

# Identificación de bacterias antárticas con actividad antimicrobiana aisladas de la rizósfera de *Deschampsia antarctica* Desv.

PAZ ORELLANA<sup>1</sup>, ALEQUIS PAVÓN<sup>2</sup>, NANCY CALISTO<sup>3</sup>, GUILLERMO WIESE<sup>4</sup>, LAURA NAVARRO<sup>5</sup>,  
PIEDAD CORTÉS-CORTÉS<sup>6</sup>, MANUEL GIDEKEL<sup>7</sup>, ANA GUTIÉRREZ-MORAGA<sup>8</sup>, GINO CORSINI<sup>9</sup>

1. <https://orcid.org/0000-0001-6962-8662>;

2. <https://orcid.org/0000-0001-9699-8933>; 3. <https://orcid.org/0000-0002-5517-1750>;

4. <https://orcid.org/0000-0002-6239-4231>; 5. <https://orcid.org/0000-0002-1923-5980>;

6. <https://orcid.org/0000-0002-2681-6337>; 7. <https://orcid.org/0000-0002-6770-4630>;

8. <https://orcid.org/0000-0002-4540-3490>; 9. <https://orcid.org/0000-0002-0418-8616> ✉ [gino.corsini@uautonoma.cl](mailto:gino.corsini@uautonoma.cl)

## OPEN ACCESS

### Recibido:

24/12/2021

### Revisado:

09/05/2022

### Aceptado:

16/06/2022

### Publicado en línea:

22/07/2022

### Editor en Jefe:

Dr. Américo Montiel San Martín

ISSN 0718-686X



## RESUMEN

La disminución sostenida de la disponibilidad de nuevas moléculas antimicrobianas para el uso terapéutico en las últimas décadas y el gran aumento de microorganismos resistentes a estos compuestos hace necesario buscar nuevas sustancias con propiedades antimicrobianas. Los ambientes extremos, donde hay poca disponibilidad de nutrientes, son escenarios propicios para buscar este tipo de compuestos, ya que las bacterias compiten entre sí y con otros organismos por posicionarse en el nicho ecológico y secretan, asociado a su metabolismo secundario, una serie de moléculas que inhiben o matan a otros microorganismos, evitando su multiplicación.

Nuestro grupo posee una colección de bacterias aisladas de la rizósfera de suelo del continente antártico, que logran crecer en condiciones de privación de nutrientes y a 4°C. Debido al hábitat extremo donde se desarrollan, las bacterias de los suelos de la Antártica están en una constante competencia por los recursos nutricionales, desarrollando distintas estrategias para colonizar su nicho ecológico y competir con otros microorganismos de la microbiota antártica. El objetivo de este trabajo consistió en identificar bacterias aisladas de la rizósfera de *Deschampsia antarctica* Desv. que inhiben el crecimiento de bacterias y hongos patógenos para humanos.

A partir de una colección de 55 aislados de la rizósfera de la planta *D. antarctica* Desv. se identificaron 11 aislados con capacidad de matar o inhibir bacterias patógenas humanas, pero ningún aislado inhibió el crecimiento del hongo *Candida albicans*. Los resultados mostraron que las 11 bacterias antárticas con actividad antibacteriana corresponden a bacilos aerobios estrictos, Gram negativo, psicrófilos que pertenecen al género *Pseudomonas*.

**Palabras claves:** Bacterias antárticas, compuestos antimicrobianos, *Pseudomonas*, bacteria rizosférica.

# Identification of Antarctic bacteria with antimicrobial activity isolated from the rhizosphere of *Deschampsia antarctica* Desv.

## Contribución de los autores

**GC:** Redacción general del Manuscrito, análisis de la información, confección de tablas y figuras, discusión.

**PO:** Desarrollo experimental de espectro de acción y caracterización fenotípica, confección de figuras, revisión bibliográfica y revisión del manuscrito.

**GW:** Desarrollo experimental de espectro antimicrobiano y caracterización fenotípica.

**AP, NC, LS, PC:** Revisión bibliográfica, confección de tablas y figuras. Revisión del manuscrito.

**AG y MG:** Revisión del manuscrito y facilitación de colección de bacterias antárticas.

## Declaración de intereses:

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

## Financiamiento:

Este trabajo fue realizado con el apoyo de los proyectos DIUA181-2020, DIUA189-2020 y GENERA-UA 2019-017 de la Universidad Autónoma de Chile.

## ABSTRACT

The sustained decrease in the availability of new antimicrobial molecules for therapeutic use in recent decades and the large increase in microorganisms resistant to these compounds makes it necessary to search for new substances with antimicrobial properties.

Extreme environments, where there is little availability of nutrients, are favorable scenarios to search for this type of compounds, since bacteria compete with other bacteria or other organisms to position themselves in the ecological niche and secrete, associated with their secondary metabolism, a series of molecules that inhibit or kill other microorganisms thus preventing their proliferation.

