



**EFFECTO DE LA SALINIDAD SOBRE LA ABUNDANCIA DE GENES ASOCIADOS A
LA SÍNTESIS Y RESISTENCIA DE COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS EN LA
DESEMBOCADURA DEL RÍO RANCHERÍA EN LA GUAJIRA.**

LIBIA VANESSA DAZA GIRALDO

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
BOGOTÁ D.C, JUNIO 2019**



**EFFECTO DE LA SALINIDAD SOBRE LA ABUNDANCIA DE GENES ASOCIADOS A
LA SÍNTESIS Y RESISTENCIA DE COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS EN LA
DESEMBOCADURA DEL RÍO RANCHERÍA EN LA GUAJIRA.**

JAVIER VANEGAS GUERRERO pHD

ASESOR EXTERNO

JUDITH ELENA CAMACHO KURMEN pHD

ASESOR INTERNO

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

BOGOTÁ D.C, JUNIO 2019

DEDICATORIA.

Este trabajo se lo dedico primero que todo a Dios por guiar mi camino, a mis padres Jorge y Stella por ser un apoyo incondicional para mi formación tanto personal como profesional y por el amor que me han dado en el transcurso de mi vida, las palabras son cortas para todo lo que significan y el amor tan grande que les tengo, por estar siempre en mis caídas y ser esos brazos que me recogen, la vida no es fácil pero con ustedes siempre lo ha sido y lo será.

A toda mi familia por los consejos y apoyo en los momentos difíciles y el acompañamiento que me han brindado, a mi primo Sebastian que a pesar de su corta edad siempre ha estado para reírnos, llorar y compartir momentos felices.

A mis asesores profesor Javier y profesora Judith por el honor de haber podido trabajar con ustedes, infinitas gracias por el apoyo y la colaboración prestada en este trabajo.

AGRADECIMIENTOS.

Le agradezco a todas las personas que en cierto modo han estado y aportado algo tanto en mi aprendizaje personal como profesional.

A mis amigas Gabriela, Mildre y Natalia por haber estado junto a mí en este proceso, por sus consejos y acompañamiento que hicieron mi estancia en la universidad más hermosa y una de las mejores experiencias.

A Paola, Andrea, Camila, Vane y Diana por los momentos vividos y el tiempo que pasamos juntas, las risas y los malos momentos siempre guardados en mi corazón, sus enseñanzas y su apoyo incondicional en el proceso de este trabajo

A Omar, gracias, por enseñarme el valor de una amistad incondicional y las palabras de un gran amigo.

A los profesores que han sido parte de este proceso por haber compartido su conocimiento conmigo y hacer que nosotros como profesionales le cojamos amor verdadero a nuestra carrera.

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, por ser el transporte para alcanzar mis sueños y a la universidad Antonio Nariño.

Este trabajo estuvo enmarcado dentro del proyecto “Diversidad funcional de microorganismos asociados al ciclaje de C, N y P en el manglar la Ranchería (La Guajira) mediante un acercamiento de metatranscriptómica” Contrato 529/14 financiado por la Universidad Antonio Nariño y Colciencias.

TABLA DE CONTENIDOS

	PAG
RESUMEN.....	11
INTRODUCCIÓN.....	13
1.OBJETIVOS.....	15
1.1 General.....	15
1.2 Específicos.....	15
2. ANTECEDENTES.....	16
3. MARCO DE REFERENCIA.....	20
3.1. Definición de Manglar.....	20
3.2. Manglares en Colombia.....	20
3.3. Manglares de la Guajira.....	21
3.4. Área de estudio.....	22
3.4.1 Localización.....	22
3.5. Metabolitos primarios secundarios.....	22
3.5.1 Producción de metabolitos secundarios	23
3.5.2 Uso de metabolitos secundarios.....	23
3.6 Técnicas.....	23
3.6.1. Bioinformática.....	24
3.6.2 Marco legal.....	24
3.7. Factores de estrés.....	24

3.7.1. Salinidad.....	25
3.8 Resistencia bacteriana.....	25
3.8.1 Mecanismos de resistencia.....	25
4. DISEÑO METODOLÓGICO.....	28
4.1 Universo.....	28
4.1.1 Población.....	28
4.1.2 Muestra.....	28
4.1.3 Variable dependiente.....	28
4.1.4 Variable independiente.....	28
4.1.5 Indicadores.....	28
4.2. Hipótesis.....	28
4.2.1 Variable.....	28
4.2.2 Indicador.....	28
4.2.3 Tipo de investigación.....	28
4.3 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS.....	29
4.3.1 Descripción del lugar de estudio.....	29
4.3.2 Características del lugar de muestreo	30
4.3.3 Extracción de ADN y secuenciación de las muestras.....	30
4.3.4 Análisis bioinformático y bioestadístico.....	31
4.3.5 Revisión bibliográfica.....	31
4.3.6 Clasificación de Actinomicetos.....	31
5. RESULTADOS.....	32
5.1 Abundancias de <i>reads</i> en cada punto de salinidad.....	32

5.2 Vías metabólicas asociados a biosíntesis de antimicrobiano.....	33
5.2.1 Genes y vías metabólicas.....	35
5.3 Clasificación de actinomicetos.....	38
5.4 Clasificación, mecanismo de acción y bacterias involucradas en la biosíntesis de antimicrobianos.....	39
5.5 Análisis de componentes principales de los genes asociados a la resistencia de antimicrobianos.....	41
5.5.1 Genes y vía metabólica asociados a la resistencia.....	41
6. DISCUSIÓN	45
7. CONCLUSIONES.....	50
7.1 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	51
8. ANEXOS.....	69

ÍNDICE DE FIGURAS

	PAG
Figura 1. Organización estructural y fisiológica de los mecanismos de resistencia bacteriana.....	26
Figura 2. Localización de los puntos de muestreo.....	29
Figura 3. PCA de los puntos de salinidad de los genes asociados a la biosíntesis de metabolitos secundario y metabolismo de terpenoides y policétidos.....	33
Figura 4. PCA de los puntos de salinidad de los genes asociados a la resistencia de antimicrobianos.....	41

ÍNDICE DE TABLAS

PAG

Tabla 1. Características de las zonas de muestreo del manglar en estudio en la Guajira Colombia.....	30
Tabla 2. Vías metabólicas de biosíntesis de metabolitos secundarios y terpenoides asociados a antimicrobianos.....	34
Tabla 3. Vías metabólicas y genes asociados a síntesis de antimicrobianos.....	35
Tabla 4. Vías metabólicas asociadas a antimicrobianos, clasificación, mecanismo de acción y filos y géneros de bacterias involucradas en la producción de antibióticos.....	39
Tabla 5. Clasificación de Actinomicetos a nivel de género y especie presentes en el manglar ranchería la Guajira.....	40
Tabla 6. Genes asociados a resistencia de antimicrobianos.....	42



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

**EFFECTO DE LA SALINIDAD SOBRE LA ABUNDANCIA DE GENES ASOCIADOS A
LA SÍNTESIS Y RESISTENCIA DE COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS EN LA
DESEMBOCADURA DEL RÍO RANCHERÍA EN LA GUAJIRA.**

RESUMEN

La salinidad en los manglares afecta la producción de metabolitos secundarios, los cuales son de interés biotecnológico como los compuestos antimicrobianos. Sin embargo, la información de la biosíntesis de metabolitos secundarios, la resistencia microbiana y el efecto de la salinidad en la expresión de los genes en los ecosistemas de manglar es limitada. El objetivo principal de este trabajo fue determinar el efecto de la salinidad sobre la abundancia de genes asociados a la síntesis y resistencia de compuestos antimicrobianos presentes en el suelo rizosférico utilizando metagenómica y bioinformática. Por medio de la extracción de ADN, se secuenciaron en la plataforma Illumina HiSeq y análisis de los datos utilizando la plataforma web MicrobiomeAnalyst y STAMP. Se encontró que las abundancias de genes presentaron diferencias significativas en relación con los gradientes de salinidad baja, media y alta de la comunidad bacteriana del manglar en la desembocadura del Río Ranchería y se estableció la diversidad funcional de los genes con actividad antimicrobiana y la resistencia de estas, siendo Streptomycin biosynthesis la vía más abundante asociada a la síntesis de antimicrobianos en los tres puntos de salinidad y el gen más abundante

K01710 (E4.2.1.46, *rfbB*, *rffG*; dTDP-glucose 4,6-dehydratase) igualmente en los tres puntos de salinidad.

Palabras clave: Metagenómica, bioinformática, genes, actividad antimicrobiana, metabolitos secundarios, resistencia.

Estudiante: Libia Vanessa Daza Giraldo

Asesores: Javier Vanegas Guerrero - Universidad Antonio Nariño y Judith Elena Camacho Kurmen – Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Fecha: 12 de abril del 2019

INTRODUCCIÓN

Acorde al ecosistema, las comunidades microbianas presentan cambios tanto a nivel taxonómico como funcional dando respuesta a las condiciones ambientales⁴. Los microorganismos tienen la capacidad de producir productos naturales más conocidos como metabolitos secundarios que han ayudado al descubrimiento de antibióticos⁵, con el fin de introducir nuevas terapias para la medicina clínica y comercial⁶. Los compuestos antimicrobianos que se han descubierto además de los antibióticos clásicos han sido de origen Actinomicetal. Otros como la eritromicina A, la penicilina G y la estreptomina son de origen bacteriano y fúngico con propiedades terapéuticas exitosas incluyendo el anticanceroso doxorubicina, y los inmunosupresores como la rapamicina y la ciclosporina⁵.

El desarrollo de resistencia bacteriana a antimicrobianos ha sido un problema mundial y epidemiológico, los microorganismos activan mecanismos de resistencia incluyendo la inactivación enzimática, modificación de dianas, formación de biopelículas entre otros¹².

Existen microorganismos no solo capaces de producir compuestos antimicrobianos, sino que también desarrollan una resistencia a estos, se ha reportado que varios microorganismos tienen una resistencia natural o adquirida lo que les confiere ventajas respecto a otros microorganismos y tener la capacidad de sobrevivir⁷⁶. Por otra parte, la inhibición de la actividad antimicrobiana puede darse por el desarrollo de mecanismos de resistencia como el sistema de expulsión activa del antimicrobiano.

Los manglares albergan comunidades microbianas que desempeñan un papel importante en el ecosistema, los filos más abundantes reportados son *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*. A nivel de género *Pseudomonas*, *Geobacter*, *Streptomyces*, *Mycobacterium*, *Desulfovibrio*, *Nitrosococcus*⁷, *Bacillus*, *Lysinibacillus* y *Vibrio*⁸. Dada la condición del ecosistema del manglar las bacterias aumentan su potencial para producir compuestos bioactivos. En la secuenciación del genoma de *Gamma*, *delta* y *alfa Proteobacterias*, *Bacteroidetes* y *Cyanobacterias* se han identificado genes que codifican para enzimas asociadas a la síntesis de antibióticos⁹.

La diversidad microbiana y su potencial para producir compuestos bioactivos y desarrollar resistencia han sido de gran importancia, estudios anteriores han evaluado estos procesos por técnicas dependientes de cultivo, sin embargo, los enfoques metagenómicos han facilitado una descripción más completa de las poblaciones microbianas presentes en los manglares y en ecosistemas costeros¹⁰. Estudios metagenómicos con secuenciación de segunda generación han permitido la identificación de nuevos genes, enzimas, moléculas bioactivas con funciones nuevas o mejoradas y genes asociados a la producción de metabolitos secundarios que permiten contrarrestar los efectos de microorganismos patógenos⁷⁷.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), los mecanismos de resistencia de los microorganismos se han propagado a nivel mundial, imposibilitando la capacidad para tratar enfermedades infecciosas comunes, la prolongación de la enfermedad y la muerte⁸⁵. La resistencia microbiana actualmente es una de las mayores amenazas en salud pública mundial, se estima que 700.000 muertes a nivel mundial son consecuencia de infecciones causadas por microorganismos resistentes a los antibióticos y se espera que la resistencia llegue a 10 millones en el 2050⁸⁶.

Por este motivo es importante la búsqueda de nuevos antibióticos que garanticen la efectividad frente a los microorganismos patógenos. Estudios recientes han encontrado moléculas bioactivas efectivas en ecosistemas marinos a partir de la extracción del genoma que han ayudado al tratamiento de infecciones causadas por bacterias resistentes a antimicrobianos.

1. OBJETIVOS

1.1. General

Determinar el efecto de la salinidad sobre la abundancia de genes asociados a la síntesis y resistencia de compuestos antimicrobianos en la desembocadura del río Ranchería en La Guajira.

1.2. Específicos

1. Determinar el efecto de la salinidad sobre la abundancia de genes asociados a la síntesis de compuestos antimicrobianos en la desembocadura del río Ranchería en La Guajira.

2. Determinar el efecto de la salinidad sobre la abundancia de genes asociados a la resistencia de compuestos antimicrobianos en la desembocadura del río Ranchería en La Guajira.

2. ANTECEDENTES

A mediados de los años 80 Hugenholtz *et al* (1998), microbiólogos comenzaron a cambiar los conceptos de la microbiología clásica y a aceptar la idea de la existencia de una vasta vida de microorganismos no cultivables (99,8% no es cultivable) proponiendo la necesidad de disponer de técnicas no tradicionales para entender el mundo microbiano.

La mayoría de los estudios realizados de la síntesis de antimicrobianos se han enfocado en la acción de hongos y de las bacterias. Estudios realizados en las costas venezolanas realizados por Christophersen *et al.* (1999), obtuvieron extractos de 227 hongos marinos bioactivos; Nielsen *et al.* (1999) obtuvieron el depsido guisinol con actividad antibacteriana a partir del hongo *Emericela unguis*; Malstrom *et al.* (2000) mostraron que se establecen patrones de similitud entre los metabolitos secundarios producidos por diferentes especies pertenecientes al género *Penicillium*, lo cual complementa su identificación²⁷.

Jalal K.C.A *et al.* (2010) reportaron resistencia contra los antimicrobianos de la comunidad bacteriana del suelo del manglar. Las bacterias mostraron un 100% de resistencia a los β -lactámicos (ampicilina, amoxicilina y penicilina), vancomicina, sulfafurazol, gentamicina, eritromicina, tetraciclina, novobiocina, clindamicina y bacitracina. Además, todos los aislamientos bacterianos mostraron un índice de resistencia a múltiples fármacos demostrando la contaminación del medio ambiente. Ellos determinaron los posibles mecanismos de propagación de la resistencia: por transferencia de bacterias entre humanos, transferencia de genes de resistencia entre bacterias (generalmente por plásmidos) y por transferencia de genes entre elementos genéticos por transposones²².

Logesh *et al.* (2012) determinaron el efecto antimicrobiano de los hongos productores de quitosano (*Roccella montagnei* y *Aspergillus niger*), donde se observó que podía inhibir el crecimiento de bacterias de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Incluso

el quitosano es considerado como un agente antimicrobiano, pero se determinó que no es muy efectivo ya que se combina con zinc¹³.

