



ESTUNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DETECCIÓN DE CEPAS DE MYXOBACTERIAS PRODUCTORAS DE
SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

AURORA FELISA LÓPEZ CRUZ



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: MARIA ELSA ESCUDERO GARCÍA

VOCAL: RAQUEL ORTEGA MUÑOZ

SECRETARIO: LUCIANO HERNANDEZ GOMEZ

1er. SUPLENTE: MARTHA GILES GÓMEZ

2° SUPLENTE: JOSE IGNACIO PARAMO RAMIREZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR. ANEXO DEL LAB 1A, DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

M. EN C. RAQUEL ORTEGA MUÑOZ _____

SUPERVISOR TÉCNICO:

DR. JESÚS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE _____

SUSTENTANTE:

AURORA FELISA LÓPEZ CRUZ _____

ÍNDICE

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMEN | 1 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 1.1. Antimicrobianos | 3 |
| 1.2. Bacteriocinas | 14 |
| 1.3. Myxobacterias | 21 |
| 1.3.1. Generalidades | 21 |
| 1.3.2 Ecología y distribución | 23 |
| 1.3.3. Aislamiento, purificación y preservación | 25 |
| 1.3.4. Metabolismo Secundario | 27 |
| 1.3.4.1. Metabolitos con actividad biológica obtenidos de myxobacterias..... | 29 |
| 2. OBJETIVOS | 31 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 32 |
| 3.1. Diagrama de flujo | 32 |
| 3.2. Obtención y preparación de muestras ambientales..... | 33 |
| 3.3. Aislamiento y caracterización de las Myxobacterias..... | 34 |
| 3.4. Obtención de sustancias antimicrobianas..... | 34 |
| 3.5. Selección de cepas multirresistentes | 35 |
| 3.6. Obtención de proteína a partir de los sobrenadantes de los cultivos de las diferentes cepas de Myxobacterias. | 36 |
| 3.7. Pruebas de caracterización del sobrenadante concentrado | 38 |
| 4. RESULTADOS | 41 |
| 4.1. Aislamiento y caracterización de las myxobacterias..... | 41 |
| 4.2. Obtención de sustancias antimicrobianas..... | 43 |
| 4.3. Selección de cepas multirresistentes | 44 |
| 4.4. Obtención de proteína a partir de los sobrenadantes de los cultivos de las diferentes cepas de Myxobacterias. | 45 |
| 4.5. Pruebas de caracterización del sobrenadante concentrado | 49 |
| 5. DISCUSIÓN | 54 |
| 6. CONCLUSIONES | 60 |
| REFERENCIAS | 61 |
| ANEXOS | 64 |

RESUMEN

Los microorganismos producen una extraordinaria variedad de sistemas de defensa, como son las sustancias antimicrobianas. Estos incluyen antibióticos de amplio espectro, subproductos metabólicos tales como el ácido láctico producido por los lactobacilos, agentes líticos tales como lisozimas que se encuentran en muchos alimentos, numerosos tipos de exotoxinas de proteínas y bacteriocinas, las cuales se definen vagamente como restos de proteínas biológicamente activas con un modo de acción bactericida. Este arsenal biológico es notable no sólo en su diversidad, sino también en su abundancia natural. Las bacteriocinas se encuentran en casi todas las especies bacterianas examinadas hasta la fecha y dentro de una especie se producen decenas o incluso cientos de diferentes tipos de bacteriocinas.

En la actualidad, los antimicrobianos son herramientas fundamentales en el tratamiento de infecciones tanto en humanos como en animales, y en la preservación de cultivos agrícolas; destacan entre estas sustancias los antibióticos. Estos poseen un estatus especial; ya que han contribuido a disminuir la mortalidad humana y prolongar la esperanza de vida en diversos países; sin embargo; la prescripción irresponsable, la administración deficiente y el mal seguimiento de los tratamientos con base en estas sustancias, han causado una selección de bacterias patógenas resistentes a ellos y esto ha traído como resultado que ciertas infecciones sean más difíciles de tratar.

Se han buscado alternativas para resolver esta problemática, una de ellas es la búsqueda de especies microbianas diferentes a las comunes, que sean capaces de producir antimicrobianos. Por ello, nosotros proponemos a las myxobacterias como grupo microbiano potencialmente útil para este propósito, ya que este tipo de microorganismos son ubicuos en todo el mundo, nativos del suelo, de metabolismo y ciclo de vida complejo, capaces de degradar diversos polímeros, como celulosa o quitina, de producir compuestos naturales antimicrobianos y

metabolitos secundarios útiles. Este grupo de organismos no ha sido estudiado a profundidad, sin embargo, tiene un gran potencial para ser portador de nuevas sustancias a nivel industrial como una alternativa en la producción de antibióticos específicos, ya que además son depredadoras de otros microorganismos, para lo cual generan compuestos que podrían aislarse y utilizarse en terapias nosocomiales.