Our group has a collection of rhizosphere bacteria from soil of the Antarctic continent that has ability to grow under conditions of food deprivation and at 4°C. Due to the extreme habitat where they develop, Antarctic soil bacteria are in constant competition for nutritional resources and therefore develop different strategies to colonize their ecological niche and compete with other microorganisms of the Antarctic microbiota. The objective of this work was to identify bacteria isolated from the rhizosphere of *Deschampsia antarctica* Desv. that inhibit the growth of bacteria and fungi that are pathogenic for humans.

From a collection of 55 rhizosphere isolates of the *Deschampsia antarctica* Desv. we identified 11 isolates with the capacity to eliminate human pathogenic bacteria, but no isolate from the collection eliminated the *Candida albicans* fungus. The 11 Antarctic bacteria with antibacterial capacity are strict aerobic Gram-negative bacilli, psychrophile to the genus *Pseudomonas*.

**Key words:** Antarctic bacteria, antimicrobial compounds, *Pseudomonas*, rhizosphere bacteria.

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha disminuido considerablemente la disponibilidad de nuevas moléculas antimicrobianas para uso terapéutico (Källberg *et al.* 2018), como desinfectantes o antisépticos. Por otra parte, se ha producido un gran aumento de microorganismos resistentes a estas sustancias como *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina y vancomicina o *Candida albicans* resistentes a fluconazol y otros azoles (Livermore, 2004).

Para abordar esta problemática, se hace necesaria la búsqueda de nuevas moléculas con propiedades antimicrobianas, siendo los ambientes extremos, donde hay poca disponibilidad de fuentes de carbono y nitrógeno, escenarios propicios para encontrar este tipo de moléculas (Zhu *et al.* 2019), debido a que en estos ambientes las bacterias compiten entre sí por posicionarse en su nicho ecológico secretando, asociado a su metabolismo secundario, una serie de sustancias que inhiben o matan a otros microorganismos, evitando su crecimiento (Tomova *et al.* 2015).

En la actualidad, el conocimiento sobre la diversidad bacteriana sigue siendo limitado, debido a que se estima que las especies cultivables de bacterias y arqueas representan sólo una pequeña fracción de la diversidad existente (Woese *et al.* 1990). Los estudios destinados a la identificación de nuevas especies bacterianas permiten a su vez abordar el estudio de metabolitos secundarios producidos por estas especies, estimándose que, por cada nueva cepa bacteriana, existiría el potencial genético de producir 10-20 nuevas moléculas secundarias con interés biotecnológico para la agronomía, la industria forestal o la industria cosmética, como también en el ámbito de la biomedicina (Bentley *et al.* 2002; Lam, 2006).

Si bien se ha descubierto un gran número de antibióticos a partir de distintos microorganismos (Manivasagan *et al.* 2014), es de vital interés la identificación de nuevas moléculas y/o microorganismos para desarrollar nuevos compuestos farmacéuticos, en especial antibióticos que puedan hacer frente a la resistencia que presentan hoy en día diversos agentes patógenos, lo que encarece y complica la salud de la población (Payne *et al.* 2007; Talbot *et al.* 2006).

Por su parte, desde finales de la década de 1980 se han hecho esfuerzos en la identificación y caracterización de nuevas moléculas con propiedades antifúngicas (Okami & Hotta, 1988). Por ejemplo, se ha descrito que mycangimycin, un compuesto derivado de una bacteria del género *Streptomyces*, es responsable de la inhibición selectiva de hongos (Kaltenpoth *et al.* 2005; Poulsen *et al.* 2011).

Dada las condiciones extremas de frío y viento que se registran en el continente antártico, la fauna animal y vegetal es baja y contrasta con la alta diversidad de microorganismos presente, indicando que las condiciones adversas imperantes de bajas temperaturas y aridez de su suelo no son obstáculo para la colonización de los microorganismos (Tindall, 2004). De esta forma, el continente antártico se ha transformado en un gran reservorio de biodiversidad bacteriana para la producción de sustancias antimicrobianas (Núñez-Montero *et al.* 2019). Si bien la mayor parte de las investigaciones se centra en bacterias que provienen de medioambientes acuáticos (Van Trappen *et al.* 2002), los estudios realizados en el medioambiente sólido de la Antártica han identificado en estos microorganismos un polo de desarrollo biotecnológico (Cong *et al.* 2020; Nichols *et al.* 2002). Asociados a compuestos antimicrobianos, se han caracterizado *Pseudomonas* sp. antártica que pueden controlar al hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* (Poblete-Morales *et al.*