Los productos naturales bioactivos extraídos de ecosistemas marinos ha atraído mucho interés. Zhou *et al.* (2012) aislaron numerosos metabolitos secundarios novedosos de la flora y fauna marina China como los manglares, algas, esponjas, corales y moluscos que mostraron efectos inhibidores de enzimas, citotóxicos y antibacterianos²⁰.

Yuan *et al.* (2013) aislaron azalomycin F de *Streptomyces* sp de suelo de la rizósfera de manglar donde se obtuvo macrólidos polihidroxi (RS-22, guanidilfunfinas, amicinas, nifimicina, malonilnicipimicina, dihidronafimicina, malonil-4,5-dihidronifimicina, surimicinas, entre otros), los cuales son compuestos que poseen una actividad antimicrobiana de amplio espectro y su citotoxicidad es moderada¹⁴.

Xiong *et al.* (2013) determinaron fuentes de metabolitos secundarios bioactivos en ecosistemas marinos, a partir del método de metagenómica donde se identificaron fragmentos como: cetosintasa y la metilmalonil-CoA transferasa de policétidos, gen de la O-metiltransferasa, gen de la monooxigenasa P450, gen de la poliéter-epoxidasa. 5-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa gen, dTDP-glucosa-4,6 gen de la deshidratasa (dTGD) entre otros, los cuales son genes que ofrecen mayor potencial para predecir la producción de nuevos metabolitos secundarios¹⁹.

Por otra parte, se ha demostrado la importancia de nuevos antimicrobianos con amplio espectro para combatir patógenos que han sido resistentes a múltiples fármacos. Sengupta *et al.* (2015) determinaron que los Actinomicetos aislados de manglar tienen alta actividad antimicrobiana frente organismos bacterianos y hongos, la mayor actividad antimicrobiana fue sobre *Vibrio cholerae* y *Staphylococcus aureus* con una concentración mínima inhibitoria de 0.05 mg/ml⁻¹. También inhibió bacterias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa* con una concentración mínima inhibitoria de 0.05 mg/ml⁻¹ (15).

Al-Amoudi *et al.* (2016) determinaron que diferentes bacterias como *Bacillus* sp, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Pseudomonas fluorescens*, entre otro. son capaces de producir compuestos bioactivos con actividad antimicrobiana. Se

identificaron filos en ecosistema costero mediante la secuenciación del gen 16S rRNA como fue *Proteobacterias*, Firmicutes, Planctomycetes, Bacteroidetes y *Actinobacteria*, y genes implicados en la síntesis de compuestos bioactivos como policétidos sintasas tipo I (PKS-I), tipo II (PKS-II) y péptidos no ribosómicos (NRPS)¹⁶.

Cabral *et al.* (2016) determinaron el impacto antropogénico en los sedimentos de manglar respecto a la resistencia de las comunidades microbianas utilizando secuencias de metagenómica y metatranscriptómica para determinar los genes involucrados. Determinaron en las secuencias obtenidas bombas de eflujo de resistencia a múltiples fármacos, seguido de resistencia a la metilina en *Staphylococcus* y *mdtABC* multidroga resistencia. Sin embargo, también encontraron secuencias involucradas en la resistencia de fluoroquinolonas y genes (*acrA*, *acrB*, *gyrA*, *gyrB*) asociados a la resistencia a los antibióticos²³.

Nakayama *et al.* (2017) a partir de un análisis metagenómico en aguas residuales en el delta del río Mekong determinaron genes de resistencia de sulfametoxazol y sulfadimidina (*sul1*, *sul2*), además el gen de resistencia a la β -lactamasa (*blaCTX-M-1*) el cual demostró la contaminación por la actividad humana²⁴.

Demers *et al.* (2018) evaluaron el potencial de los hongos endofíticos derivados del manglar como fuente de nuevos antibióticos, los hongos que producen extractos bioactivos fueron eficaces frente a patógenos bacterianos como *S. aureus* y *Mycobacterium tuberculosis* que mostraron una alta sensibilidad a estos extractos¹⁷.

Alves *et al.* (2018) resaltaron la importancia de los estudios metagenómicos para proporcionar información de nuevos genes, funciones y grupos taxonómicos de interés¹¹. Imchen *et al.* (2018) realizaron un estudio metagenómico donde compararon las estructuras comunitarias taxonómicas y funcionales de los manglares de Brasil y Arabia Saudita, donde se determinó tres genes relacionados con la resistencia a los antibióticos los cuales fueron: proteína CusA del sistema de efusión de cationes, proteína de resistencia a la acriflavina y subunidad A de la topoisomerasa IV⁷.

Gong *et al.* (2018) descubrieron el potencial antimicrobiano y antitumoral de Actinomicetos aislados del suelo de manglar. Ellos aislaron 17 especies de

Streptomyces que fueron identificados mediante la secuenciación del gen de ARN 16S. *Streptomyces sanyensis* fue la especie más dominante, seguida de *Streptomyces griseorubens* y *Streptomyces viridobrunneus* entre otros. Las cepas de actinomicetos presentaron actividad antimicrobiana, incluyendo cepas resistentes a fármacos. Además, detectaron metabolitos secundarios como el péptido sintetasa no ribosómico (NRPS), el policétido sintasa tipo I (PKS-I) y tipo II (PKS-II), demostrando que los actinomicetos aislados de manglar son depósitos de nuevos productos naturales antimicrobianos y antitumorales²¹.

Los manglares son ecosistemas que continuamente están afectados por diversas tensiones ambientales, las cuales hacen que las especies que habitan estos ecosistemas desarrollen mecanismos de resistencia para su supervivencia.

3. MARCO DE REFERENCIA

3.1 Definición manglar

Según el ministerio de ambiente el manglar es un ecosistema marino-costero ubicado en los trópicos y subtrópicos del planeta, en el cual la especie fundamental es el mangle. Los manglares constituyen un ecosistema irremplazable y único, que alberga a una increíble biodiversidad por lo que se los considera como una de las cinco unidades ecológicas más productivas del mundo, con niveles de productividad primaria que superan la de muchos sistemas agrícolas.

En los manglares viven una gran variedad de vegetales, cientos de hongos, y decenas de especies de plantas acuáticas, que son la base productiva del ecosistema. Cuando sus hojas caen alimentan a una enorme diversidad de organismos y también a los ecosistemas vecinos, puesto que exportan parte de esa energía. Es así como favorecen la reproducción de innumerables especies marinas, que desovan en los estuarios y en algunos casos pasan algún periodo de su desarrollo en el ecosistema en busca de alimento y protección. Un 80% de las especies marinas dependen del ecosistema de manglar para subsistir, por lo que la destrucción del mismo incide en la disminución de la pesca⁴⁵.

3.2 Los manglares de Colombia

Los manglares en Colombia tienen una extensión aproximada de 285.049 Ha distribuidas en los litorales Caribe con 90.160.58 Ha y el Pacífico con 194.880 Ha. Aunque los manglares han sido duramente afectados por la tala indiscriminada, obras de infraestructura vial mal planeadas, ampliación de la frontera urbana o contaminación que los han llevado a una degradación significativa, actualmente se pueden ver todavía muchos lugares en donde el manglar se desarrolla a plenitud y las poblaciones viven

de manera armónica con este ecosistema dándole el valor que se merece. Los manglares de la costa pacífica colombiana se precian de ser los más desarrollados y grandes de todo el pacífico americano⁴⁶.

El ecosistema de manglar en Colombia al igual que en muchas partes del mundo, es considerado como un ecosistema estratégico, lo que le confiere un estatus particular. Los ecosistemas estratégicos garantizan la oferta de bienes y servicios ambientales esenciales para el desarrollo sostenible caracterizándose por mantener equilibrios y procesos ecológicos básicos tales como la regulación de climas, del agua, realizar la función de depuradores del aire, agua y suelos, la conservación de la biodiversidad (MADS).

Los manglares constituyen un ecosistema irremplazable y único, que alberga a una extraordinaria biodiversidad, por lo que se los considera como una de las unidades ecológicas más productivas del mundo, con niveles de productividad primaria que superan la de muchos sistemas agrícolas⁴⁷.

3.3 Los manglares de la Guajira

Los manglares en la Guajira son considerados ecosistemas estratégicos y vitales para las comunidades presentes ya que contribuyen a una gran cantidad de material orgánico en el manglar. Además, los manglares que se encuentran en este sitio son protegidos y clasificados como patrimonio paisajístico. Este ecosistema está conformado por sedimentos y materia orgánica exportada dependiendo del tipo de bosque de manglar, de su productividad y de los factores limitantes como lo son físicos y químicos. Estos manglares desarrollan condiciones como: precipitación mínima, periodos áridos prolongados, inundaciones, elevada insolación, y alta presión antrópica⁴⁵.

3.4 Área de estudio

El Río de Ranchería (Guajira) es considerado como autentico patrimonio paisajístico y biológico, se compone de una mezcla de agua dulce como salada y material sedimentario de origen marino, fluvial o terrestre. En cada punto del estuario la salinidad depende de la relación de los volúmenes de agua de mar y de agua de los brazos del rio, la amplitud de las mareas, la topografía, el clima y otros factores que hacen que las condiciones en el manglar sean muy cambiantes. En el Río Ranchería se encuentran bosques de manglar con zonación y parámetros estructurales que son muy variables como las condiciones semiáridas características de esta zona (Guajira)⁴⁹.

3.4.1 Localización

El río Ranchería está ubicado en el municipio de Riohacha que hace parte de la zona de convergencia intertropical, capital del departamento de Guajira y cubre una pequeña parte del municipio de Manaure. Este sistema deltaico está constituido por una serie de lagunas y zonas de manglar, destacando entre estos el Valle de los Cangrejos en el brazo Calancalea y la desembocadura principal del río Ranchería, denominada brazo Riíto, ubicado sobre el límite nororiental de la ciudad⁴⁹.



Figura 1. Localización Rio ranchería Guajira con coordenadas del muestreo

3.5 Metabolitos primarios y secundarios

Como todos los seres vivos, en el metabolismo de los microorganismos se biosintetizan dos tipos de sustancias: metabolitos primarios y secundarios. Los azúcares, los aminoácidos, las proteínas y las grasas son considerados metabolitos primarios; se caracterizan por ser indispensables en los procesos de crecimiento y supervivencia, y existen en cantidades abundantes en los organismos. No menos importantes, los metabolitos secundarios corresponden a una gran variedad de compuestos biosintetizados a partir de los metabolitos primarios. Su cantidad depende de estímulos externos (competencia, infección o limitación de nutrientes). Los metabolitos secundarios se denominan también productos naturales, a los que el ser humano les ha encontrado diferentes aplicaciones para mejorar la calidad de vida; son utilizados como agentes antibacterianos, antifúngicos, antitumorales, antioxidantes, citotóxicos, antiparasitarios y antivirales, entre otros. Se aplican principalmente en farmacología clínica para la terapia humana, pero también son utilizados en la terapia animal y en la agricultura como plaguicidas²⁸.

3.5.1 Producción de metabolitos secundarios de microorganismos de manglar

En los ecosistemas marinos han revelado fuentes importantes de sustancias bioactivas de gran valor para el tratamiento de gran variedad de enfermedades por sus propiedades terapéuticas (antivirales, antiinflamatorias, antioxidantes, antibióticas, entre otras, han sido identificados cerca de 600 nuevos metabolitos de origen marino⁵².

3.5.2 Uso de los metabolitos secundarios

Estudios realizados han demostrado que los metabolitos secundarios como potencial con actividad antimicrobiana, en cuanto a ambiental diversos estudios indican que dichos metabolitos pueden ejercer efecto benéfico sobre los mecanismos de defensa de la planta y el crecimiento de la misma⁵⁰. En el 2004 revelaron la presencia de metabolitos secundarios provenientes de los hongos marinos, aislados de mangles,

entre ellos: *Verruculina enalia* 2606, *Kandelia candel* 1893 y *Xylaria* sp., con potentes y diversas actividades: antifúngicas, antitumorales, e inhibitorias de la acetilcolina esterasa, respectivamente⁵⁴.

3.6 Técnicas para caracterizar la diversidad bacteriana

La metagenómica ha sido considerada como una ciencia que surge de las ciencias genómicas, la cual se refiere al análisis funcional y de secuencia independiente de cultivo de toda la colección de genomas microbianos presentes en diferentes nichos o comunidades ambientales, plantas o animales²⁶. Rondon *et al.* (2000) se han investigado metagenomas de distintos ambientes, incluyendo ecosistemas acuáticos, minas, suelos agrícolas y forestales, entre otros.

El estudio del metagenoma de una muestra nos permite identificar gran parte de las bacterias u otros microorganismos no cultivables, o que solo se conoce una pequeña parte de estos. Todo el material genético podría codificar nuevas o más completas actividades metabólicas, de la misma manera, se pueden emplear métodos de secuenciación masiva que generarán genomas completos de organismos no cultivables⁵⁶. La metagenómica se ha convertido en una poderosa herramienta de estudio para acceder al conocimiento de la fisiología y genética de organismos no cultivables²⁵.

3.6.1 Bioinformática

La bioinformática es considerada un campo científico interdisciplinario que se propone la investigación y el desarrollo de sistemas que faciliten la comprensión del flujo de información desde los genes a las estructuras moleculares, su función química y su conducta fisiológica.

Entre los principales factores que han favorecido el desarrollo de esta disciplina, se encuentra el impresionante volumen de datos sobre secuencias generadas por los distintos proyectos genoma (tanto el humano como el de otros organismos)⁵⁷.

3.6.2 Marco legal

Para el desarrollo comercial de la biotecnología a partir de la biodiversidad, existen políticas con el objetivo de crear condiciones tanto económicas, técnicas, institucionales y legales, que permitan el desarrollo de productos naturales basados en el uso sostenible de la biodiversidad. Estos recursos biológicos, genéticos y sus derivados son estudiados con fines comerciales⁴⁴.

3.7 Efectos de los factores de estrés sobre la expresión de genes en manglares

Existen diferentes tipos de factores físico-químicos de estrés en el ecosistema de manglar como lo es la temperatura del agua, salinidad, concentraciones del oxígeno, pH, materia orgánica. Existen niveles de salinidad con tendencia a ser crucial para el desarrollo de los manglares.

Según el estudio realizado en los manglares de la península de Baja California realizado por Felix *et al* (2011), el factor que mayor afecta en la expresión de genes y en las poblaciones existentes en el manglar ha sido la temperatura y también se observó una variación frente a la salinidad y al pH⁵⁸.

