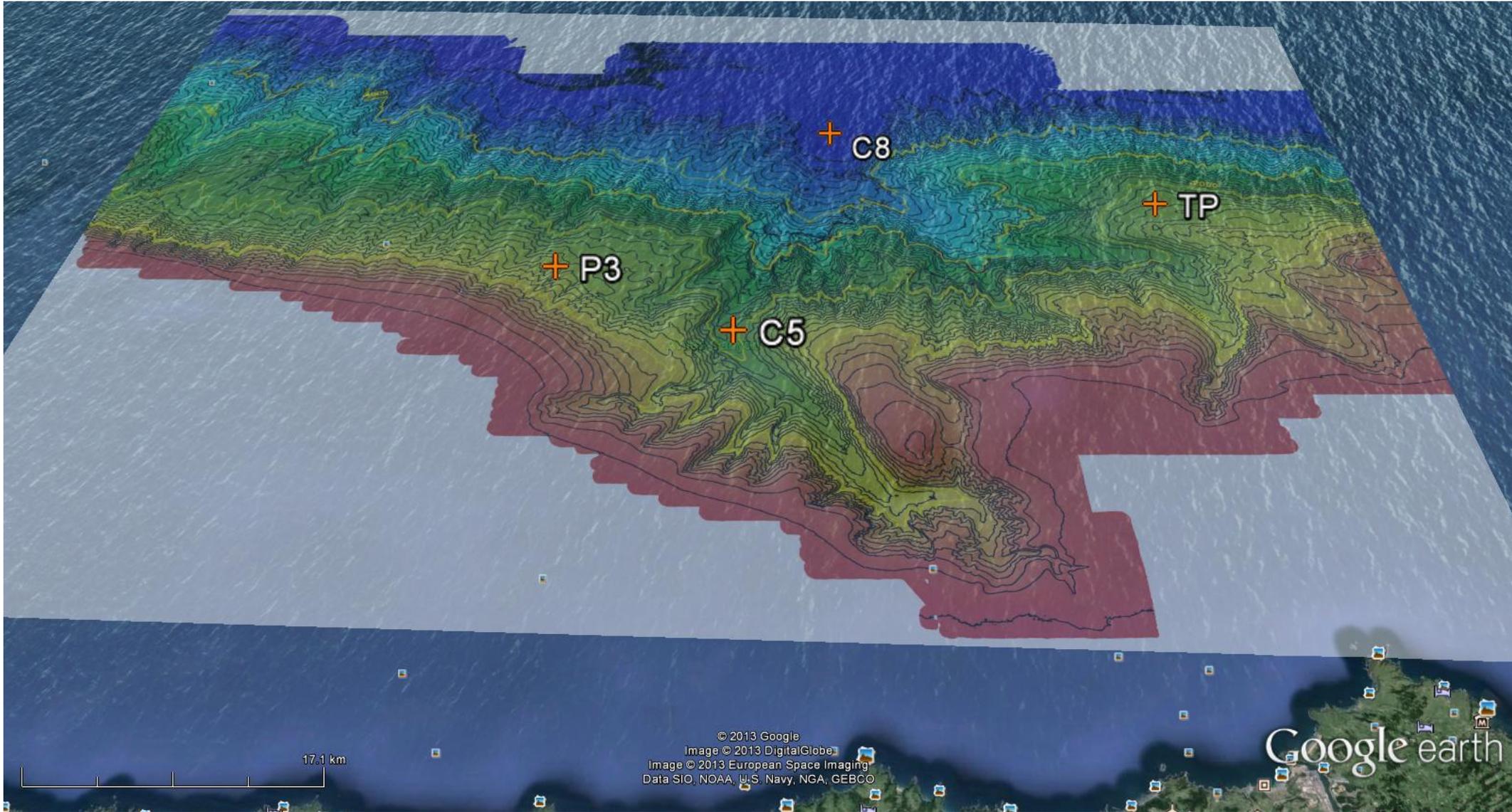


Figura 3: Localización de las 4 estaciones en las que se recogieron las muestras del presente estudio.