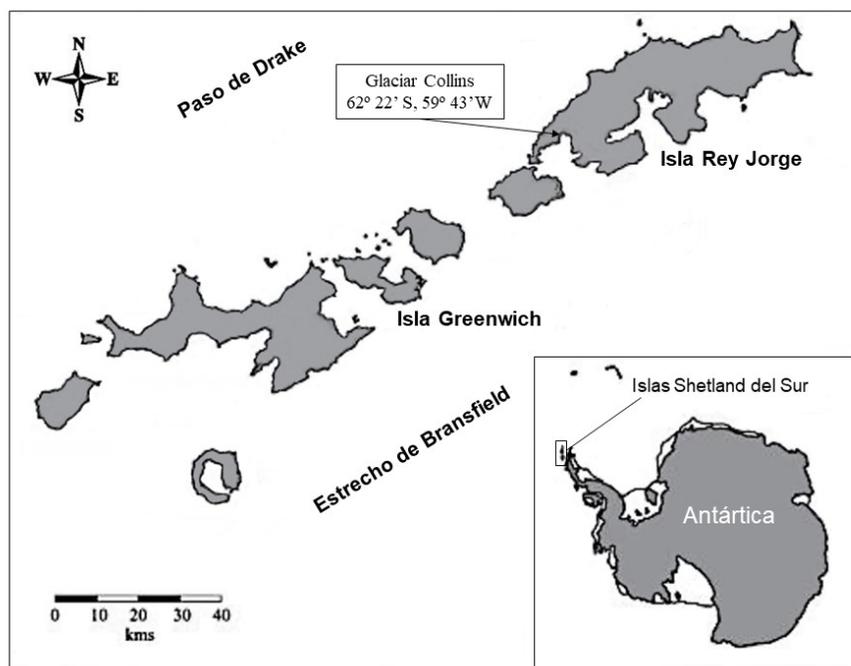


Fig. 1. Localización del sitio de muestreo para el aislamiento de bacterias rizosféricas de suelo antártico.

2020), cepas de actinobacterias antárticas, que producen metabolitos bioactivos con la capacidad de inhibir el crecimiento de *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, indicando que las bacterias provenientes de este continente poseen un alto potencial de uso a nivel clínico (Lee *et al.* 2012). Por otra parte, se ha identificado a la especie *Janthinobacterium* sp. aislada desde la Antártica controlando el crecimiento de bacterias patógenas que poseen la  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido AmpC, así como, cepas de *Acinetobacter baumannii* y *P. aeruginosa* que producen otros tipos de carbapenemasas (Asencio *et al.* 2014).

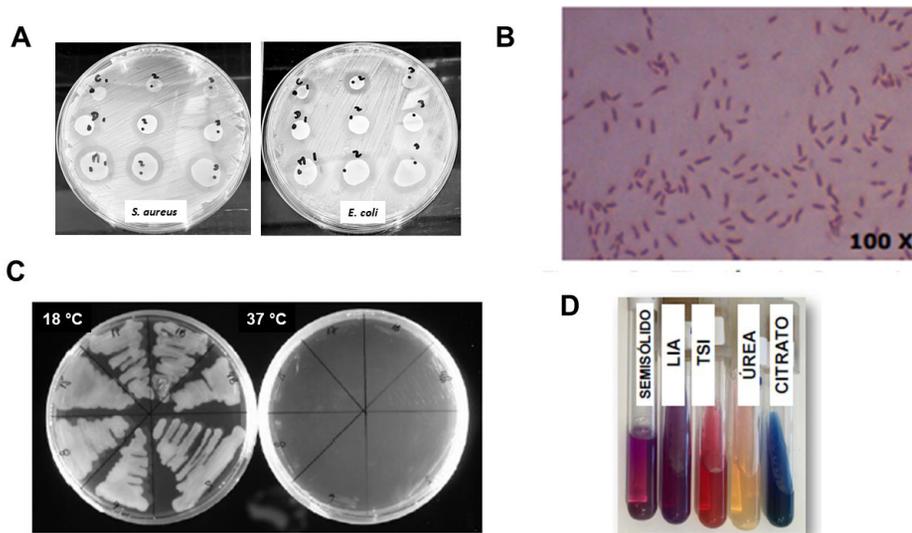
El objetivo de este trabajo consistió en identificar bacterias antárticas aisladas de la rizósfera de la planta *Deschampsia antarctica* Desv. (BA), que inhiben el crecimiento de bacterias y hongos patógenos para humanos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Obtención de bacterias antárticas aisladas de la rizósfera de la planta D. antarctica Desv.*

Para el desarrollo del presente trabajo se utilizaron 55 bacterias antárticas aisladas de la rizósfera de la planta *D. antarctica* Desv. (BA) recolectadas en las proximidades del glaciar Collins (62° 22'S, 59° 43'W) ubicado en la isla Rey Jorge (Fig. 1). Las muestras de suelo se procesaron según los protocolos de Barrientos-Díaz *et al.* (2008). Brevemente, 4 g de suelo se mezcló con 5 mL de agua estéril y se agitó por 10 min utilizando un agitador Vórtex. El sobrenadante y diluciones seriadas con un factor de dilución en base 10, se cultivaron en placas con agar nutritivo (Becton Dickinson - BD) diluido al tercio (agar nutritivo 1/3; extracto de carne 1 g/L, peptona 1,67 g/L y agar 15 g/L). Los cultivos se incubaron a 4°C, 10°C y 18°C durante 15 días. El crecimiento bacteriano se controló cada 24 h y las colonias se transfirieron al mismo medio utilizado para el aislamiento. Las BA aisladas se conservaron a -80°C en glicerol al 50% hasta su uso.