3.7.1 Salinidad

El estrés osmótico ocasionado por sequía, salinidad y frío frecuentemente limita el crecimiento de los seres vivos. Por ejemplo, las plantas responden y se aclimatan a condiciones adversas con una serie de cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares, regulados por múltiples rutas de señalización en respuesta al estrés. Existe una superposición entre los patrones de expresión de los genes inducidos por sequía, salinidad y frío, y se han identificado más de 300 genes inducidos por estos tipos de estrés, y más de la mitad de los genes inducidos por sequía también son inducidos por salinidad, lo que indica la existencia de una intersección aparente entre las respuestas a la sequía y a la salinidad⁵⁹.

3.8 Resistencia bacteriana

La resistencia bacteriana se define como cambios que realiza el microorganismo frente a los medicamentos utilizados para curar infecciones ocasionadas por la bacteria y otros agentes biológicos⁷³.

Según la (OMS) la resistencia bacteriana se ve facilitada por el uso inadecuado de los antimicrobianos, y no solo se ha evidenciado resistencia a medicamentos antimicrobianos si no también antivirales, antiparasitarios y fungicidas⁷⁴, los últimos reportes de la Organización Mundial de la Salud las bacterias multirresistentes han sido *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y varias enterobacteriáceas como *Klebsiella*, *E. coli*, *Serratia*, y *Proteus*, asociándolas a ser adquiridas en ambientes hospitalarios, residencias de adulto mayor y pacientes que necesitan ventiladores y catéteres intravenosos, con una resistencia elevada a numerosos antibióticos incluyendo los carbapenémicos y las cefalosporinas de tercera generación⁹².

3.8.1 Mecanismos de resistencia bacteriana

La resistencia bacteriana puede ser tanto natural como adquirida. La resistencia natural es propia de cada familia, especie o grupo bacteriano, la resistencia adquirida es mediante mutación o transferencia de material genético entre bacterias ya sean relacionadas o diferentes (Figura 1).

Los genes de resistencia pueden estar codificados en el material genético cromosómico o extracromosómico (plásmidos)⁷⁵, utilizando varios mecanismos como: primero transducción, la cual consiste en la transferencia de cualquier parte del genoma bacteriano, segundo conjugación, que es la transferencia de material genético a través de plásmidos la mayoría de esta transferencia de genes asociados a la resistencia de drogas, antisépticos y desinfectantes, como tercero transformación, es la transferencia de genes desde un ADN desnudo de una bacteria previamente lisada a otra bacteria que adquiere esos genes y lo incorpora a su genoma, como cuarto

transposición, movimiento de una sección del ADN a través de un transposon que puede contener genes de resistencia a antibióticos⁸⁵.

En cuanto a la resistencia adquirida las bacterias pueden utilizar diferentes mecanismos de resistencia como:

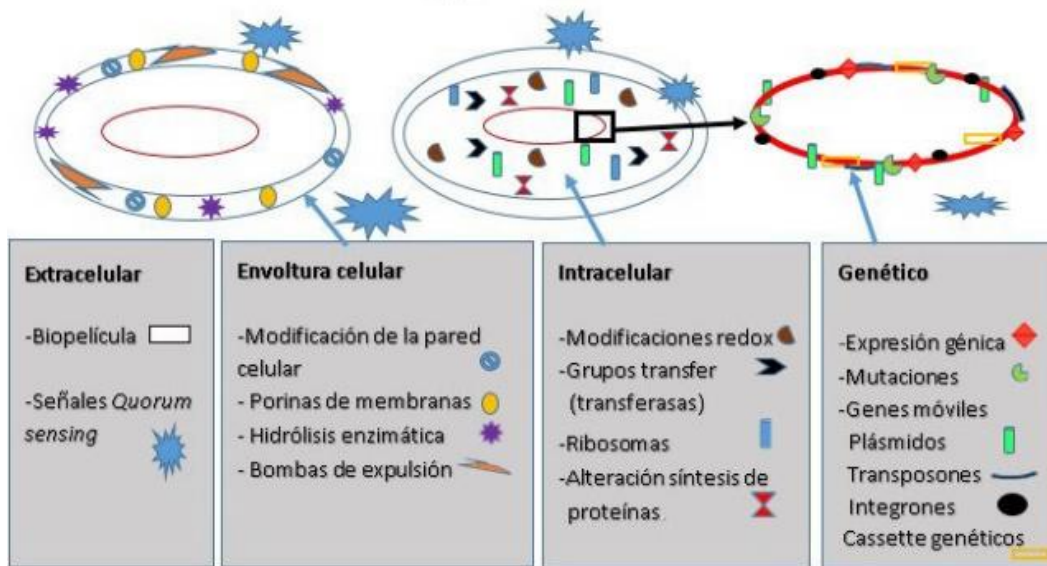


Figura 2: Organización estructural y fisiológica de los mecanismos de resistencia bacteriana. Tomado de: Implicancias Estructurales y Fisiológicas de la Célula Bacteriana en los Mecanismos de Resistencia Antibiótica [Internet]. . Int. J. Morphol [publicado 2017; citado el 4 de febrero de 2019]. Disponible en : <https://scielo.conicyt.cl/pdf/ijmorphol/v35n4/0717-9502-ijmorphol-35-04-01214.pdf>²⁹

La inactivación enzimática que consiste en la inactivación de la hidrolisis, principalmente este mecanismo de resistencia se ve en bacterias Gram negativas ya que la membrana externa de estas bacterias estas formadas por una capa de lípidos la cual es impermeable a sustancias hidrofílicas, estas quedan confinadas a la penetración través de proteínas transmembranales con función de porina, cuando se disminuye la expresión de estas porinas pueden disminuir el flujo de la llegada del antibiótico al espacio periplásmico.

Otro mecanismo es la modificación en el sitio blanco, estas son modificaciones en el gen que codifica el propio blanco del antibiótico donde cambian sus puntos de unión evitando así que el antibiótico ejerza su acción⁸⁸ y por ultimo alteraciones en la

permeabilidad que consiste en la alteración en las membranas bacterianas, alteraciones en la entrada de antibióticos dependiente de energía, aumento de la salida de antibióticos⁷⁵.

4. DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 Universo: Salinidad de los manglares del mundo

4.1.1 Población: Salinidad de los manglares de Colombia

4.1.2 Muestra: Suelo rizosférico de *Avicennia germinans*

4.1.3 Variable Independiente: Expresión de genes dependiendo de la concentración de salinidad

4.1.4 Variable Dependiente: Genes asociados a compuestos antimicrobianos y de resistencia a compuestos antimicrobianos

4.1.5 Indicadores: Suelo de manglar y concentración de salinidad

4.2. Hipótesis

La salinidad influye significativamente sobre la abundancia de genes asociados a la síntesis y a la resistencia de compuestos antimicrobianos en la desembocadura del río Ranchería en La Guajira.

4.2.1 Variable: Salinidad

4.2.2 Indicador: Salinidad del ecosistema y abundancia de genes

4.2.3 Tipo de investigación: Esta investigación pertenece al orden de: Descriptivo experimental

4.3 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS

4.3.1 Descripción del lugar de estudio:

El lugar donde se llevó a cabo el muestreo está ubicado al noreste del municipio Riohacha, capital del departamento de La Guajira, en la orilla de la desembocadura principal del río Ranchería, denominada brazo Riito.

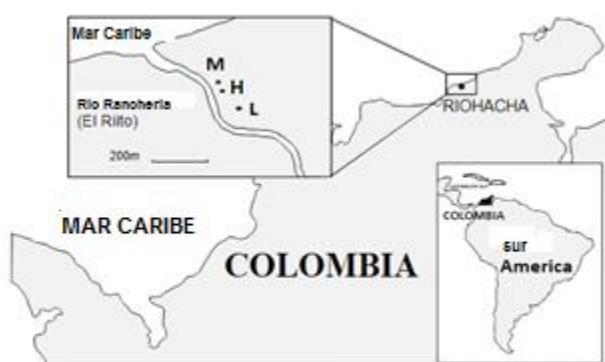


Figura 3: Localización de los puntos de muestreo en la desembocadura del río Ranchería Las tres zonas de muestreo, los niveles de salinidad del agua intersticial, las coordenadas y fecha, se presentan en la tabla 1.

4.3.2 Características del lugar de muestreo

Tabla 1: Características de las zonas de muestreo del manglar en estudio en la Guajira Colombia.

Punto de muestreo	Baja 3L	Media 2M	Alta 4H
Geoposición (Coordenadas WG84)	11°33'08.4"N/ 72°53'59.6"W	11°33'11.4"N/ 72°54'03.5"W	11°33'09.05"N/ 72°54'01.4"W
Fecha del Muestreo	26/Nov/2015	26/Nov/2015	26/Nov/2015
Salinidad del Agua Intersticial	2,80 ppt	14,61 ppt	61,52 ppt

Unidades de salinidad utilizados en el estudio: partes por mil

Las muestras se tomaron de tres zonas del muestreo en el manglar (brazo Riito) del río Ranchería, para la cual se tuvieron en cuenta las zonas que presentaban niveles constantes de salinidad entre ellas. En cuanto al clima en esta zona la precipitación promedio 50.7 mm.a^{-1} , temperatura media anual de 28.2 °C (máximos 33.3 y mínimos 24.1 °C), brillo solar medio diario anual 7.5 horas e irradiación global horizontal de $5.25 \text{ kWh m}^{-2}\text{d}^{-1}$.

En noviembre del 2015 se recolectaron nueve muestras de suelo rizosférico de plántulas de *Avicennia germinans* en tres áreas de salinidad contrastante medidos al momento de realizar el muestreo utilizando un refractómetro portátil de salinidad modelo RF20 marca Extech. De cada área se recolectaron muestras, consistentes en tres plántulas, procesadas independientemente. Las áreas fueron seleccionadas por el nivel conductividad en agua intersticial. Se tomaron muestras (Tabla 1), el transporte y la conservación se realizó en tubos falcón de 50 ml rotulados según los puntos de muestreo y transportadas en neveras con una temperatura de -16°C y almacenadas en el laboratorio una temperatura de -30°C para su óptima conservación.

4.3.3 Extracción de ADN y secuenciación de las muestras

De cada muestra de suelo se extrajo ADN genómico total con el kit PowerLyzer PowerSoil DNA Isolation (MoBio Laboratories, Inc, Carlsbad, CA, USA) siguiendo instrucciones del fabricante del kit. La concentración del ADN se determinó con el fluorímetro Qubit Invitrogen (Life Technologies, CA) y la integridad se evaluó en gel de agarosa al 0.8%. De cada una de las muestras se obtuvo un aproximado de 50 μl de ADN genómico a $40 \text{ ng}/\mu\text{L}$. Las muestras que se obtuvieron fueron secuenciadas con la plataforma Illumina HiSeq2500 2x150 pb paired-end por la universidad de Wisconsin.

4.3.4 Análisis bioinformático y bioestadístico

Para las secuencias que se obtuvieron, se evaluó la calidad mediante el programa FastQC . Se removieron los adaptadores y primers con el software Trimmomatic, usando unos parámetros de LEADING:15, TRAILING:15, SLIDINGWINDOW:4:20 y MINDLEN:100. Se evaluó la calidad, las secuencias limpias fueron analizadas con el software DIAMOND, se compararon contra la base de datos no redundante del de proteínas, se utilizaron los parámetros BLASTx con porcentaje de identidad del 80%, e-valor de 10^{-5} . Se usó un script en python (*in house*) para cambiar los protein id por los gi como se describe en el estudio realizado por Figueroa 2015.

La anotación de términos de KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) de las secuencias se realizó por medio de software MEGAN 5, con los parámetros min-support:25, min-score:80, top-percent:10, Max Expected: 10^5 .

Se utilizó el programa MicrobiomeAnalyst con los metadata obtenidos del software MEGAN 5 para el análisis de los valores de P, mapa de calor y PCA dependientes de la salinidad en este caso (media, baja y alta). El análisis de PCA se llevó a cabo mediante el software STAMP v.2.1.3.

4.3.5 Revisión bibliográfica

Se realizó una revisión bibliográfica utilizando artículos entre 2014 al 2019 para la clasificación de los microorganismos involucrados en la síntesis de antimicrobianos y su mecanismo de acción para determinar cuales estaban presentes en el manglar y cuales estaban involucrados es los procesos y determinar las abundancias en los tres puntos de salinidad (alto 4H, medio 2M y bajo 3L).

4.3.6 Clasificación de Actinomicetos a nivel de genero

Se realizó una clasificación de Actinomicetos utilizando la clasificación taxonómica obtenida en las muestras de manglar con sus respectivas abundancias para determinar las abundancias en los tres puntos de salinidad: alta (4H), media (2M) y baja (3L).

5. RESULTADOS

5.1 Totalidad de *reads* en cada punto de salinidad para los genes asociados a la biosíntesis de antimicrobianos

Se obtuvo 16.509 *reads* asociadas a la biosíntesis de metabolitos secundarios, con un recuento promedio por cada muestra de 917, un conteo máximo de 1.040 y un mínimo de 747. En cuanto al metabolismo de terpenoides y policétidos se obtuvieron 1.311.809 *reads* crudos, con un recuento promedio por muestra 72.878, un recuento máximo de 101.570 y mínimo 34.101. Cada punto con sus réplicas se agrupó de acuerdo a la salinidad alta 61,52 ppm (4H), media 14,61 ppm (2M) y baja 2,80 ppm (3L).

Se obtuvieron 22 pathways de metabolitos secundarios y 68 del metabolismo de terpenoides, con un conteo promedio de abundancias en salinidad alta de 976, media 890 y baja 885. El análisis de componentes principales (PCA) agrupó los genes con actividad antimicrobiana según el nivel de salinidad con una variabilidad del 77% de la categoría de metabolitos secundarios (Figura 1a). en el cuadrante 1 y 2 están distribuidos los genes que presentaron mayor abundancia en salinidad, en el cuadrante 1 y 3 los de salinidad media y baja y en los cuadrantes y salinidad baja en los cuadrantes 3 y 4.

En la figura 2b se obtuvo una variabilidad de 67.7% de los genes con actividad antimicrobiana en los tres puntos de salinidad. En el cuadrante 1 están distribuidos los genes que presentaron mayor abundancia en salinidad media, en el cuadrante 2 y 4 salinidad baja y salinidad alta en los cuadrantes 3.