Tabla 1: Muestras procesadas durante la campaña BIOCANT 3 mostrando la estación en dónde se han recogido, tipo de red utilizada, profundidad, resultado y clasificación de los ejemplares

<u>ESTACIÓN</u>	<u>RED</u>	<u>PROFUNDIDAD</u>	<u>MUESTRA</u>	<u>RESULTADO</u>	<u>EJEMPLAR</u>	<u>CLASIFICACIÓN</u>
C-5	MOCNESS	3000	1		Copépodo	P. Arthropoda; Cl. Maxilópoda; Sbcl. Copépoda
			2		Eufausáceo	P. Arthropoda; Cl. Malacostraca; O. Euphausacea
			3		Tunicado	P. Chordata; Cl. Thaliacea
			4	+	<i>Argyrolepeucus hemygymus</i>	P. Chordata; Cl. Actinopterygii; O. Stomiiformes
			5		<i>Gigantocypris sp.</i>	P. Arthropoda; Cl. Maxilópoda; O. Myodocopida; F. Cypridinidae
			6		Copépodo	P. Arthropoda; Cl. Maxilópoda; Sbcl. Copépoda
			7		<i>Sagita sp.</i>	P. Chaetogtatha; O. Aphragmophora
			8	+	<i>Periphylla periphyla</i>	P. Cnidaria; Cl. Scyphozoa; O. Coronatae; F. Periphyllidae
			9		<i>Cymbula sp</i>	P. Mollusca; Cl. Gastropoda; O. Thecosomata; F. Cymbuliidae
			10		Hidromedusa	P. Cnidaria; Cl. Hydrozoa; O. Hydroida
C-5	AGASSIZ	1900-2000	11		<i>Colossendis colossea</i>	P. Arthropoda; Cl. Pycnogonida
			12	+	<i>Sipunculus sp</i>	P. Sipuncula; Cl. Sipunculida; O. Sipunculiformes
			13	+	<i>Hedingia sp</i>	P. Echinodermata; Cl. Holothuroidea; O. Molpadia; F. Molpadidae
			14	+	Coral	P. Cnidaria; Cl. Anthozoa; Sbcl. Hexacorallia
			15	+	Escafópodo	P. Mollusca; Cl. Scaphopoda; F. Dentaliidae
			16	+	Cirrípedo	P. Arthropoda; Cl. Maxilópoda; Sbcl. Cirripedia
			17	+	Tube vacío de poliqueto	
			18		Ofiura	P. Echinodermata; Cl. Ophiuroidea
			19		Ofiura	P. Echinodermata; Cl. Ophiuroidea
			20	+	<i>Stereomastis sp</i>	P. Arthropoda; Cl. Malacostraca; O. Decapoda
			21		<i>Gnathophausia sp.</i>	P. Arthropoda; Cl. Malacostraca; O. Euphausacea
			22		Equinoideo	P. Echinodermata; Cl. Echinoidea
C-5	iKMT	1300	23		Tunicado	P. Chordata; Cl. Thaliacea
			24		<i>Grammatostomas flagelbarba</i>	P. Chordata; Cl. Actinopterygii; O. Stomiiformes