Fig. 2. Caracterización fenotípica de bacterias antárticas aisladas de la rizósfera de *Deschampsia antarctica* Desv. (A) Ensayo de actividad antimicrobiana realizado a los 55 aislados. (B) Técnica de tinción de Gram y microscopía óptica realizada a las 11 bacterias antárticas que presentaron actividad antimicrobiana. Como referencia se muestra la microscopía del aislado K2115. (C) Determinación de temperatura óptima de crecimiento de las bacterias antárticas. (D) Caracterización metabólica de las 11 bacterias antárticas que presentaron actividad antimicrobiana en medios de cultivos diferenciales como agar triple azúcar hierro (TSI), agar urea de Christensen, agar citrato de Simons, entre otros. Como referencia se muestra la batería corta previa a la siembra con las bacterias antárticas.



### Condiciones de cultivo

Las BA se cultivaron en agar nutritivo 1/3 (BD) y en caldo nutritivo 1/3 (BD), a 4°C, 10°C, 18°C y 37°C. El cultivo de las cepas patógenas *Escherichia coli* (ATCC® 25922™), *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923™) se realizó en agar o caldo Nutritivo (BD) a 37°C durante 12 a 24 h. El cultivo de *Candida albicans* GC01 se realizó en agar Sabouraud (BD) a 37°C durante 24 h. Los microorganismos patógenos se conservaron a -80°C en glicerol al 50%.

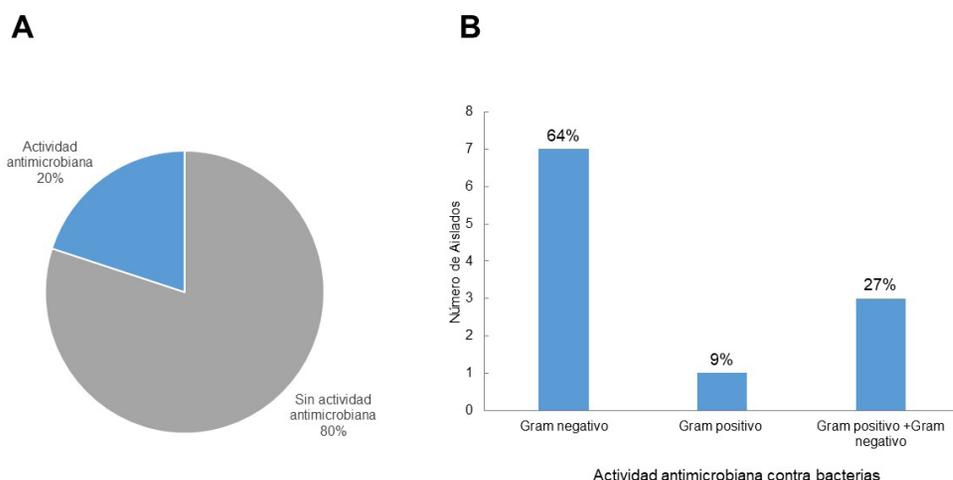
### Espectro de acción antimicrobiano de las bacterias antárticas aisladas de la rizósfera de la planta *D. antarctica* Desv.

Se evaluó el efecto de las 55 BA sobre el crecimiento de los microorganismos patógenos humanos mediante ensayos de antagonismo o actividad en placa (Corsini *et al.* 2010). La actividad inhibitoria de las BA se detectó mediante la inoculación de una colonia de BA sobre un césped de la bacteria patógena indicadora *E. coli* ATCC25922, *S. aureus* ATCC25923 y la levadura *C. albicans*. Brevemente, a partir de un cultivo de la bacteria o levadura indicadora crecido durante 24 h a 37°C, se realizó una dilución de inóculo en solución salina tamponada con fosfato (PBS), se agitó en Vórtex y mediante una tórula estéril se realizó una siembra en césped sobre una placa de agar nutritivo 1/3. Luego, se inoculó una colonia de BA sobre el césped del microorganismo indicador. El resultado de la actividad antagonista se determinó mediante la presencia o ausencia de una zona de inhibición de crecimiento sobre el césped de cada microorganismo patógeno analizado (Fig. 2A). Como control negativo se utilizó alicuotas de 5 µL del medio de cultivo (caldo nutritivo 1/3). Como control positivo se utilizó el antibiótico ampicilina (10 µg) o el antimicótico terbinafina (200 µg) según corresponda.