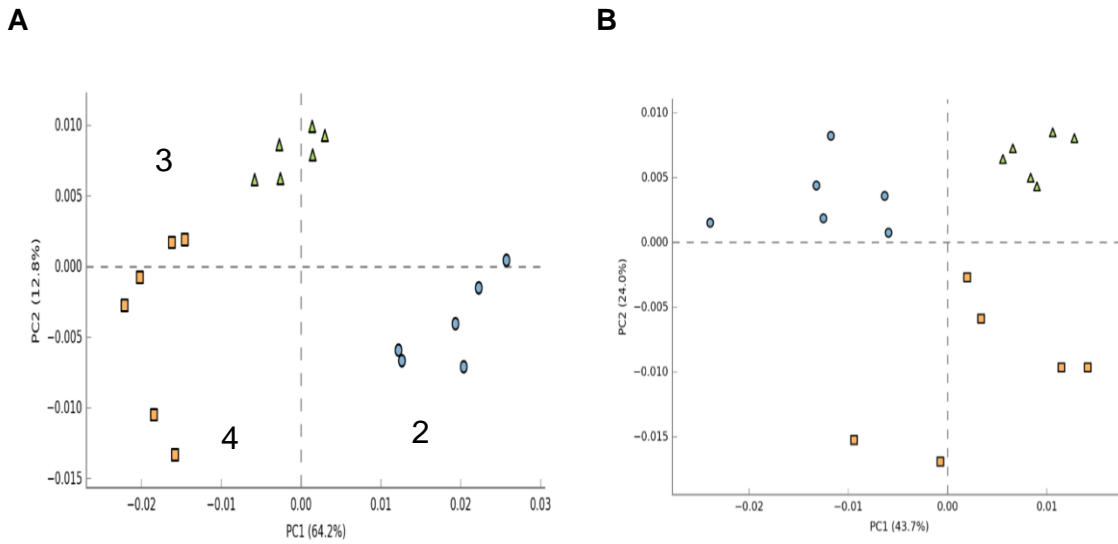


Figura 4. PCA de los puntos de salinidad de los genes asociados a la biosíntesis de metabolitos secundario (a) y metabolismo de terpenoides y policétidos (b), visualización mediante software STAMP v.2.1.3. Salinidad baja (naranja), salinidad media (verde) y salinidad alta (azul).

Elaborado por Libia Vanessa Daza Giraldo.2019

5.2 Vías metabólicas asociados a biosíntesis de antimicrobianos

Los procesos involucrados en la biosíntesis de antimicrobianos correspondieron al grupo de metabolitos secundarios y metabolismo de terpenoides y policétidos, donde se identificaron 11 vías metabólicas (Tabla 2) con 43 genes asociados (Tabla3).

Tabla 2. Abundancia de rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios y terpenoides asociados a compuestos antimicrobianos en tres puntos de salinidad.

Vias metabólicas	Reads por salinidades			Reads %	P valor	FDR	Genes/ reportados en KEGG
	4H	2M	3L		(ZIG)		
Streptomycin biosynthesis [KO00521]	190,45	174,4	165,98	29,46	*	0.041	10/18
Monobactam biosynthesis [KO00261]	171,65	166,23	165,09	27,92	*	0.008	11/28
Biosynthesis of vancomycin group antibiotics [KO01055]	89,25	77,18	90,37	14,25	*	0.008	1/29
Prodigiosin biosynthesis [KO00333]	77,07	77,98	75,88	12,82	***	0.006	3/20
Carbapenem biosynthesis [KO00332]	44,34	37,39	34,1	6,43	*	0.008	2/19
Novobiocin biosynthesis [KO00401]	34,88	31,32	35,77	5,66	**	0.016	7/30
Biosynthesis of secondary metabolites - unclassified [KO00999]	14,79	12,62	11,47	2,16	**	0.020	2/20
Penicillin and cephalosporin biosynthesis [KO00311]	5,78	4,66	4,4	0,82	*	0.073	5/15
Neomycin, kanamycin and gentamicin biosynthesis [KO00524]	1,08	1,53	1,26	0,21	**	0,002	1/57
Biosynthesis of enediyne antibiotics [KO01059]	1,94	1,48	1,05	0,20	-	-	2/73
Tetracycline biosynthesis [KO0053]	0,12	0,16	0,06	0,02	-	-	1/17

p valor (*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$), FDR y el número de genes encontrados para cada ruta en comparación con el número de genes reportados en KEGG. Los pathways que no tienen diferencias significativas están marcados con un guion.

Elaborado por: Libia Vanessa Daza Giraldo.2019

De las 11 vías metabólicas 9 fueron significativamente influenciados por la salinidad, excepto biosíntesis de antibióticos de enediynes y biosíntesis de tetraciclina. seis fueron influenciadas por la salinidad alta (biosíntesis de estreptomycin, biosíntesis de monobactámicos, biosíntesis de carbapenémicos, biosíntesis de metabolitos secundarios, biosíntesis de penicilinas y cefalosporinas y biosíntesis de enediynes), tres vías para la salinidad media (biosíntesis de prodigiosina, biosíntesis de neomicina, kanamicina y gentamicina y biosíntesis de tetraciclina), y dos vías para salinidad baja (biosíntesis de antibióticos de grupo de vancomicina y biosíntesis de novobiocina).

Biosíntesis de estreptomycin fue el proceso con mayor porcentaje en las abundancias en los tres puntos de salinidad con un 29,48%, seguido de biosíntesis de monobactámicos con 27,92 y biosíntesis de antibióticos de grupo de vancomicina con 14,25%.

5.2.1 Genes y vías metabólicas asociadas a la síntesis de antimicrobianos

Tabla 3. Vías metabólicas y genes asociados a síntesis de antimicrobianos en salinidad alta (4H), media (2M) y baja (3L)

Genes involucrados en vías metabólicas asociados a la síntesis de antimicrobianos	KEGG	3L	2M	4H	Reads %	P value
Streptomycin biosynthesis						
E4.2.1.46, <i>rffB</i> , <i>rffG</i> ; dTDP-glucose 4,6-dehydratase [EC:4.2.1.46]	K01710	63,52	63,96	77,1	19,30%	**
<i>INO1</i> , <i>ISYNA1</i> ; myo-inositol-1-phosphate synthase [EC:5.5.1.4]	K01858	25,68	34,57	37,2	3,88%	***
E2.7.7.24, <i>rffA</i> , <i>rffH</i> ; glucose-1-phosphate thymidyltransferase [EC:2.7.7.24]	K00973	25,28	25,95	29,9	3,23%	***
<i>pgm</i> ; phosphoglucomutase [EC:5.4.2.2]	K01835	21,4	21,83	19,3	2,49%	/
<i>pmm-pgm</i> ; phosphomannomutase / phosphoglucomutase [EC:5.4.2.8 5.4.2.2]	K15778	11,26	9,53	8,86	1,18%	/
E3.1.3.25, <i>IMPA</i> , <i>suhB</i> ; myo-inositol-1(or 4)-monophosphatase [EC:3.1.3.25]	K01092	8,09	7,27	7,99	0,93%	/
<i>rffC</i> , <i>rmlC</i> ; dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase [EC:5.1.3.13]	K01790	4,82	5,2	4,93	0,60%	/
<i>iolG</i> ; myo-inositol 2-dehydrogenase / D-	K00010	3,14	3,24	3,02	0,37%	/

chiro-inositol 1-dehydrogenase [EC:1.1.1.18 1.1.1.369]						
<i>glk</i> ; glucokinase [EC:2.7.1.2]	K00845	1,26	1,53	1,08	0,15%	/
<i>rfbD</i> , <i>rmlD</i> ; dTDP-4-dehydrorhamnose reductase [EC:1.1.1.133]	K00067	1,54	1,33	1,05	0,16%	/
Monobactam biosynthesis						
<i>sat</i> , <i>met3</i> ; sulfate adenylyltransferase [EC:2.7.7.4]	K00958	23,58	31,52	40,4	3,80%	***
<i>asd</i> ; aspartate-semialdehyde dehydrogenase [EC:1.2.1.11]	K00133	30,04	28,5	31,7	3,59%	**
<i>lysC</i> ; aspartate kinase [EC:2.7.2.4]	K00928	24,51	26,5	29	3,18%	***
<i>cysD</i> ; sulfate adenylyltransferase subunit 2 [EC:2.7.7.4]	K00957	27,03	22,63	18,3	2,71%	***
<i>dapA</i> ; 4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase [EC:4.3.3.7]	K01714	20,27	20,41	20,35	2,43%	/
<i>cysNC</i> ; bifunctional enzyme CysN/CysC [EC:2.7.7.4 2.7.1.25]	K00955	19,68	17,78	12,6	1,99%	***
<i>dapB</i> ; 4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase [EC:1.17.1.8]	K00215	8,27	7,39	8,93	0,98%	*
<i>cysN</i> ; sulfate adenylyltransferase subunit 1 [EC:2.7.7.4]	K00956	7,55	7,17	5,79	0,82%	**
<i>thrA</i> ; bifunctional aspartokinase / homoserine dehydrogenase 1 [EC:2.7.2.4 1.1.1.3]	K12524	2,23	2,56	2,29	0,28%	/
K12526 <i>lysAC</i> ; bifunctional diaminopimelate decarboxylase / aspartate kinase [EC:4.1.1.20 2.7.2.4]	K12526	1,14	1,02	1,58	0,15%	/
<i>mbtH</i> , <i>nocI</i> ; MbtH protein	K05375	0,8	0,75	0,74	0,09%	/
Carbapenem biosynthesis						
<i>proA</i> ; glutamate-5-semialdehyde dehydrogenase [EC:1.2.1.41]	K00147	25,51	28,13	35,2	3,54%	***
<i>proB</i> ; glutamate 5-kinase [EC:2.7.2.11]	K00931	8,6	9,25	9,15	1,08%	**
Novobiocin biosynthesis						
<i>aspB</i> ; aspartate aminotransferase [EC:2.6.1.1]	K00812	16,87	15,73	19,8	2,09%	**
<i>hisC</i> ; histidinol-phosphate aminotransferase [EC:2.6.1.9]	K00817	8,67	8,60	7,32	0,98%	/
<i>tyrC</i> ; cyclohexadieny/prephenate dehydrogenase [EC:1.3.1.43 1.3.1.12]	K00220	5,93	4,48	4,49	0,59%	/
<i>tyrA2</i> ; prephenate dehydrogenase [EC:1.3.1.12]	K04517	1,01	0,99	1,62	0,14%	*
<i>yhdR</i> ; aspartate aminotransferase [EC:2.6.1.1]	K11358	1,8	0,83	0,9	0,14%	*
<i>tyrB</i> ; aromatic-amino-acid transaminase [EC:2.6.1.57]	K00832	1,24	0,45	0,24	0,08%	***
<i>aspC</i> ; aspartate aminotransferase [EC:2.6.1.1]	K00813	0,25	0,24	0,53	0,04%	**
Biosynthesis of secondary metabolites						

<i>acpP</i> ; acyl carrier protein	K02078	11,4	12,55	14,8	1,54%	***
<i>pntE</i> , <i>penE</i> , <i>ptlE</i> ; pentalenolactone D synthase [EC:1.14.13.170 1.14.13.171]	K18091	0,08	0,06	0,03	0,01%	/
Penicillin and cephalosporin biosynthesis						
E3.5.1.11; penicillin amidase [EC:3.5.1.11]	K01434	2,98	3,51	4,73	0,45%	***
<i>cah</i> ; cephalosporin-C deacetylase [EC:3.1.1.41]	K01060	0,44	0,46	0,22	0,04%	/
<i>cefD</i> ; isopenicillin-N epimerase [EC:5.1.1.17]	K04127	0,59	0,43	0,72	0,07%	/
<i>penP</i> ; beta-lactamase class A [EC:3.5.2.6]	K17836	0,26	0,19	0,11	0,02%	*
<i>PENDE</i> ; isopenicillin-N N-acyltransferase [EC:2.3.1.164]	K10852	0,15	0,07	0,01	0,01%	**
Neomycin, kanamycin and gentamicin biosynthesis						
<i>glk</i> ; glucokinase [EC:2.7.1.2]	K00845	1,26	1,53	1,08	0,15%	/
Prodigiosin biosynthesis						
<i>fabG</i> ; 3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase [EC:1.1.1.100]	K00059	38,67	42,27	43,36	4,95%	**
<i>fabI</i> ; enoyl-[acyl-carrier protein] reductase I [EC:1.3.1.9 1.3.1.10]	K00208	29,4	29,83	28,67	3,50%	*
<i>fabD</i> ; [acyl-carrier-protein] S-malonyltransferase [EC:2.3.1.39]	K00645	7,81	5,88	5,04	0,75%	**
Biosynthesis of vancomycin group antibiotics						
E4.2.1.46, <i>rffB</i> , <i>rffG</i> ; dTDP-glucose 4,6-dehydratase [EC:4.2.1.46]	K01710	63,52	63,96	77,1	19,30%	**
Biosynthesis of enediyne antibiotics						
<i>sgcE</i> , <i>mdpE</i> , <i>ncsE</i> , <i>kedE</i> , <i>calE8</i> , <i>pkxE</i> ; enediyne polyketide synthase	K15314	3,8	4,76	4,13	0,08%	/
<i>sgcE10</i> , <i>mdpE10</i> , <i>ncsE10</i> , <i>kedE10</i> , <i>calE7</i> , <i>pkxE10</i> ; enediyne core biosynthesis thioesterase	K15315	0,35	1,19	1,13	0,02%	/
Tetracycline biosynthesis						
<i>ctcP</i> , <i>cts4</i> , <i>prnC</i> ; tetracycline 7-halogenase / FADH2 O2-dependent halogenase [EC:1.14.19.49 1.14.19.-]	K14257	0,12	0,41	0,76	0,03%	/

p valor (***) $p < 0.001$, ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$), FDR, % de *reads*. Los pathways que no tienen diferencias significativas están marcados con un guion.

Elaborado por Libia Vanessa Daza Giraldo. 2019

Se detectaron en total 43 genes en las 11 vías de metabolitos secundarios y metabolismo de terpenoides y policétidos de los cuales 25 genes fueron significativamente influenciados por la salinidad.

En total 14 genes fueron significativamente influenciadas por la salinidad alta, 3 en salinidad media y 5 en salinidad baja con abundancias mayores a 2. En la salinidad alta se presentó la mayor abundancia de genes.

Los genes más abundantes fueron K01710 (*rfbB*, *rffG*) dTDP-glucose 4,6-dehidratase asociado a la biosíntesis de estreptomicina y síntesis de vancomicina, K00059 (*fabG*) 3-oxoacyl-reductase asociado a la biosíntesis de prodigiosina y K00958 (*sat*, *met3*) sulfato adenyltransferase asociado a la biosíntesis de monobactámicos (Tabla 3).

Se encontraron dos genes compartidos involucrados en dos vías metabólicas los cuales fueron K01710 (biosíntesis de estreptomicina y biosíntesis de antibióticos de grupo de vancomicina) y K00845 (biosíntesis de estreptomicina y biosíntesis de prodigiosina).

5.3 Clasificación de Actinomicetos a nivel de género presentes en el manglar ranchería la Guajira

En totalidad se obtuvieron 16 Actinomicetos presentes en el manglar. En salinidad alta ningún Actinomiceto presentó mayor abundancia, sin embargo, en salinidad media se presentó la mayor abundancia en 11 Actinomicetos (*Acidimicrobinae* sp, *Acimicrobiaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Pseudonocardiaceae intrasporangiaceae*, *corynebacterinae* sp, *Micrococcinae* sp, *Microbacteriaceae*, *Solirubrobacte*, *Lamiaceae* y *Demequina*).