<u>ESTACIÓN</u>	<u>RED</u>	<u>PROFUNDIDAD</u>	<u>MUESTRA</u>	<u>RESULTADO</u>	<u>EJEMPLAR</u>	<u>CLASIFICACIÓN</u>
C-5	iKMT	1300	25		<i>Venodermichthys capei</i>	P. Chordata;
			26		<i>Rouleミア madenensis</i>	P. Chordata;
			27		<i>Argylopelecus olfersi</i>	P. Chordata; Cl. Actinopterygii; O. Stomiiformes
P-3	AGASSIZ	1500	28		Coral	P. Cnidaria; Cl. Anthozoa
			29		Coral	P. Cnidaria; Cl. Anthozoa
			30	+	Coral	P. Cnidaria; Cl. Anthozoa
			31β	+	Poliqueto	P. Annelida; Cl. Polychaeta
			31γ	+	Coral	P. Cnidaria; Cl. Anthozoa
			32	+	Coral	P. Cnidaria; Cl. Anthozoa; O. Screlactinia
			33	+	Coral plano	P. Cnidaria; Cl. Anthozoa; O. Screlactinia
			34		<i>Pagurus sp</i>	P. Arthropoda; Cl. Malacostraca; O. Decapoda
			35		<i>Pagurus sp</i>	P. Arthropoda; Cl. Malacostraca; O. Decapoda
			36		Quirostolido	P. Arthropoda;; Cl. Malacostraca; O. Decapoda; F. Chirostyloidea
			37	+	<i>Ceramaster sp</i>	P. Echinodermata; Cl. Asteroidea; O. Valvatida
			38		Grupo Luidia	P. Echinodermata; Cl. Asteroidea; O. Paxillosida
			39		<i>Colus sp</i>	P. Mollusca; Cl. Gastropoda; O. Neogastropoda
			40		Gasteropodo	P. Mollusca; Cl. Gastropoda; O. Neogastropoda
			41		Afroditido	P. Annelida; Cl. Polychaeta; O. Phillodocida;
			42		Crinoideo	P. Echinodermata; Cl. Crinoidea
			43A		Braquiopodo	P. Brachiopoda;
43B		Cirrípedo	P. Arthropoda; Cl. Maxilópoda; Sbcl.			
C-8	AGASSIZ	4700	44		Equiuro	P. Echiura
			45		Holoturia	P. Echinodermata; Cl. Holothuroidea
			46		Holoturia	P. Echinodermata; Cl. Holothuroidea
			47		<i>Scotoplanes sp</i>	P. Echinodermata; Cl. Holothuroidea; O. Elaspodida
			48		Sipunculido	P. Sipunculida
			49		Asteroideo	P. Echinodermata; Cl. Asteroidea

<u>ESTACIÓN</u>	<u>RED</u>	<u>PROFUNDIDAD</u>	50 <u>MUESTRA</u>	<u>RESULTADO</u>	Ofiuroides <u>EJEMPLAR</u>	P. Echinodermata; Cl. Ofiuroides <u>CLASIFICACIÓN</u>
C-8	AGASSIZ	4700	51	+	<i>P. periphyla</i>	P. Cnidaria; Cl. Scyphozoa; O. Coronatae; F. Periphyllidae
			52	+	Actinia	P. Cnidaria; Cl. Anthozoa; O. Actiniaria
			53		Gasteropodo	P. Mollusca; Cl. Gastropoda; O. Archaeogastropoda
			54		Porífero	P. Porifera
			55		Porífero	P. Porifera
			56	+	Decapodo	P. Arthropoda; Cl. Malacostraca; O. Decapoda
TP	iKMT	1700	57		<i>A. hemygymus</i>	P. Chordata; Cl. Actinopterygii; O. Stomiiformes
TP	AGASSIZ	1800	58A	+	Gorgonia	P. Cnidaria; Cl. Anthozoa; O. Gorgonacea
			58B	+	Ofiuroides	P. Echinodermata; Cl. Ofiuroides
			59	+	Coral	P. Cnidaria; Cl. Anthozoa
			60		Crinoideo	P. Echinodermata; Cl. Crinoidea
			61	+	Coral	P. Cnidaria; Cl. Anthozoa
			62	+	Coral	P. Cnidaria; Cl. Anthozoa
			63	+	Ofiuroides	P. Echinodermata; Cl. Ofiuroides
			64	+	Gorgonia	P. Cnidaria; Cl. Anthozoa; O. Gorgonacea
			65		Gorgonia	P. Cnidaria; Cl. Anthozoa; O. Gorgonacea
			66A	+	Coral rosa	P. Cnidaria; Cl. Anthozoa; O. Scleractinia
			66B		Coral rosa	P. Cnidaria; Cl. Anthozoa; O. Scleractinia
			67		Coral solitario	P. Cnidaria; Cl. Anthozoa; O. Scleractinia
			68		Coral solitario	P. Cnidaria; Cl. Anthozoa; O. Scleractinia
			69		Coral solitario	P. Cnidaria; Cl. Anthozoa; O. Scleractinia
			70	+	Poliqueto tubícula	P. Annelida; Cl. Polychaeta
			71		Escafópodo	P. Mollusca; Cl. Scaphopoda; F. Dentaliidae
			72	+	Ofiuroides	P. Echinodermata; Cl. Ofiuroides
			73	+	Asteroideo	P. Echinodermata; Cl. Asteroidea
			74		Ofiuroides	P. Echinodermata; Cl. Ofiuroides