### Identificación fenotípica de las bacterias antárticas aisladas de la rizósfera de la planta *D. antarctica* Desv.

Las BA se identificaron por su morfología previa tinción de Gram (Bartholomew & Mittwer, 1952) y posterior análisis microscópico (Fig. 2B). La identificación bioquímica mediante la prueba de la oxidasa se realizó empleando discos que contienen oxalato de dimetil-para-fenilendiamina, como sustrato de la enzima oxidasa. Las bacterias que producen la enzima oxidasa se evidencian

Fig. 3. Espectro de acción antimicrobiano de bacterias antárticas aisladas de la rizósfera de *Deschampsia antarctica* Desv. En (A) se muestra la cantidad total de bacterias antárticas con actividad antimicrobiana y en (B) se muestra de manera desagregada el espectro antibacteriano que presenta el 20% de las bacterias antárticas con actividad antimicrobiana.



porque en presencia de oxígeno atmosférico y citocromo C, se oxida el sustrato presente en los discos a un compuesto de color rojo-fucsia o morado oscuro casi negro. El rango de temperatura óptima se determinó creciendo los aislados de suelo antártico sembrados en agar nutritivo 1/3 a diferentes temperaturas: 4°C, 10°C, 18°C y 37°C, durante 24 a 72 h y observando el crecimiento de las bacterias (Fig. 2C).

El metabolismo de las bacterias (Fig. 2D) se caracterizó mediante una batería corta de identificación. Brevemente, se empleó el medio de cultivo agar TSI o agar triple azúcar hierro como medio nutritivo y diferencial que permitió estudiar la capacidad fermentativa y de producción de gas a partir de glucosa, sacarosa y lactosa en un medio único; Citrato de Simons para determinar la utilización de citrato como única fuente de carbono (fosfato diácido de amonio 1,0 g/L, fosfato dipotásico 1,0 g/L, cloruro de sodio 5,0 g/L, citrato de sodio 2,0 g/L, sulfato de magnesio 0,2 g/L, BactoAgar 15,0 g/L, azul de bromotimol 0,08 g/L ajustar pH final a 6,9). El agar urea de Christensen (Peptona 1,0 g/L, Glucosa 1,0 g/L, cloruro de sodio 5,0 g/L, fosfato monopotásico 2,0 g/L, urea 20 g/L, rojo fenol 0,012 g/L, BactoAgar 15,0 g/L Ajustado a pH final 6,8) se utilizó para identificar bacterias que poseen la enzima ureasa, que actúa hidrolizando la urea presente en el medio, liberando amoníaco.

## RESULTADOS

A partir de una colección de 55 aislados de bacterias de suelo antártico aisladas de la rizósfera de la planta *D. antarctica* Desv. en las proximidades del glaciar Collins (Fig. 1), se realizó un análisis de la capacidad antimicrobiana contra las bacterias patógenas *Escherichia coli* ATCC25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC25923, y contra la levadura *Candida albicans* GC01 (Fig. 2A).

Los resultados del análisis de la actividad antimicrobiana se resumen en la Tabla 1. Once de los 55 aislados de BA (20%) presentaron efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las bacterias patógenas ensayadas (Fig. 3A), pero ningún aislado de BA inhibió el crecimiento de *C. albicans* (Tabla 1). De los 11 aislados con resultado positivo, siete (64%) inhibieron sólo el crecimiento de *E. coli* (Gram negativo), tres BA (27%) inhibieron el crecimiento de ambas bacterias patógenas y sólo una BA (9%) inhibió el crecimiento de *S. aureus* (Gram positivo) (Fig. 3B).

Tabla 1. Aislados de bacterias antárticas que presentan actividad antimicrobiana.

	Aislado	Actividad antimicrobiana contra		
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
1	K2SII2	-	+	-
2	K2SII6	+	+	-
3	K2SII5	-	+	-
4	K2I9/ Da bac 9	-	+	-
5	K2I15	-	+	-
6	K2II2	-	+	-
7	K2II3	-	+	-
8	TI6/ Da bac 11	+	+	-
9	TI12/Da bac 1-12	-	+	-
10	TI13	+	-	-
11	TI8/ Da bac 1-8	+	+	-

Tabla 2. Características fenotípicas de aislados de bacterias antárticas con actividad bacteriana.

	Aislado	Características fenotípicas							
		Tinción Gram	Prueba Oxidasa	Temperatura crecimiento (°C)	Metabolismo				
					crecimiento con O2	crecimiento	sin O2	CS	Ureasa
1	K2SII2	Bacilo Gram negativo	+	4 a 18	+	-	+	+	+
2	K2SII6	Bacilo Gram negativo	+	4 a 18	+	-	+	+	+
3	K2SII5	Bacilo Gram negativo	+	4 a 18	+	-	+	+	+
4	K2I9/ Da bac 9	Bacilo Gram negativo	+	4 a 18	+	-	+	+	+
5	K2I15	Bacilo Gram negativo	+	4 a 18	+	-	+	+	+
6	K2II2	Bacilo Gram negativo	+	4 a 18	+	-	+	+	+
7	K2II3	Bacilo Gram negativo	+	4 a 18	+	-	+	+	+
8	TI6/ Da bac 11	Bacilo Gram negativo	+	4 a 18	+	-	+	+	+
9	TI12/Da bac 1-12	Bacilo Gram negativo	+	4 a 18	+	-	+	+	+
10	TI13	Bacilo Gram negativo	+	4 a 18	+	-	+	+	+
11	TI8/ Da bac 1-8	Bacilo Gram negativo	+	4 a 18	+	-	+	+	+

CS: agar citrato de Simons. Ureasa: agar urea de Christensen, prueba de la enzima ureasa.