El Actinomiceto más abundante en los tres puntos de salinidad fue *Acidimicrobinae* sp (29,51%), seguido de *Acidimicrobiaceae* (14,35%) y por último *Pseudonocardiaceae* (11,92%).

Tabla 4. Género de Actinomicetos presentes en el manglar Ranchería

Genero/especie	3L	2M	4H	Reads %
Acidimicrobineae/sp	464	376	353	29,51%
Acidimicrobineae	360,66	202,3	68,66	14,36%
Corynebacterineae/sp	191,66	123	28,66	7,80%
Pseudonocardineae	140,33	377	7	11,92%
Micromonosporineae	61,66	130	5,66	4,48%
Micrococcineae/demequina	61	0	0,66	1,40%
Corynebacterineae	39	26,66	20	1,95%
Micrococcineae/Intrasporangiaceae	38	25,66	19	1,88%
Micrococcineae/sp	31,33	10,66	4,66	1,06%
Solirubrobacteriaceae	26,66	4,66	2,66	0,77%
Acidimicrobineae	20	14,66	14,33	1,11%
Streptomycineae	17	48,33	19,66	1,93%
Micrococcineae/Mycobacteriaceae	9,33	6	0,33	0,36%
Coriobacterineae/Nocardiaceae	6,33	6,66	6	0,43%
CorynebacterineaeNocardoidaceae	6	8	3,33	0,39%
StreptosporangineaePseudonocardiaceae	3,33	16	1	0,46%

Géneros y especies de Actinomicetos encontrados en el manglar, con sus respectivas abundancias en los tres puntos de salinidad 3L(bajo), 2M (medio) y 4H (alto) y porcentaje de reads.

Elaborado por: Libia Vanessa Daza Giraldo. 2019

5.4 Clasificación, mecanismo de acción y bacterias involucradas en la biosíntesis de antimicrobianos

Tres de las vías metabólicas asociadas a la biosíntesis de antimicrobianos pertenecen al grupo de los B-lactámicos. Las demás vías metabólicas están involucradas en la síntesis de otros grupos de antimicrobianos como los aminoglucósidos (2), las tetraciclinas (1), glucopeptidos (1) y aminocumarinas (1). (Tabla 5).

Tabla 5. Vías metabólicas asociadas a antimicrobianos, clasificación, mecanismo de acción y filos y géneros de bacterias involucradas en la producción de antibióticos.

Pathways de metabolitos secundarios asociados a antimicrobianos	Clasificación	Mecanismo de acción	Filos y géneros
00521 Streptomycin biosynthesis	Aminoglucosido ⁵⁹	Inhibidor de síntesis de proteínas	<i>Streptomyces griseus</i> ⁶⁰
00261 Monobactam biosynthesis	B-lactámico ⁵⁹	Inhibidor de la síntesis de la pared celular	<i>Chromobacterium violaceum</i> ^{61, 62}
00333 Prodigiosin biosynthesis	-	Inhibición de la fosfatasa	<i>Serratia marcescens</i> , <i>Gammaproteobacterias</i> como: <i>Vibrio psychroerythrus</i> y <i>Hahella chejuensis</i> , <i>proteobacterias: actinobacterias (Streptomyces coelicolor)</i> ^{63,64}
00332 Carbapenem biosynthesis	B-lactámico ⁵⁹	Inhibidor de la síntesis de la pared celular	<i>Streptomyces cattleya</i> ⁶⁵
00401 Novobiocin biosynthesis	Aminocumarinas ⁵⁹	Inhibidor de la girasa de ADN	<i>Streptomyces niveus</i> ⁶⁶
00999 Biosynthesis of secondary metabolites – unclassified	Coproducción de antibióticos B-lactámicos ⁵⁹	Inhibidor de la síntesis de la pared celular	<i>Streptomyces</i> ⁶⁷
00311 Penicillin and cephalosporin biosynthesis	B-lactámico ⁵⁹	Inhibidor de la síntesis de la pared celular	<i>Penicillium</i>
00524 Neomycin, kanamycin and gentamicin biosynthesis	Aminoglucosido ⁵⁹	Inhibidor de la síntesis de proteínas	<i>Streptomyces: Streptomyces coelicolor, Streptomyces avermitilis</i> ⁶⁸
01059 Biosynthesis of enediyne antibiotics	Antibióticos antitumorales	-	<i>Actinomycetes</i> ^{69,70}
00253 Tetracycline biosynthesis	Tetraciclina ⁵⁹	Inhibición de la síntesis proteica	<i>Actinomyces, Streptomyces aurofaciens, Streptomyces rimosus, Streptomyces viridifaciens</i> ⁷¹
01055 Biosynthesis of vancomycin group antibiotics	Glucopéptidos ⁵⁹	Inhibición de la síntesis de peptidoglucano	<i>Amycolatopsis orientalis</i> ⁷²

Revisión bibliográfica de los microorganismos involucrados en la síntesis de antimicrobianos, clasificación y mecanismo de acción de antibiótico.

Elaborado por: Libia Vanessa Daza. 2019

5.5 Análisis de componentes principales de los genes asociados a la resistencia de antimicrobianos

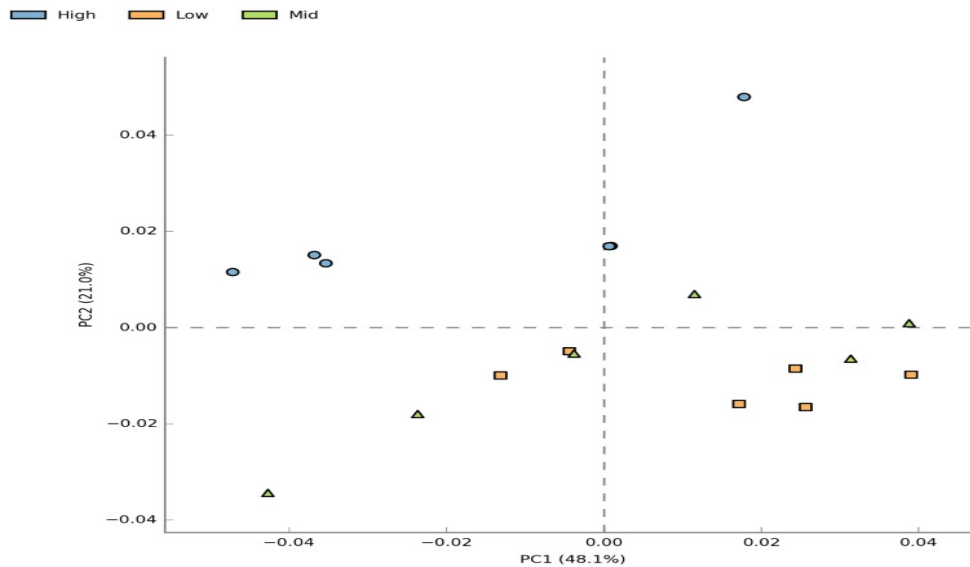


Figura 5. PCA de los puntos de salinidad de los genes asociados a la resistencia de antimicrobianos, visualización mediante software STAMP v.2.1.3. Salinidad baja (azul), salinidad media (verde) y salinidad alta (naranja).

Elaborado por Libia Vanessa Daza Giraldo. 2019

El análisis de componentes principales (PCA) agrupo con una variabilidad del 69.1% los genes de resistencia antimicrobiana según el nivel de salinidad. En el cuadrante 1 y 2 están ubicados los genes que presentaron mayor abundancia en salinidad baja, en el cuadrante 2, 3 y 4 salinidad media al igual que salinidad alta.

5.5.1 Genes y vía metabólica asociados a la resistencia de antimicrobianos

A partir de la categoría de KEGG (antimicrobial resistance genes) se llevó a cabo el análisis en el metagenoma obtenido de las muestras de manglar y el análisis en MicrobiomeAnalyst para determinar las abundancias obtenidas en los tres puntos de salinidad alto 4H, medio 2M y bajo 3L.

Tabla 6. Genes involucrados en la resistencia antimicrobiana

Genes involucrados en resistencia antimicrobiana	KEGG	3L	2M	4H	Reads %	P value
<i>acrB, mexB, adeJ, smeE, mtrD, cmeB</i> ; multidrug efflux pump	K18138	37,81	35,54	40,77	59,95%	*
<i>cusR, copR, silR</i> ; two-component system, OmpR family, copper resistance phosphate regulon response regulator CusR)	K07665	3,70	3,16	5,17	6,33%	***
<i>bpeF</i> ; multidrug efflux pump	K18902	5,10	5,25	4,91	8,02%	/
<i>mexF</i> ; multidrug efflux pump	K18299	3,60	4,34	4,35	6,46%	**
<i>vgb</i> ; virginiamycin B lyase [EC:4.2.99.-]	K18235	1,40	2,42	3,62	3,92%	/
<i>phoP</i> ; two-component system, OmpR family, response regulator PhoP	K07660	1,52	1,49	1,84	2,55%	**
<i>acrA, mexA, adel, smeD, mtrC, cmeA</i> ; membrane fusion protein, multidrug efflux system	K03585	1,92	1,28	1,43	2,44%	/
<i>smvA, qacA, lfrA</i> ; MFS transporter, DHA2 family, multidrug resistance protein	K08167	0,60	0,90	0,76	1,19%	*
<i>vanX</i> ; zinc D-Ala-D-Ala dipeptidase [EC:3.4.13.22]	K08641	0,59	0,62	0,71	1,01%	/
<i>tolC</i> ; outer membrane protein	K12340	1,28	0,61	0,54	1,28%	*
<i>cusS, copS, silS</i> ; two-component system, OmpR family, heavy metal sensor histidine kinase CusS [EC:2.7.13.3]	K07644	0,26	0,13	0,51	0,48%	*
<i>oprM, emhC, tggC, cusC, adeK, smeF, mtrE, cmeC, gesC</i> ; outer membrane protein, multidrug efflux system	K18139	0,37	0,27	0,34	0,53%	/
<i>abcA, bmrA</i> ; ATP-binding cassette, subfamily B, bacterial AbcA/BmrA [EC:7.6.2.2]	K18104	0,18	0,14	0,31	0,34%	*
<i>aac3-I</i> ; aminoglycoside 3-N-acetyltransferase I [EC:2.3.1.60]	K03395	0,47	0,49	0,24	0,63%	/
<i>strB</i> ; streptomycin 6-kinase [EC:2.7.1.72]	K04343	0,12	0,30	0,20	0,34%	*
<i>tetA</i> ; MFS transporter, DHA1 family, tetracycline resistance protein	K08151	0,34	0,19	0,20	0,39%	/
<i>tetM, tetO</i> ; ribosomal protection tetracycline resistance protein	K18220	0,30	0,45	0,20	0,50%	/
<i>aacC</i> ; aminoglycoside 3-N-acetyltransferase [EC:2.3.1.81]	K00662	0,25	0,31	0,17	0,39%	/
<i>vat</i> ; virginiamycin A acetyltransferase [EC:2.3.1.-]	K18234	0,40	0,30	0,14	0,45%	***
<i>oleC4</i> ; oleandomycin transport system ATP-binding protein	K18232	0,39	0,88	0,14	0,74%	*
<i>penP</i> ; beta-lactamase class A [EC:3.5.2.6]	K17836	0,25	0,18	0,10	0,29%	*
<i>mexK</i> ; multidrug efflux pump	K18303	0,33	0,30	0,09	0,38%	/
<i>bpeE</i> ; membrane fusion protein, multidrug efflux system	K18901	0,22	0,16	0,06	0,24%	/
<i>aacA</i> ; aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase [EC:2.3.1.82]	K00663	0,07	0,24	0,06	0,20%	/

<i>oleC5</i> ; oleandomycin transport system permease protein	K18233	0,04	0,11	0,02	0,09%	/
<i>vanRAc</i> ; two-component system, OmpR family, response regulator VanR	K18352	0,14	0,13	0,01	0,16%	*
<i>tetV</i> ; MFS transporter, DHA3 family, tetracycline resistance protein	K18215	0,13	0,09	0,01	0,12%	*
<i>cmr</i> ; MFS transporter, DHA3 family, multidrug efflux protein	K18833	0,47	0,27	0,01	0,40%	***
<i>vanSAc</i> ; two-component system, OmpR family, sensor histidine kinase VanS [EC:2.7.13.3]	K18351	0,16	0,14	0	0,16%	**

Genes asociados a la resistencia antimicrobiana con los conteos de abundancia por puntos de salinidad, porcentaje del conteo total, p valor (*) $p < 0.001$, ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$), FDR. Los genes que no tienen diferencias significativas están marcados con un guion.**

Elaborado por: Libia Vanessa Daza Giraldo. 2019

Después de la normalización se encontraron 29 genes correspondientes a resistencia antimicrobiana (Tabla 6), de los cuales 16 genes fueron significativamente influenciados por la salinidad.

En total seis genes fueron significativamente influenciadas por la salinidad alta (4H): K18138 (*acrB*, *mexB*, *adeJ*, *smeE*, *mtrD*, *cmeB*); K07665 (*cusR*, *copR*, *silR*), K18299 (*mexF*), K07660 (*phoP*), K07644 (*cusS*, *copS*, *silS*) y K18104 (*abcA*, *bmrA*), 3 en la salinidad media (2M): K08167 (*smvA*, *qacA*, *lfrA*), K04343 (*strB*) y K18232 (*oleC4*) y 7 en salinidad baja (3L): K12340 (*tolC*), K18234 (*vat*), K17836 (*penP*), K18352 (*vanRAc*), K18215 (*tetV*), K18833 (*cmr*) y K18351 (*vanSAc*).

Los genes más abundantes fueron K18138 (*acrB*, *mexB*, *adeJ*, *smeE*, *mtrD*, *cmeB*) asociado a la resistencia por bombas de flujo multidroga, K18902 (*bpeF*) y K07665 (*cusR*, *copR*, *silR*).

Los genes asociados a la resistencia microbiana encontrados en el manglar están involucrados en los mecanismos de resistencia como: Bombas de flujo multidrogas (8), virginiamicina B lyase (2), regulador de respuesta PhoP (1), proteína de fusión de membrana (2), proteína de resistencia a múltiples fármacos (1), dipeptidasa Ala-d-Ala (1), aminoglicósido 3-N-acetiltransferasa I (2), estreptomina 6-quinasa (1), proteína de resistencia a la tetraciclina (3), proteína de unión a ATP del sistema de transporte de

oleandomicina (2), beta-lactamasa de clase A (1), regulador de respuesta VanR (1) y sensor de histidina quinasa VanS (1).