El presente trabajo tiene como objetivo el aislamiento y caracterización de cepas de myxobacterias productoras de sustancias antimicrobianas. Para ello se aislaron diferentes cepas a partir de muestras de suelo de la Ciudad de México, a las cuales se les realizó una prueba presuntiva para determinar la capacidad de producir sustancias antimicrobianas. Posteriormente, se procedió a seleccionar aquellas que produjeron mayor inhibición del crecimiento sobre cepas tipo.

Las sustancias antimicrobianas obtenidas fueron probadas a diferentes concentraciones sobre bacterias multiresistentes a antibióticos aisladas a partir de alimentos (pollo, papaya, queso, champiñón). Se realizaron estudios para determinar si la naturaleza de las sustancias antimicrobianas es proteica para así poder saber si las myxobacterias son capaces de producir algún tipo de bacteriocina; esto se determinó por medio de una purificación parcial, tomando en cuenta estudios previos con bacteriocinas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antimicrobianos

1.1.1. Generalidades

Los medicamentos han constituido desde siempre un componente importante de la vida del hombre y de las organizaciones sociales. Se considera medicamento a toda droga, o preparación efectuada con drogas, que por su forma farmacéutica y dosis puede destinarse a la curación, al alivio, a la prevención o al diagnóstico de las enfermedades (Calvo *et al.*, 2009).

Dentro del amplio espectro que comprenden los medicamentos, se encuentran los antimicrobianos (ATM), compuestos que en pequeñas concentraciones del orden de $\mu\text{g/mL}$, son capaces de inhibir el crecimiento o producir la muerte de los microorganismos (Madigan *et al.*, 2004).

Actualmente los ATM solo los constituyen 2 grupos de fármacos: antibióticos y quimioterápicos. Los antibióticos son sustancias químicas producidas por el metabolismo microbiano de bacterias y hongos que tienen la capacidad de matar o inhibir el crecimiento de otros microorganismos, como por ejemplo la penicilina (Waskman, 1947). Los compuestos quimioterápicos son productos obtenidos por síntesis orgánica, como las sulfonamidas (Yamaguchi *et al.*, 2009). Se caracterizan por poseer "toxicidad selectiva"; es decir, que no afectan o son relativamente inocuos para las células del hospedador. La actividad específica de los ATM se debe a su selectividad sobre blancos determinados, que son únicos en los microorganismos o más importantes en ellos que en los humanos (Chambers, 2007). En relación con el tipo de microorganismo sobre los que actúan, los ATM se clasifican en antibacterianos, antivíricos, antifúngicos y antiparasitarios. De aquí en adelante cuando hagamos referencia a ATM se considerarán a aquellos que ejercen actividad antibacteriana y que son producidos por microorganismos (antibióticos).

El primer agente con actividad antimicrobiana fue descubierto por el médico y bacteriólogo alemán Paul Ehrlich, quien tras probar varios productos encontró un derivado arsenical, el producto 606 comercializado en 1910 como Salvarsan®, que poseía una acción específica para poder ser utilizado en el tratamiento de la sífilis, dando lugar así al nacimiento de la quimioterapia antimicrobiana (Yamaguchi y Saga, 2009).

Posteriormente, en el año de 1928 Alexander Fleming encontró una sustancia producida por un hongo (del género *Penicillium*) que inhibía el crecimiento de *S. aureus*, conocida actualmente como penicilina. Mientras tanto Domagk y colaboradores en 1935 descubrieron las sulfonamidas las cuales eran agentes capaces de matar a microorganismos localizados en el torrente sanguíneo (Yamaguchi *et al.*, 2009).

Los ATM ejercen su acción en algunas de las siguientes estructuras o funciones bacterianas (Fig. 1): inhiben la síntesis de la pared celular, alteran la integridad de la membrana citoplasmática, inhiben metabolitos, bloquean la síntesis o las funciones de los ácidos nucleicos (actúan sobre la DNA girasa y RNA polimerasa) e impiden la síntesis proteica (inhibidores de 30 S, 50 S y tRNA) (Utrecht, 2002).

La eficacia del tratamiento de una enfermedad infecciosa depende de la concentración que alcanza el ATM en el sitio de infección, entre otros factores. Esta concentración debe ser suficiente como para inhibir la multiplicación o matar al agente etiológico. Si el sistema inmunológico del hospedador se encuentra intacto y activo, basta con un efecto inhibitor mínimo, como el que proporcionan los bacteriostáticos (sustancias que interfieren con el crecimiento o la multiplicación del microorganismo sin ocasionar la pérdida de su viabilidad). Por otro lado, cuando existe inmunodeficiencia se necesita un agente bactericida para erradicar la infección (Chambers, 2009).