Las características fenotípicas de las 11 BA que presentaron actividad antibacteriana se obtuvieron mediante análisis microscópico previa tinción Gram para determinar morfología (Fig. 2B), crecimiento a distintas temperaturas para establecer rango de temperatura óptima (Fig. 2C) y pruebas bioquímicas para la caracterización metabólica (Fig. 2D). Los resultados obtenidos sobre la caracterización fenotípica de las BA se resumen en la Tabla 2. Las once BA presentaron morfología correspondiente a bacilos, del tipo Gram negativo. Todas las BA con actividad antagonista resultaron positivas para la prueba de oxidasa y crecieron en un rango de temperatura óptima entre 4°C y 18°C. Por su parte, la caracterización metabólica mostró que todas las BA que presentaron actividad antibacteriana son aerobias estrictas, debido a que no fermentaron glucosa, sacarosa o lactosa, además utilizaron citrato como única fuente de carbono y todas poseen la enzima ureasa debido a que alcalinizaron el medio de cultivo, lo cual se apreció por el viraje del indicador de pH a color fucsia (Tabla 2). Los resultados obtenidos según la caracterización fenotípica de los aislados permitirían identificar a las BA aisladas desde la rizósfera de *D. antarctica* como bacilos Gram negativo pertenecientes al género *Pseudomonas*.

## DISCUSIÓN

Pese a tener más de un siglo la investigación sobre microorganismos antárticos, el ecosistema antártico todavía representa una enorme reserva de biodiversidad microbiana inexplorada (Bratchkova & Ivanova, 2011). Variadas publicaciones han informado que las bacterias antárticas son una fuente potencial de compuestos antimicrobianos y este tipo de bacterias se han aislado principalmente de suelos y agua de mar del continente antártico (Bratchkova & Ivanova, 2011; Núñez-Montero *et al.* 2019; Poblete-Morales *et al.* 2020; Tindall, 2004).

La información sobre microorganismos antárticos que producen compuestos antimicrobianos es menor si se compara con otros hábitats más estudiados (Núñez-Montero & Barrientos, 2018), lo que convierte a las bacterias aisladas del ambiente antártico en una fuente atractiva para explorar nuevos compuestos bioactivos con propiedades antimicrobianas que podrían ser empleados en la industria alimentaria o farmacéutica.

En este contexto, en este trabajo se encontró que el 20% de los aislados bacterianos estudiados producen compuestos con actividad antimicrobiana que inhiben el crecimiento de bacterias patógenas humanas como *E. coli* o *S. aureus*. Sin embargo, no se encontraron BA capaces de inhibir el crecimiento de levaduras como *C. albicans*. Los aislados bacterianos identificados en este estudio se aislaron a partir de suelos sin intervención humana, como la rizósfera de *D. antarctica*. No obstante, lograron inhibir principalmente el crecimiento de bacterias Gram negativo debido a que siete BA del total inhibieron sólo el crecimiento de *E. coli*, un aislado inhibió el crecimiento de *S. aureus* y tres aislados inhibieron el crecimiento de ambos tipos de bacterias patógenas.

En relación con la identificación de las bacterias con propiedades antimicrobianas, los resultados mostraron que los 11 aislados que inhibieron el crecimiento de bacterias patógenas poseen características fenotípicas y metabólicas similares entre ellos, es decir, son bacilos Gram negativo, psicrófilos, positivos a la prueba de oxidasa, no fermentan azúcares, ureasa positivo y utilizan citrato como única fuente de carbono. Estas características son propias de bacterias Gram negativo no fermentadoras que pertenecen al género *Pseudomonas*. Esta asignación de género se ve corroborada por técnicas moleculares en algunos de los aislados analizados, ya que Barrientos-Díaz *et al.* (2008), mediante secuenciación del gen rRNA 16S, determinaron que

los aislados K2I9/Da bac9 y TI6/Da bac 11 corresponden a la especie *Pseudomonas talaasi* y el aislado TI12/Da bac 1-12 a la especie *Pseudomonas* sp. Mediante el mismo tipo de análisis, el aislado TI8/Da bac 1-8, se identificó como *Pseudomonas* sp. (Berríos *et al.* 2013). Por otra parte, el aislado K2I15 se identificó mediante secuenciación genómica como *Pseudomonas* sp. de 6,6 Mbp (Orellana *et al.* 2017). Para los aislados K2SII2, K2SII6, K2SII5, K2II2, K2II3 y TI13 no existen datos moleculares hasta el momento, sólo se les asignó pertenencia al género *Pseudomonas* mediante análisis fenotípico. Sin embargo, Wiedmann *et al.* (2000) demostraron que en *Pseudomonas* spp. aisladas de muestras de leche, existe una buena correlación entre las técnicas moleculares y fenotípicas para la asignación de género. Para la identificación de especie en *Pseudomonas* ambientales, son más adecuadas las técnicas moleculares como la secuenciación del gen 16S rRNA y de otros genes (*gyrB*, *rpoB* y *rpoD*) para realizar análisis multilocus de secuencia (MLSA) (Gomila *et al.* 2015).