6. DISCUSIÓN

Este estudio determinó los genes asociados a la síntesis y resistencia de antimicrobianos y la influencia de la salinidad sobre sus abundancias de un manglar semiárido de la Guajira. Se ha reportado que la salinidad en ecosistemas marinos produce cambios estructurales como funcionales de las comunidades microbianas. Igualmente, los metabolitos secundarios han sido significativamente más abundantes en alta concentración de salinidad⁷⁸.

Los metabolitos secundarios y el metabolismo de terpenoides y policétidos fueron influenciados por la salinidad. La salinidad alta mostró la mayor abundancia de genes involucrados en las vías metabólicas, mientras que la salinidad baja mostró las menores abundancias. En salinidades altas se ha demostrado mayor expresión de algunos genes en este tipo de ambientes salinos^{30,31}. Además, la actividad metabólica de los microorganismos aumenta con la salinidad en estos ecosistemas³², y la abundancia de grupos bacterianos con actividad en síntesis de antimicrobianos³³. De igual manera, se ha determinado que la salinidad influye positivamente sobre el crecimiento, las actividades antimicrobianas y los metabolitos secundarios en hongos aislados del ecosistema marino⁷⁹.

Los productos naturales microbianos marinos tienen actividad biológica como antimicrobianos, antitumorales, antiinflamatorios y anticardiovasculares. Estos productos marinos han desempeñado un papel importante en el tratamiento frente a patógenos que han desarrollado una resistencia frente a otros antimicrobianos⁸¹.

En el manglar, se detectaron las 50 vías registradas en la base de datos de KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) de los metabolitos secundarios y el metabolismo de terpenoides y policétidos, sin embargo, solo se tomaron las vías que estaban asociadas a la síntesis de antimicrobianos, esta diversidad metabólica puede deberse a la diversidad microbiana que albergan estos ecosistemas³⁶.

La vía metabólica más abundante fue biosíntesis de estreptomicina (29,48%) presentando mayor abundancia en salinidad alta (Tabla 2), el cual es un antibiótico

aminoglucósido producido por el actinomiceto del suelo *Streptomyces griseus*, quien actúa interrumpiendo la síntesis de proteínas utilizado principalmente contra bacterias Gram negativas³⁴. Estudios han demostrado el potencial de *Streptomyces* como antimicrobiano aislado de manglares contra microorganismos resistentes a meticilina como lo es *Staphylococcus aureus* quien es un potencial patógeno humano³⁵.

La segunda vía metabólica más abundante en el manglar fue Monobactam biosynthesis (27,92%) el cual es un antibiótico B-lactámico inhibiendo la síntesis de la pared celular en las bacterias Gram negativas³⁷ y se ha aislado naturalmente de *Chromobacterium spp*⁸⁰. Sin embargo, no existe información reportada de la presencia de esta vía metabólica en manglares.

Biosíntesis de antibióticos de grupo de vancomicina fue la tercera vía metabólica (14,25%) con mayor abundancia respecto a los otros pathways asociados a síntesis de antimicrobianos presentando mayor abundancia en el punto de salinidad bajo 3L. La vancomicina es un glucopéptido, producido por *Amycolaptosis orientalis* la cual es capaz de producir cloroeremomicina la cual difiere de la vancomicina⁸². La vancomicina es utilizada para el tratamiento de infecciones potencialmente mortales por bacterias Gram positivos⁷², sin embargo, la vía metabólica no se ha descrito en manglares, pero si se ha encontrado actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina con vancomicina.

Según la base de datos de KEGG 19 genes están involucrados en la ruta biosíntesis de estreptomycin para la síntesis de este antimicrobiano, sin embargo, en el estudio solo se encontraron 10 genes que participan en algún punto de la ruta para la producción de este antimicrobiano (Anexo 1), al igual que en la ruta de biosíntesis de monobactámicos de los 29 genes que están reportados en KEGG 11 fueron encontrados en las muestras de manglar y la ruta de biosíntesis de antibióticos de grupo de vancomicina en la base de datos 29 genes hacen parte de la ruta para la síntesis de este antimicrobiano sin embargo, solo uno presentó abundancias, lo que significa que las vías no presentan todos los genes asociados a dichos procesos y tampoco presentó genes marcadores de esta ruta.

Los genes más abundantes asociados a la síntesis de antimicrobianos K01710 (*rffB*, *rffG*) conformado por la enzima dTDP-glucosa 4,6 deshidratasa la cual es una enzima que pertenece a la familia de las liasas que participa en 4 vías metabólicas entre ellas la de biosíntesis de estreptomicina⁴¹, se ha visto que en el sedimento de ecosistemas salinos los genes dTGD asociados a síntesis de antimicrobianos presentan mayores abundancias⁴².

K00059 (*fabG*) conformado por la enzima 3-oxaacil-(acil-portadora-proteína) reductasa, la cual es una enzima que pertenece a la familia de las oxidorreductasas que participa en la biosíntesis de ácidos grasos y en la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados, que se encuentran en muchas especies de bacterias⁴³, sin embargo, no existen estudios reportados del papel que juega este gen en la síntesis de compuestos antimicrobianos.

El gen K00958 (*sat*, *met3*) sulfato adenylyltransferase desempeña un papel importante en la biosíntesis de monobactam en una reacción intermediaria para el metabolismo de glicina, serina y treonina. Este gen ha sido reportado en ambientes extremos con concentraciones superiores al 20% de NaCl⁸⁹, lo cual es concordante con lo encontrado en este trabajo donde este gen se ve positivamente influenciado por la salinidad alta (61,52 ppm), además se ha descrito en manglares prístinos²³.

En cuanto a las bacterias asociadas a la síntesis de antimicrobianos las actinobacterias son microorganismos naturales en el ecosistema marino que desempeñan un papel importante en el reciclaje de materiales y en la producción de metabolitos secundarios con aplicaciones farmacéuticas⁸².

Entre los diversos géneros *actinobacterianos*, *Actinomadura*, *Acinoplanes*, *Amycolatopsis*, *Marinispora*, *Micromonospora*, *Nocardiopsis*, *Saccharopolyspora*, *Salinispora*, *Streptomyces* y *Verrucosipora* son los que se han descrito como principales productores potenciales de compuestos antimicrobianos⁹¹.

Streptomyces fue uno de los géneros encontrados en las muestras de manglar presentando mayor abundancia en el punto de salinidad bajo (48,33ppm), el género

Streptomyces se ha descrito como fuente de varios medicamentos, incluyendo la vancomicina³⁵.

En cuanto a los genes de resistencia, los manglares son ecosistemas que están expuestos y que se han visto afectados por actividades antropogénicas como lo ha sido la eliminación de desechos. Los microorganismos desarrollan mecanismos para adaptarse y sobrevivir²³.

En el estudio se determinó que los genes involucrados en la categoría (resistencia antimicrobiana) fueron influenciados por la salinidad, sin embargo, la mayoría de las abundancias en los puntos de salinidad fueron menores a 2 (Tabla 6).

El gen más abundante fue K18138 (*acrB*, *mexB*, *adeJ*, *smeE*, *mtrD*, *cmeB*), en salinidad alta, este gen está involucrado en el mecanismo de resistencia de bombas de eflujo se encuentran en la mayoría de las bacterias⁸³ sin embargo se han descrito más en microorganismos Gram negativos, las bombas de eflujo son complejos de proteínas que están en la membrana y eliminan los antimicrobianos y toxinas, las proteínas reconocen y expulsan los antibióticos estructuralmente diversos con diferentes mecanismos y sitios de acción³⁸ los cuales se han descrito en ecosistemas de manglar y marinos^{39,40}.

El segundo gen más abundante asociados a la resistencia de antimicrobianos fue K18902 (*bpeF*), en salinidad media, este gen al igual que el gen K18138 está involucrado en el mecanismo de resistencia de bombas de eflujo. El gen K07665 (*cusR*, *copR*, *silR*) sistema de dos componentes, regulador de respuesta a la resistencia de fosfato y cobre está asociado a la resistencia de imipenem por medio de un mecanismo de represión en las porinas transmembranales OprD quienes permiten la captación pasiva de aminoácidos básicos a través de la membrana externa. Este mecanismo de resistencia permite que microorganismos patógenos como *P.aeruginosa* presenten un aumento en la concentración mínima inhibitoria lo que las hace francamente resistentes a este carbapenémico⁹⁰. Además de ser un gen asociado a la resistencia de antimicrobianos, su papel frente al estrés salino ha sido bien reportado y evidenciándose aquí con la mayor influencia en salinidad alta.

En cuanto al estudio nos centramos en las vías metabólicas y en los genes asociados a la síntesis y resistencia de antimicrobianos en suelo Rizósferico de manglar semiárido en la Guajira Colombia. Una de las limitaciones principales en este estudio es que las vías metabólicas estudiadas no representan todos los genes asociados con tales procesos, sin embargo, la actividad de síntesis de metabolitos ha sido ampliamente descritos en sedimentos de manglar^{9,20}.

Por lo tanto, se sugiere las aproximaciones metagenómicas de la síntesis y resistencia de antimicrobianos sean correlacionadas con los datos metatranscriptómicos por técnicas analíticas como construcción de bibliotecas clónales o aislamiento de microorganismos asociados a dichos procesos.

7. CONCLUSIONES

Los manglares tienen la capacidad de producir compuestos antimicrobianos a diferentes concentraciones de salinidad, esta actividad en manglares puede estar asociada a la diversidad microbiana que albergan estos ecosistemas, esto se relaciona con la ruta más abundante que fue biosíntesis de estreptomicina.

La alta salinidad presentó la mayor abundancia en las vías metabólicas y genes asociados a la biosíntesis de antimicrobianos, que podría estar relacionado con los mecanismos de tolerancia y salinidad, en totalidad se determinaron 43 genes de los cuales 17 tuvo mayor abundancia en el punto de salinidad alta, 11 en salinidad media y 15 en salinidad baja.

En cuanto a la resistencia antimicrobiana los microorganismos son capaces de desarrollar mecanismos de resistencia a diferentes concentraciones de salinidad, en totalidad se determinaron 29 genes de los cuales 8 tuvo mayor abundancia en el punto de salinidad alta, 9 en salinidad media y 12 en salinidad baja, estos mecanismos pueden deberse a la alta actividad antropogénica de estos ecosistemas, relacionado con el gen más abundante K18138 (*acrB*, *mexB*, *adeJ*, *smeE*, *mtrD*, *cmeB*) quien presentó mayor abundancia en los tres puntos de salinidad alta 4H, media 2M y baja 3L.

La identificación de vías y genes asociados a la síntesis y resistencia de compuestos antimicrobianos son áreas de investigación muy poco estudiadas en manglares y de gran potencial para el desarrollo de nuevos compuestos antimicrobianos para el tratamiento y el conocimiento de los mecanismos de resistencia de los microorganismos.

7.1 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Alzubaidy H, Essack M, Malas TB, Bokhari A, Motwalli O, Kamanu FK et al. Rhizosphere microbiome metagenomics of gray mangroves (*Avicennia marina*) in the sea. [Internet]. Gene 2016 [cited 27 September 2018]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26475934?fbclid=IwAR26xvdOxiNXO0WOdbv_AxU4HjnHg3wxZxTGWMUx8Q34wXCd2m7iiCPdhA
2. Simoes MF, Antunes A, Ottini CA, Amini MS, Alam I, Alzubaidy H et al. Soil and Rhizosphere Associated Fungi in Gray Mangroves (*Avicennia marina*) from the Red sea a Metagenomic Approach. [Internet]. Genomics Proteomics Bioinformatics 2015-1;576(2 Pt 1):626-36 [cited 27 September 2018]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26475934?fbclid=IwAR26xvdOxiNXO0WOdbv_AxU4HjnHg3wxZxTGWMUx8Q34wXCd2m7iiCPdhA
3. F.V, Ullah I, SA.A, Backhsh SA, M.Y, AL-Ghamdi AAK et al. Isolation, diversity, and biotechnological potential of rhizo and endoohytix bacteria associated with mangrove plants from Saudi Arabia [Internet]. Genet Mol Res. 2017 –jun, 20;16(2). [cited 29 September 2018]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28653740?fbclid=IwAR3KdGVje1u1qtPV0E2-p42yqvAiu10LcpwM5_9BMLwbONgc6DPo59Ab9mY
4. Rigonato J, D. Kent A, Gumiere T, Henrique L , Dini Andreote F, Fátima Fiore M. Temporal assessment of microbial communities in soils of two contrasting mangroves [Internet]. Braz J Microbiol. 2018 Jan-Mar; 49(1): 87–96. [cited 29 September 2018]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5790579/>

5. Bikash Baral M. Activation of microbial secondary metabolic pathways: Avenues and challenges [Internet]. PubMed Central (PMC). 2018-Sep; 3(3): 163–178 [cited 17 November 2018]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6190515/>
6. Reen FJ, Romano S, D.W. Dobson A, O’Gara F. The Sound of Silence: Activating Silent Biosynthetic Gene Clusters in Marine Microorganisms [Internet]. Mar Drugs. 2015 Aug; 13(8): 4754–4783 [cited 18 November 2018]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4557003/>
7. Madangchanok Imchen V. Comparative mangrove metagenome reveals global prevalence of heavy metals and antibiotic resistome across different ecosystems [Internet]. PubMed Central (PMC). 2018- 8: 11187. [cited 29 November 2018]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6060162/>
8. F L, Huergo D, Rissi A, S E, Gernet V et al. Influence of ancient anthropogenic activities on the mangrove soil microbiome [Internet]. Science of The Total Environment Volume 645, 15 December 2018, Pages 1-9 [cited 29 November 2018]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969718325798?via%3Dihub>
9. Al-Amoudi S, Razali R, Essack M, Amini M, Bougouffa S, A.C J et al. Metagenomics as a preliminary screen for antimicrobial bioprospecting [Internet]. Sciencedirect.com. 2019 **Vol 594** pages 248-258 [cited 30 December 2018]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037811191630748X>

10. Al-Amoudi S, Razali R, Mohammad M, Bougoffa S, Archer A.C et al. Metagenomics as a preliminary screen for antimicrobial bioprospecting [Internet]. Sciencedirect.com. 2016 [cited 30 december 2018]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037811191630748X?via%3Dihub>
11. Alves L, Westmann C, Lovate G, Viana G, Cabral T, Guazzaroni M. Metagenomic Approaches for Understanding New Concepts in Microbial Science [Internet]. Int J Genomics. 2018-2018: 2312987. [cited 30 december 2018]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6126073/>
12. Galvan V, Garcia A. Determinación de bacteriocinas en muestras de consorcios microbianos nativos de ecosistemas de manglar en el departamento del atlántico, como fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. [Internet]. ResearchGate. 2017 [cited 30 december 2018]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/327534385_determinacion_de_bacteriocinas_en_muestras_de_consorcios_microbianos_nativos_de_ecosistemas_de_manglar_en_el_departamento_del_atlantico_como_fuente_potencial_de_nuevos_tratamientos_biomedicos
13. Logesh AR, Thillaimaharani KA, Sharmila K, Kalaiselvam M, Raffi SM. Production of chitosan from endolichenic fungi isolated from mangrove environment and its antagonistic activity. [Internet] Asian Pac J Trop Biomed 2012 Feb;2(2):140-3 [cited 4 February 2019]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23569884?fbclid=IwAR1jHibwr5IFxXp0Hv667hgehtyhOe1JRx6VVaegd-3LM8gLfFqhvCknHTo>