<u>ESTACIÓN</u>	<u>RED</u>	<u>PROFUNDIDAD</u>	<u>MUESTRA</u>	<u>RESULTADO</u>	<u>EJEMPLAR</u>	<u>CLASIFICACIÓN</u>
			75		Porífero	P. Porifera
			76	+	Porífero	P. Porifera
TP	AGASSIZ	1800				
			77		Porífero	P. Porifera
			78		Equinodermo	P. Echinodermata; Cl. Echinoidea
			79	+	Actinia	P. Cnidaria; Cl. Anthozoa; O. Actiniaria
			80		Braquiópodo	P. Brachiopoda
			86		Ofiuroido	P. Echinodermata; Cl. Ofiuroida
			87	+	Ofiuroido	P. Echinodermata; Cl. Ofiuroida
			88		Ofiuroido	P. Echinodermata; Cl. Ofiuroida
			89		Ofiuroido	P. Echinodermata; Cl. Ofiuroida
	ROSETA					
					AGUA 1250	
					AGUA 1500	
					AGUA 2000	
				+	AGUA 3000	



Figura 4: 4.A. *hemygymus*



Figura 5: 8.P. *periphyla*



Figura 6: 12.*Sipunculus* sp.



Figura 7: 13. *Hedingia* sp.



Figura 8: 14.Coral



Figura 9: 15.Escafópodo



Figura 10: 16.Cirripedo



Figura 11: 17.Tubo de poliqueto



Figura 12: 20.*Stereomastis* sp.



Figura 13: 30.Coral



Figura 14: 87.Ofiuroideo



Figura 15: 31y.Coral



Figura 16: 32.Coral



Figura 17: 33.Coral



Figura 18: 37.*Ceramaster* sp.



Figura 19: 51. *P. periphyla*



Figura 20: 52. Actinia



Figura 21: 56. Decápodo



Figura 22: 58A. Gorgonia



Figura 23: 58B. Ofiuroido



Figura 24: 59. Coral



Figura 25: 61. Coral



Figura 26: 62. Coral



Figura 27: 63. Ofiuroido

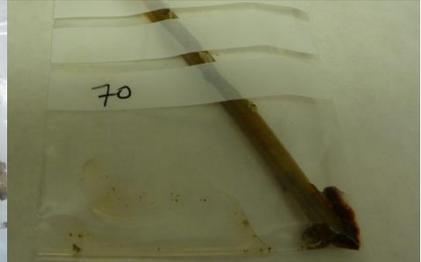


Figura 28: 64. Gorgonia



Figura 29: 66A. Coral



Figura 30: 70. Poliqueto tubícola



Figura 31: 72. Ofiuroido

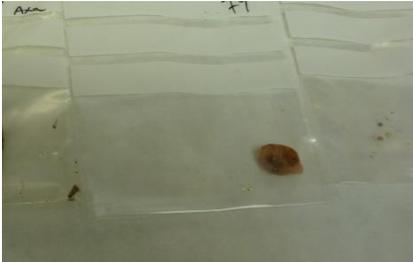


Figura 32: 73. Asteroideo



Figura 33: 74. Porífero



Figura 34: 79. Actinia