Por lo tanto, como los 11 aislados poseen características fenotípicas y metabólicas similares y como se identificaron 5 de esos aislados como bacterias del género *Pseudomonas* por técnicas moleculares, la correlación de los resultados obtenidos en este trabajo con los datos moleculares existentes en la literatura, entrega argumentos para señalar que los aislados que presentaron actividad antimicrobiana corresponden a bacterias psicrófilas del género *Pseudomonas*, con actividad antagonica contra bacterias patógenas humanas.

## LITERATURA CITADA

- Asencio, G., Lavín, P., Alegría, K., Domínguez, M., Bello, H., González-Rocha, G. & González-Aravena, M. (2014). Antibacterial activity of the Antarctic bacterium *Janthinobacterium* sp. SMN 33.6 against multi-resistant Gram-negative bacteria. *Electronic Journal of Biotechnology*, 17(1), 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2013.12.001>
- Barrientos-Díaz, L., Gidekel, M. & Gutiérrez-Moraga, A. (2008). Characterization of rhizospheric bacteria isolated from *Deschampsia antarctica* Desv. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 2289-2296. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9743-1>
- Bartholomew, J. W. & Mittwer, T. (1952). The Gram stain. *Bacteriological Reviews*, 16(1), 1-29. <https://doi.org/10.1128/br.16.1.1-29.1952>
- Bentley, S., Chater, K., Cerdeno-Tarraga, A.M., Challis, G., Thomson, N., James, K., Harris, D., Quail, M., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., et al. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor*A3(2). *Nature*, 417, 141-147.
- Berríos, G., Cabrera, G., Gidekel, M. & Gutiérrez-Moraga, A. (2013). Characterization of a novel antarctic plant growth-promoting bacterial strain and its interaction with Antarctic hair grass (*Deschampsia antarctica* Desv.). *Polar Biology* 36(3), 349-362. <https://doi.org/10.1007/s00300-012-1264-6>
- Bratchkova, A. & Ivanova, V. (2011). Bioactive metabolites produced by microorganisms collected in Antarctica and the Arctic. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 25(SUPPL. 4), 1-7. <https://doi.org/10.5504/bbeq.2011.0116>
- Cong, B., Yin, X., Deng, A., Shen, J., Tian, Y., Wang, S. & Yang, H. (2020). Diversity of cultivable microbes from soil of the Fildes Peninsula, Antarctica, and their potential application. *Frontiers in Microbiology* 11:570836. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.570836>
- Corsini, G., Karahanian, E., Tello, M., Fernández, K., Rivero, D., Saavedra, J. M. & Ferrer, A. (2010). Purification and characterization of the antimicrobial peptide microcin N: Properties of the antimicrobial peptide microcin N. *FEMS Microbiology Letters*, 312(2), 119-125. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02106.x>
- Gomila, M., Peña, A., Mulet, M., Lalucat, J. & García-Valdés, E. (2015). Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 214. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00214>