14. Yuan G, Hong K, Lin H, She Z and Li J. New Azalomycin F Analogs from Mangrove Streptomyces sp. 211726 with Activity against Microbes and Cancer Cells. [Internet] Mar Drugs 201- Mar; 11(3): 817–8293 [cited 4 February 2019]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3705372/?fbclid=IwAR1qUVrUzbnvuob-tKI_DqZ4mnZdkuxXAstcDiXVMDwVlqfU4_xxPAF0yEo
15. Sengupta S, Pramanik A, Ghosh A and Bhattachary M. Antimicrobial activities of actinomycetes isolated from unexplored regions of Sundarbans mangrove ecosystem. [Internet] BMC Microbiol 2015-15:170. [cited 4 February 2019]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4546244/?fbclid=IwAR1qIqYMRqyPeiUkzrqD4PM8uHLtQtj-nh9uwctuWpLSb97ar6lj16nfdK8>
16. Al-Amoudi S, Essack M, Simoes M, Bougoussa S, Soloviev I, Archer J et al. Bioprospeccion de los ecosistemas costeros del Mar Rojo para microorganismos cultivables y su potencial antimicrobiano. [Internet] Mar Drogas 2016 Sep; 14(9): 165. [cited 4 February 2019]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5039536/?fbclid=IwAR1rPPhsfe3tjMCVBSnFMjF7fbbY0LcqZOyyy-TkzDXJA7zOifAVtpN0uJk>
17. Demers D, Knestrick M, Fleeman R, Tawfik R, Azhari A, Souza A et al. Exploitation of Mangrove Endophytic Fungi for Infectious Disease Drug Discovery. [Internet] Mar Drugs 2018-Oct; 16(10): 376. [cited 4 February 2019]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6212984/?fbclid=IwAR2XLYLaXNWgMX1NaD-kAmBv4GMNCHqbSG0mMaPKndEmqDIkrCziMLFm_YI

18. Hugenholtz, P., Goebel, B.M. & Pace, N.R. Impact of CultureIndependent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity. *Journal of Bacteriology* 180(18), 4765- 4774 (1998)

19. Zhi-Qiang Xiong , Jian-Feng Wang , Yu-You Hao , and Yong Wang . Recent Advances in the Discovery and Development of Marine Microbial Natural Products. [Internet] *Mar Drugs* 2013- Mar; 11(3): 700–717. [cited 6 January 2019]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3705366/>

20. Zhou Z and Guo Y. Productos naturales bioactivos de la flora y fauna marina china. [Internet] *APS* 2012 [cited 6 January 2019]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3705366/?fbclid=IwAR0AJycXBrB_DpyfMDgma0vNJmz35bBnU6iDwa_Y4pb7y34fhU49ECmWhTvU

21. Gong B, Chen S, Lan W, Huang Y and Zhu X. Potencial antimicrobino de actinomicetos aislados del suelo de manglar en el mar de Maowei en la costa sur de china. [Internet] *Iran J Pharm Res* 2018-Autumn; 17(4): 1339–1346 [cited 6 January 2019]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6269563/?fbclid=IwAR3n2kkzlhLj5_0V5E6IVxEtp1_sbCIZwX6iscP_vehMhP281cuh2O62gegE

22. Jalal K.C, Fatin N, M.A., Akbar J, Kamaruzzaman Y, Shahbudin S et al. Antibiotic resistance microbes in tropical mangrove sediments in east coast peninsular, Malaysia. [Internet] *ACADEMIC JOURNALS* 2010, **Vol. 4** (8), pp. 640-645 [cited 6 January 2019]. Available from: <https://academicjournals.org/journal/AJMR/article-full-text-pdf/0A0F24012464?fbclid=IwAR2MVJScHhWUIdJkCm7MaS5EEIm0PBuZqxbLrJ7wM2cLZTgchp4e1NNyPso>

23. Cabral L, Lacerda G, Pereira S, Cavalcante A, Dias F, Cadete L, et al. Anthropogenic impact on mangrove sediments triggers differential responses in the heavy metals and antibiotic resistomes of microbial communities. [Internet] ScienceDirect 2016 **Vol.216** pages 460-469 [cited 6 January 2019]. Available from:
https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749116304663?fbclid=IwAR1jJeW9gSyyEzma6viXH8myhavz_ex1nUcvTfK8OHqt_n0vSFGu-HHxOMw
24. Nakayama T, Tuyet T, Harada K, Warisaya M, Asayama M, Hinenoya A et al. Water metagenomic analysis reveals low bacterial diversity and the presence of antimicrobial residues and resistance genes in a river containing wastewater from backyard aquacultures in the Mekong Delta, Vietnam. [Internet] ScienceDirect 2017 **Vol 222** pages 294-306 [cited 6 January 2019]. Available from:
https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749116307345?fbclid=IwAR2tSgPbuh7v_a3WVP41ITxwlhb9ol0ywC4nSZEioPQeENGVeTB52X_tE
25. Hugenholtz, P., Goebel, B.M. & Pace, N.R. Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity. *Journal of Bacteriology* 180(18), 4765- 4774 (1998)
26. Venter, J.C. et al. Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304(5667), 66-74 (2004).
27. Castillo-Machalskis I, DArmas H, Malaver N, Núñez M. Actividad antibacteriana de extractos de hongos aislados de raíces del mangle *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae) en Venezuela [Internet]. Scielo.sa.cr. 2018 [cited 17 September 2018]. Available from:

http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S00347744200700030002

28. HF dos Santos, JC Cury, FL do Carmo, AL dos Santos, J. Tiedje, JD van Elsas, y col. Diversidad bacteriana del manglar y el impacto de la contaminación del petróleo revelado por pirosecuenciación: proxies bacterianos para la contaminación por hidrocarburos PLoS One, 6. [Internet]. (2011) Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018849992007000300004
29. Troncoso C, Pavez M, Santo A, Salazar R, Barrientos L. Implicancias Estructurales y Fisiológicas de la Célula Bacteriana en los Mecanismos de Resistencia Antibiótica [Internet]. Scielo.conicyt.cl. 2017 35(4):1214-1223, [cited 9 January 2019]. Available from: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/ijmorphol/v35n4/0717-9502-ijmorphol-35-04-01214.pdf>
30. Moghaieb R, Saneoka H and Fujita K. Effect of salinity on osmotic adjustment, glycinebetaine accumulation and the betaine aldehyde dehydrogenase gene expression in two halophytic plants, *Salicornia europaea* and *Suaeda maritima* [Internet]. ScienceDirect 2004 **Vol 166** pages 1345-1349 [cited 5 March 2019]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168945204000445?fbclid=IwAR3sVNcFVZGCIpFFVcHEduyzIbLldPBDhZ7CV-U0fArtACSudQF-ZDqFWPM>
31. Munns R. Genes and salt tolerance: bringing them together. [Internet]. NewPhytologist 2005 [cited 5 March 2019]. Available from: <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.14698137.2005.01487.x?fbclid=IwAR3sVNcFVZGCIpFFVcHEduyzIbLldPBDhZ7CV-U0fArtACSudQF-ZDqFWPM>

[d=lwAR2wBmwJcxIC1uiNSuyqU78mCrV99eDJB0GF8uVpQG82RWIhblbKPF0V
as](#)

32. Rietz D.N, Haynes R.J. Effects of irrigation-induced salinity and sodicity on soil microbial activity. [Internet]. ScienceDirect 2003 **Vol 35** pages 845-854 [cited 5 March 2019]. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0038071703001251?fbclid=IwAR3u4NPDp1tYER4_wsTG9KPExiheAr4ohhpNt74DOi3ltKzHEBQOoJ2iOQ

33. Andreote F, Jimenez D, Chaves D, Franco A, Luvizotto D, Fasanella C. The Microbiome of Brazilian Mangrove Sediments as Revealed by Metagenomics. [Internet]. Pubmed 2012 [cited 5 March 2019]. Available from: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371%2Fjournal.pone.0038600&fbclid=IwAR3u4NPDp1tYER4_wsTG9KPExiheAr4ohhpNt74DOi3ltKzHEBQOoJ2iOQ

34. Streptomycin - DrugBank [Internet]. Drugbank.ca. 2018 [cited 9 February 2019]. Available from: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01082?fbclid=IwAR0MzBKRTmmArzcLTzqSfD2JQ0Ug2o61u2UJOZhNccGi2GxqGxZ2ja4LaJE>

35. Kemung H, Tan L, Mehmood T, Chan K.G, Puesparajah P, Goh B.H et al. Streptomyces as a prominent Resource of Futue Anti-MRSA drugs. [Internet]. Front Microbiol 2018- 9:2221. [cited 30 March 2019]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6165876/?fbclid=IwAR1lf6ARufoat25hIHzwYx17V9z_YidZZFNV5U8eFzmEhxXovxUyqMyQvDo

36. Hernandez L, Velazquez I, Orozco M.C, Santoyo G. Metagenómica de suelos: grandes desafíos y nuevas oportunidades biotecnológicas. [Internet]. OYTON 2010 [cited 30 March 2019]. Available from: <http://revistaphyton.fundromuloraggio.org.ar/vol79/HernandezLeon.pdf?fbclid=IwAR1IplBKqhAXFh5ic2XNc8qis8j2H-sRRrawcO6JMjkGQRJJoMyx1ACwzkE>.
37. Monobactámico - EcuRed [Internet]. Ecured.cu. 2008 [cited 9 March 2019]. Available from: <https://www.ecured.cu/Monobact%C3%A1mico?fbclid=IwAR1Fr7bwGCQpVMAH56nIUl0ccOx1myFxor6FtCpki03o9zVe-iqECR9au8>
38. Venter H, Mowla R, Ohene-Agyei T and Ma S. RND-type grup efflux pumps from Gram-negative bacteria:molecular mechanism ans inhibition. [Internet]. Front Microbiol 2015- 6:377 [cited 9 March 2019]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4412071/?fbclid=IwAR27q7WBtS9I9kC0MuBiHdNSqjvYmoBaLo3_qDfd9HGDI0Q3OoQbkA2NZA
39. Long S, Sousa E, Kijjoa A and Pinto M. Marine Natural Products as Models to Circumvent Multidrug Resistance. [Internet]. Molecules 2016 Jul; 21(7): 892 [cited 9 March 2019]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6273648/?fbclid=IwAR0dBdENB1yV8MokVeJ3IAbJEUcqj8PKYxn_aCP-4iDqMZ36UAI6M1cV3kk
40. Capdeville C, Pommier T, Gervais J, Fromard F, Rols J and Leflaive J. Mangrove Facies Drives Resistance and Resilience of Sediment Microbes Exposed to Anthropic Disturbance. [Internet]. Front Microbiol 2018- 9: 3337. [cited 9 March 2019]. Available from:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6340982/?fbclid=IwAR0BKZC_s2JVmMoJytBEn09oBDVITr8iJIG1CKpoDsXLRrrCnr1AsM-GSg

41. rmlB - dTDP-glucose 4,6-dehydratase - Streptococcus mutans serotype c (strain ATCC 700610 / UA159) - rmlB gene & protein [Internet]. Uniprot.org. 2017 [cited 10 March 2019]. Available from: https://www.uniprot.org/uniprot/P95780?fbclid=IwAR1_R5A0ag1Ng093GugOZn6hEVpBqr2ECSXZ99pgp6SlpLyMAImODfG1tk
42. Wei Y, Zhang L, Zhou Z and Yan X. Diversity of gene clusters for polyketide and nonribosomal peptide biosynthesis revealed by metagenomic analysis of the yellow sea sediment. [Internet]. FrontMicrobiol 2018- 9: 295. [cited 10 March 2019]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5835077/?fbclid=IwAR3Ed9KIKI_oVH5SblJnyDf0f_tggqW4ylxBoW77qlh2ri2vIUf6id3_99Y
43. EMBL-EBI I. 3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase (IPR011284) < InterPro < EMBL-EBI [Internet]. Ebi.ac.uk. 2018 [cited 10 March 2019]. Available from: http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR011284?fbclid=IwAR3aSxRV96WKpB41IAOdG7dFKo1-1cjKZG-vj-euBntIO0_8x4D8fl8e5KI
44. Documento Conpes. POLÍTICA PARA EL DESARROLLO COMERCIAL DE LA BIOTECNOLOGÍA A PARTIR DEL USO SOSTENIBLE DE LA BIODIVERSIDAD [Internet]. [consultado 2019 March 29]. Disponible en: <https://www.cbd.int/doc/measures/abs/post-protocol/msr-abs-co-es.pdf>
45. Corporativo Noticias y eventos Noticias Infantil Funcionarios Gestion institucional Recurso humano Evaluación de Desempeño Acuerdos de Gestión Ofertas de Empleo Contratación Planeación G, Gestion institucional Recurso humano Evaluación de Desempeño Acuerdos de Gestión Ofertas de Empleo Contratación Planeación G, Planeación G, Ambiental V, Transparencia y Acceso a la Información Trámites y servicios Peticiones V, Peticiones D et al. Manglares

- [Internet]. Crc.gov.co. 2018 [cited 27 June 2018]. Available from: <http://www.crc.gov.co/index.php/ambiental/ecosistemas-estrategicos/manglares>
46. Lema Vélez, L. and Polanía, J. (2018). Estructura y dinámica del manglar del delta del río Ranchería, Caribe colombiano. [online] Scielo.sa.cr. Available at: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S003477442007000100003&script=sci_art_text [Accessed 27 Jun. 2018]
47. USO SOSTENIBLE, MANEJO Y CONSERVACIÓN DE LOS ECOSISTEMAS DE MANGLAR [Internet]. Cinto.invemar.org.co. 2002 [cited 17 September 2018]. Available from: http://cinto.invemar.org.co/alfresco/d/d/workspace/SpacesStore/472dde51-ccb9-4d50-b5a9-8538a02fbff2/Usosostenible,%20manejo%20y%20conservaci%C3%B3n%20de%20los%20ecosistemas%20de%20manglar%20en%20Colombia?ticket=TICKET_cb6ebc94ede6370a0a11a98bc931ffa9061d9d73
48. DISPERSIÓN Y ESTABLECIMIENTO DE LAS ESPECIES DE MANGLE DEL RÍO RANCHERÍA EN EL PERÍODO DE MÁXIMA FRUCTIFICACIÓN [Internet]. Observatorioirsb.org. 2018 [cited 24 July 2018]. Available from: <http://observatorioirsb.org/web/wp-content/uploads/2015/11/dispersion-y-establecimiento-de-las-especies-de-mangle-del-rio-rancheria-en-el-periodo-de-maxima-fructificacion.pdf>
49. Vanessa L.R.NogueiraaLidianne L.RochaaGeórgia B.ColaresaAlysson LiraAngelima et al. Microbiomes and potential metabolic pathways of pristine and anthropized Brazilian mangroves. [online] Regional Studies in Marine Science 2015-**Vol2** pages 56-64. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352485515000407>

50. COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA [Internet]. Repository.javeriana.edu.co. 2018 [cited 17 September 2018]. Available from: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/9003/CMPUJ%20L098.pdf?sequence=1>
51. Iglesias O., Díaz N., Cabranes Y., Acevedo M., et al. The seaweed of Cuban's shelf as source of bioactive extracts. [online] Departamento de Bioactivos Marinos y Productos Naturales 2003-16: 36-45. Available from : <http://www.oceandocs.org/bitstream/handle/1834/2918/Macroalgas%20de%20la%20plataforma%20insular%20cubana.....pdf?sequence=1>
52. KEGG PATHWAY: Carbapenem biosynthesis and de Penillin and Cephalosporin Biosynthesis [Internet]. Genome.jp. 2018 [cited 19 September 2018]. Available from: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ko00332.
53. Beltrán V., Díaz C, Gómez H. Tamizaje fitoquímico preliminar de especies de plantas promisorias de la costa atlántica colombiana. [online] universidad de Cartagena 2013. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revcubplamed/cpm2013/cpm134m.pdf>.
54. V, García A. Bacteriocins determination of samples of microbial consortia native mangrove ecosystem in the department of atlantic as a potential source of biomedical new treatments. [Online] Biociencias 2017 Vol. 12, N°. 1, 2017, págs. 37-51. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6228789>

55. Hernández-León R, Velázquez-Sepúlveda I, Orozco-Mosqueda M, Santoyo G. Metagenómica de suelos: grandes desafíos y nuevas oportunidades biotecnológicas [Internet]. Scielo.org.ar. 2018 [cited 18 September 2018]. Available from: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S185156572010000200004&script=sci_arttext&lng=en
56. Solórzano LR., J Arencibia., Conill C., Veloz G., Araújo J. Impacto de la Bioinformática en las ciencias biomédicas. [Internet] ACIMED. 2003 [cited 18 september 2018]. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102494352003000400007
57. Los manglares de la península de baja california [Internet]. Cibnor.repositorioinstitucional.mx. 2018 [cited 18 September 2018]. Available from: https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/900/1/Cap5_Libro_LOS%20MANGLARES%20DE%20LA%20PENINSULA%20DE%20BAJA%20CALIFORNIA.pdf
58. García-Morales S, Gómez-Merino F, Trejo-Téllez L, Herrera-Cabrera É. TRANSCRIPTION FACTORS INVOLVED IN MOLECULAR RESPONSES OF PLANTS TO OSMOTIC STRESS [Internet]. Revistafitotecniamexicana.org. 2018 [cited 19 September 2018]. Available from: <https://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/36-2/2a.pdf>
59. Seija V, Vignoli R. Principales grupos de antibióticos [Internet]. Higiene.edu.uy. 2017 [cited 10 October 2018]. Available from: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA34.pdf>

60. MetaCyc streptomycin biosynthesis [Internet]. Biocyc.org. 2019 [cited 26 November 2018]. Available from: <https://biocyc.org/META/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY-5940>
61. O'Sullivan J e. Biosynthesis of monobactam compounds: origin of the carbon atoms in the beta-lactam ring. - PubMed - NCBI [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov. 1984 [cited 28 February 2019]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6805424>
62. KEGG PATHWAY: map00261 [Internet]. Genome.jp. 2019 [cited 28 February 2019]. Available from: https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?map00261
63. Williams R. Biosynthesis of Prodigiosin, a Secondary Metabolite of *Serratia marcescens* [Internet]. PubMed Central (PMC). 2019 [cited 28 February 2019]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC380817/>
64. KEGG PATHWAY: map00333 [Internet]. Genome.jp. 2019 [cited 28 February 2019]. Available from: https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?map00333
65. Moreno Monge K. CARBAPENÉMICOS: TIPOS Y MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANOS [Internet]. Binasss.sa.cr. 2019 [cited 28 February 2019]. Available from: <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/608/art8.pdf>

66. LA K. Biosynthesis of novobiocin by *Streptomyces niveus*. - PubMed - NCBI [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2019 [cited 28 February 2019]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4680802>
67. KEGG PATHWAY: ko00999 [Internet]. Genome.jp. 2019 [cited 28 February 2019]. Available from: https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ko00999
68. T K. Biosynthetic genes for aminoglycoside antibiotics. - PubMed - NCBI [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2019 [cited 28 February 2019]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19644520>
69. B V. Biosynthesis of enediyne antitumor antibiotics. - PubMed - NCBI [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2008 [cited 28 February 2019]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18397168>
70. KEGG PATHWAY: map01059 [Internet]. Genome.jp. 2019 [cited 28 February 2019]. Available from: https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?map01059
71. B. Pinkens L, Tang Y. Decodificación e ingeniería Biosíntesis de tetraciclina [Internet]. Metab Eng, PMC 2010 [cited 28 February 2019]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3010235/>
72. Mulichak A.M, Losey H.C, T.Walsh C, Garavito R.M. Structure of the UDP-Glucosyltransferase GtfB That Modifies the Heptapeptide Aglycone in the Biosynthesis of Vancomycin Group Antibiotics [Internet]. ScienceDirect. 2001 [cited 3 February 2019]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969212601006165>

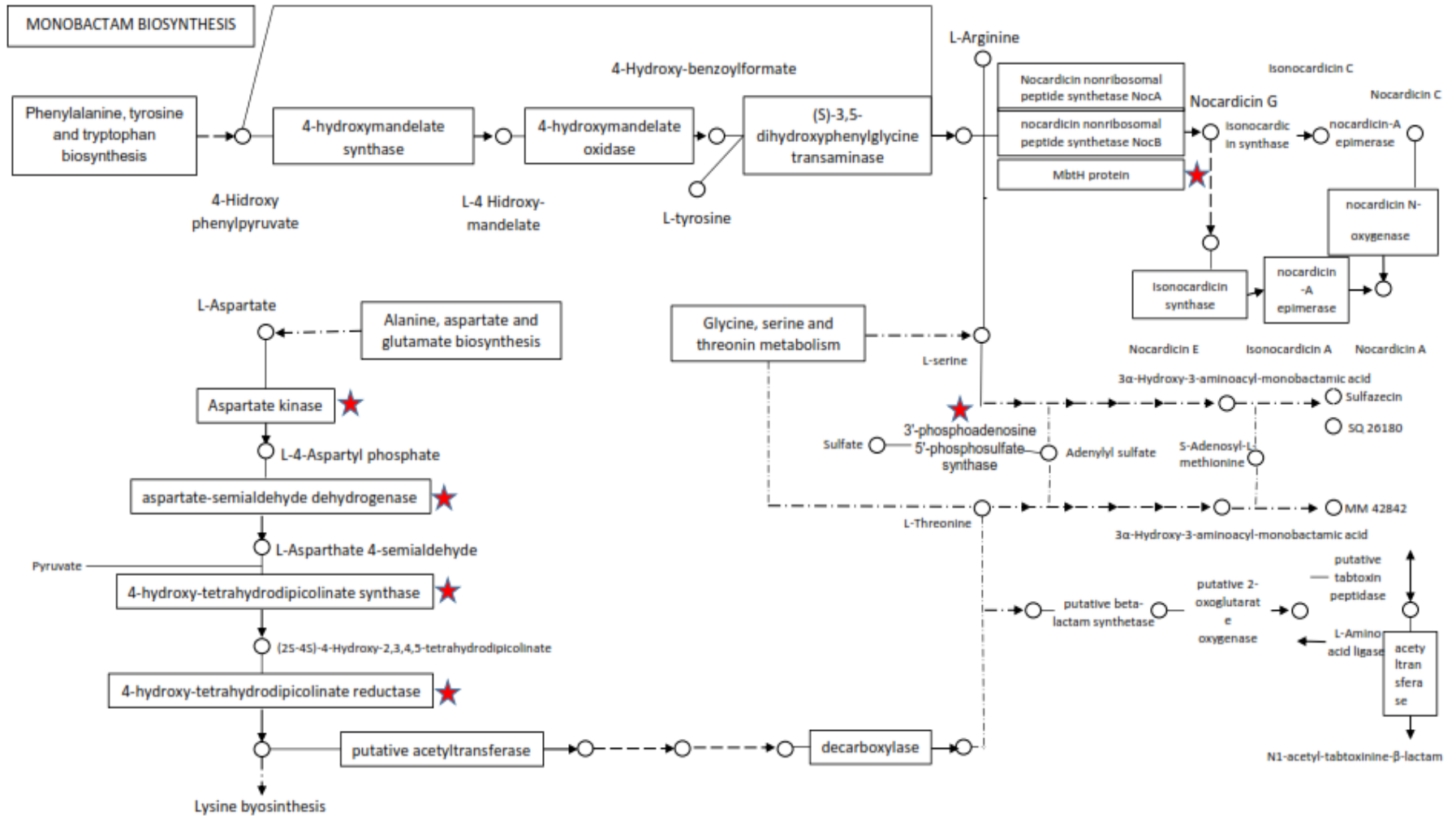
73. Serra Valdés M. La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana [Internet]. Scielo.sld.cu. 2017 [cited 1 February 2019]. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2017000300011
74. Qué es la resistencia a los antimicrobianos? [Internet]. Organización Mundial de la Salud. 2019 [cited 1 February 2019]. Available from: <https://www.who.int/features/qa/75/es/>
75. Seija V, Vignoli R. Principales grupos de antibióticos [Internet]. Higiene.edu.uy. 2019 [cited 10 October 2018]. Available from: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA34.pdf>
76. Díaz Soto L, Riverón F, Hernandez J, Ponce L, Machado C. Resistencia bacteriana [Internet]. Bvs.sld.cu. 2003 [cited 2 January 2019]. Available from: http://www.bvs.sld.cu/revistas/mil/vol32_1_03/mil07103.htm
77. Carbonó V, Cuan A. determinación de bacteriocinas en muestras de consorcios microbianos nativos de ecosistemas de manglar en el departamento del atlántico, como fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos [Internet]. Unilibrebaq.edu.co. 2017 Vol. 12, Núm. 1 [cited 3 January 2019]. Available from: <http://www.unilibrebaq.edu.co/ojsinvestigacion/index.php/biociencias/article/view/867>

78. Frase MW, Gleeson DB, Grierson PF, Laverock B, Kendrick GA. Metagenomic Evidence of Microbial Community Responsiveness to Phosphorus and Salinity Gradients in Seagrass Sediments. *FrontMicrobiol* [Internet]. 2018 Jul 30;9:1703 [cited 2018 Oct 31] 9:17:1703. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30105009>
79. Huang J, Lu C, Qian X, Huang Y, Zheng Z, Shen Y. Effect of salinity on the growth, biological activity and secondary metabolites of some marine fungi. *Acta Oceanol Sin* [Internet]. 2011 May 28 [cited 2018 Nov 1];30(3):118–23. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13131-011-0126-3>
80. Tomoari K, Williams D. Monobactam - an overview. *ScienceDirect Topics* [Internet]. Sciencedirect.com. 2014 [cited 6 January 2019]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/monobactam>
81. Mulichak AM, Losey HC, Walsh CT, Garavito RM. Estructura de la UDP-glucosiltransferasa GtfB que modifica el Heptapéptido Aglicona en la biosíntesis de los antibióticos de grupo de vancomicina [Internet] *Sciencedirect* 2001 **Vol 9** pages 547-557 [cited 2019 January 7]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969212601006165>
82. Hassan SS, Anjum K, Abbas SQ, Akhter N, Shagufta BI, Shah SA, *et al.* ELSEVIER [Internet]. 2017 **Vol 49** pages 34-47 [cited 2019 March]; 49(1):34-47 Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1382668916303039?via%3Dihub&fbclid=IwAR3aF-pR6_jAhoKQ775KfIOJ5GpPRLDU1wUXJFz32ZfYlo-nsuRb_SqnBDY

83. Sun J, Deng Z, Yan A. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations [Internet] Sciencedirec 2014 **Vol 453** pages 254-267 [cited 7 January 2019]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X14009711>
84. Blanco P, Amado SH, Reales JA, Corona F, Lira F, Alcalde M et al. Bombas bacterianas de eflujo multidroga: mucho más que los determinantes de resistencia a los antibióticos [Internet] Microorganisms. 2016 Mar; 4(1): 14. [cited 7 January 2019]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5029519/>
85. Resistencia a los antimicrobianos [Internet]. Who.int. 2019 [cited 14 January 2019]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antimicrobianos>
86. Angles E. Uso racional de antimicrobianos y resistencia bacteriana: ¿hacia dónde vamos?. Rev Med Hered [Internet] Rev Med Hered, Lima 2018 [cited 14 January 2019]. Available from: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018130X201800010001&lng=es .
87. Cabrera C, GÓMEZ R, ZUÑIGA A. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantesuna manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación [Internet]. Redalyc.org. 2019 [cited 2 February 2019]. Available from: <https://www.redalyc.org/html/283/28338208/>
88. Echevarria Z J. Resistencia bacteriana [Internet]. Scielo.org.pe. 2019 [cited 2 February 2019]. Available from: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rmh/v9n2/v9n2e2.pdf>

89. Johnson SS, Chevrette MG, Ehlmann BL, Benison KC. Insights from the Metagenome of an Acid Salt Lake: The Role of Biology in an Extreme Depositional Environment. Janssen PJ, editor. PLoS One [Internet]. 2015 Apr 29 [cited 2019 Apr 11];10(4):e0122869. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0122869>
90. Gómez CA, Leal AL, Pérez M de J, Navarrete ML. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: understanding a dangerous enemy. Rev la Fac Med [Internet]. 2005 [cited 2019 Apr 11];53(1):27–34. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-00112005000100004
91. De Silva PM, Kumar A. Effect of Sodium Chloride on Surface-Associated Motility of *Acinetobacter baumannii* and the Role of AdeRS Two-Component System. J Membr Biol [Internet]. 2018 Feb 2 [cited 2019 Apr 11];251(1):5–13. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00232-017-9985-7>
92. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos [Internet]. Organización Mundial de la Salud. 2019 [cited 1 February 2019]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

Segunda vía más abundante en la síntesis de antimicrobianos (biosíntesis de monobactámicos)



Tercera ruta mas abundante en la sintesis de antimicrobianos (Biosintesis del grupo de antibioticos de vancomicina)