- Kállberg, C., Årdal, C., Salvesen Blix, H., Klein, E., Martínez E, Lindbæk, M., Outtersen, K., Røttingen J. & Laxminarayan, R. (2018). Introduction and geographic availability of new antibiotics approved between 1999 and 2014. *PLoS ONE*, 13(10), e0205166. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205166>
- Kaltenpoth, M., Göttler, W., Herzner, G. & Strohm, E. (2005). Symbiotic bacteria protect wasp larvae from fungal infestation. *Current Biology*, 15, 475-479. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.12.084>
- Lam, K.S. (2006). Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Current Opinion in Microbiology*, 9, 245-251. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.03.004>
- Lee, L.H., Cheah, Y.K., Mohd-Sidik, S., Ab-Mutalib N.S., Tang, Y.L., Lin, H.P. & Hong, K. (2012). Molecular characterization of Antarctic actinobacteria and screening for antimicrobial metabolite production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28(5), 2125-2137. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1018-1>.
- Livermore, D. M. (2004). The need for new antibiotics. *Clinical Microbiology and Infection*, 10, 1-9. <https://doi.org/10.1111/j.1465-0691.2004.1004.x>.
- Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K. & Kim, S.K. (2014). Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. *Microbiology Research*, 169(4), 262-278. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.07.014>
- Nichols, D.S., Sanderson, K., Buia, A., Van de Kamp, J., Holloway, J., Bowman, J.P., Smith, M., Mancuso, N.C., Nichols, P.D. & McMeekin, T.A. (2002). Bioprospecting and biotechnology in Antarctica. In: J. Jabour-Green y M. Haward (Eds.), *The Antarctic: past, present and future* (pp. 85-103). Antarctic Cooperative Research Centre, Research Report #28, Hobart.
- Núñez-Montero, K., & Barrientos, L. (2018). Advances in Antarctic research for antimicrobial discovery: A comprehensive narrative review of bacteria from Antarctic environments as potential sources of novel antibiotic compounds against human pathogens and microorganisms of industrial importance. *Antibiotics*, 7(4). <https://doi.org/10.3390/antibiotics7040090>
- Núñez-Montero, K., Lamilla, C., Abanto, M., Maruyama, F., Jorquera, M. A., Santos, A., Martínez-Urtaza, J. & Barrientos, L. (2019). Antarctic *Streptomyces fildesensis* So13.3 strain as a promising source for antimicrobials discovery. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43960-7>
- Okami, Y. & Hotta, K. (1988). Search and discovery of new antibiotics: Good fellow. In: M. Williams y S.T.M. Mordarski (Eds), *Actinomycetes in Biotechnology* (p. 336). Academic Press Inc.
- Orellana, P., Pavón, A., Céspedes, S., Salazar, L., Gutiérrez, A., Castillo, D. & Corsini, G. (2017). Draft genome sequence of Chilean Antarctic *Pseudomonas* sp. strain K2115. *Genome Announcements*, 5(33): e00771-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00771-17>
- Payne, D.I., Gwynn, M.N., Holmes, D.J. & Pompliano, D.L. (2007). Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nature Review in Drug Discovery*, 6, 29-40. <https://doi.org/10.1038/nrd2201>
- Poblete-Morales, M., Rabert, C., Olea, A. F., Carrasco, H., Calderón, R., Corsini, G. & Silva-Moreno, E. (2020). Genome Sequence of *Pseudomonas* sp. strain AN3A02, isolated from Rhizosphere of *Deschampsia antarctica* Desv., with antagonism against *Botrytis cinerea*. *Microbiology Resource Announcement*, 9(21): e00320-20. <https://doi.org/10.1128/MRA.00320-20>
- Poulsen, M., Oh, D.C., Clardy, J. & Currie, C.R. (2011). Chemical analyses of wasp-associated *Streptomyces* bacteria reveal a prolific potential for natural products discovery. *PLoS ONE*, 6: e16763. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016763>
- Talbot, G.H., Bradley, J., Edwards, J.E., Gilbert, D., Scheld, M. & Bartlett, J.G. (2006). Bad bugs need drugs an update on the development pipeline from the antimicrobial avail-ability task force of the infectious diseases society of America. *Clin. Infect. Dis.*, 42, 657-668. <https://doi.org/10.1086/499819>
- Tindall, B.J. (2004). Prokaryotic diversity in the Antarctic: the tip of the iceberg. *Microbial Ecology*, 47, 271-283. <https://doi.org/10.1007/s00248-003-1050-7>
- Tomova, I., Stoilova-Disheva, M., Lazarkevich, I., & Vasileva-Tonkova, E. (2015). Antimicrobial activity and resistance to heavy metals and antibiotics of heterotrophic bacteria isolated from sediment and soil samples collected from two Antarctic islands. *Frontiers in Life Science*, 8(4), 348-357. <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1044130>

- Van Trappen, S., Mergaert, J., Van Eygen, S., Dawyndt, P., Cnockaert, M.C. & Swings, J. (2002). Diversity of 746 heterotrophic bacteria isolated from microbial mats from ten antarctic lakes. *Systematic and Applied Microbiology*, 25(4), 603-610. <https://doi.org/10.1078/07232020260517742>
- Wiedmann, M., Weilmeier, D., Dineen, S. S., Ralyea, R., & Boor, K. J. (2000). Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 2085-2095. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.5.2085-2095.2000>
- Woese, C.R., Kandler, O. & Wheelis, M.L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 4576-4579. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.12.4576>
- Zhu, Y.-G., Zhao, Y., Zhu, D., Gillings, M., Penuelas, J., Ok, Y. S., Capon, A. & Banwart, S. (2019). Soil biota, antimicrobial resistance and planetary health. *Environment International*, 131, 105059. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105059>

Apéndice: Afiliación declara por cada uno de los autores

Número afiliación	Nombre de la institución y/o organización Afiliación
1	Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Chile, Santiago, Chile.
2	Centro de Investigación y Monitoreo Ambiental Antártico (CIMAA), Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad de Magallanes, Punta Arenas, Chile.
3	Dirección de Desarrollo y Transferencia, Vicerrectoría de Investigación, Universidad de Las Américas, Chile.
4	Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales, Departamento de Producción Agropecuaria, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

Autor	Afiliación
P. Orellana, A. Pavón, N. Calisto, L. Navarro, M. Gidekel, L. Salazar, A. Gutiérrez-Moraga, G. Corsini	1
N. Calisto	2
P. Cortés-Cortés	3
A. Gutiérrez-Moraga	4