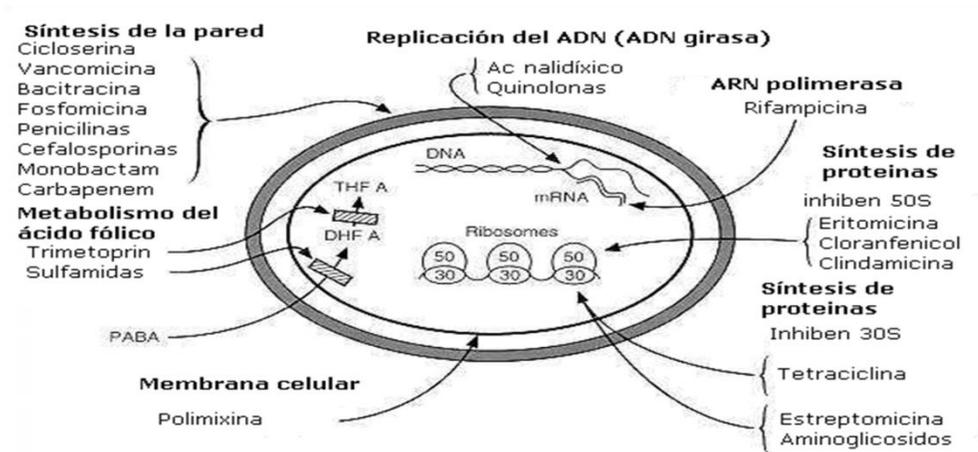


Figura 1. Mecanismos de acción de los antimicrobianos (modificada de Brock,2009)

Es importante destacar que la concentración del fármaco en el sitio de infección no sólo debe inhibir al microorganismo sino también permanecer por debajo de la concentración que es tóxica para las células humanas. Si esto se logra, se considera que el microorganismo es sensible. Cuando la concentración inhibidora o bactericida es mayor de la que se puede utilizar con cierto margen de seguridad *in vivo*, se considera que el microorganismo es resistente (Chambers, 2009).

Los ATM han probado ser extraordinariamente efectivos para el control de las infecciones bacterianas. Sin embargo, luego de que su uso se generalizara en medicina, rápidamente se aislaron patógenos humanos que expresaron resistencia a estos agentes y algunos otros se volvieron rápidamente resistentes a muchas drogas que originalmente eran efectivas. Por ejemplo, *Staphylococcus aureus* desarrolló resistencia a la penicilina a través de la producción de beta-lactamasas a partir de 1954. Esto llevó a una disminución rápida de la utilidad de la penicilina en infecciones por estafilococos, especialmente entre pacientes hospitalizados, donde las cepas resistentes frecuentemente se encuentran antes que se diseminen a la comunidad (Gold *et al.*, 1996).

1.1.2. Uso de antimicrobianos y resistencia bacteriana

Para utilizar ATM en forma óptima y de este modo contribuir con la disminución de la resistencia, es necesario tener una comprensión precisa de la relación entre el uso de ATM y la resistencia. El espectro de conocimiento se extiende desde las interacciones entre las moléculas de antimicrobianos y los blancos microbianos *in vitro*, hasta el efecto ecológico del uso de estos medicamentos, que se estudia a partir de los datos obtenidos a nivel hospitalario o a nivel nacional. La naturaleza de la relación droga-organismo es altamente variable dependiendo de cada caso en particular (MacDougall C. *et al.*, 2005).

La habilidad de diferentes especies bacterianas para resistir la acción inhibitoria de los ATM difiere enormemente de un microorganismo a otro. Bacterias que por décadas habían sido sensibles, han desarrollado resistencia no sólo a las terapias clásicas sino también a agentes más nuevos. Algunas bacterias han desarrollado resistencia a drogas de reciente aparición casi tan pronto como aparecieron en el mercado (Cancho *et al.*, 2000). Podemos mencionar como ejemplo lo que ocurrió con la ciprofloxacina. Cuando se introdujo en el mercado para administrarse por vía oral en 1988, tenía un nivel alto de actividad antibacteriana, incluyendo *Pseudomonas aeruginosa* y *S. aureus* sensible y resistente a la meticilina. Sin embargo, con el transcurso del tiempo, tal como lo comprobó un estudio realizado por Ali y col., se observó que la resistencia a la ciprofloxacina era del 21,95% para los aislamientos de *S. aureus* y del 44,44% para los de *P. aeruginosa* (Ali *et al.*, 2010).

En distintos trabajos se ha descrito una relación temporal fuerte entre los ATM usados y la prevalencia de bacterias resistentes a lo largo del tiempo (Gustafsson *et al.*, 2003). Hay evidencias directas que provienen de estudios que examinan el efecto de bajas dosis de antibióticos usados como promotores de crecimiento en animales y la presencia de bacterias resistentes. También, a nivel hospitalario, en un estudio realizado en Taiwan, una reducción en el uso de los macrólidos (principalmente la eritromicina) se relacionó con una disminución en la tasa de

resistencia a la eritromicina en *Streptococcus pyogenes* (Hsueh et al., 2005) y en Canadá, se demostró una correlación significativa entre el aumento del número de prescripciones de fluoroquinolonas, particularmente ciprofloxacina, y un incremento en la frecuencia de *Streptococcus pneumoniae* con sensibilidad disminuida a ese ATM (Fishman N et al., 2006).

1.1.3. Mecanismos de resistencia bacteriana

Existen diferentes mecanismos para adquirir el fenotipo de resistencia. En general, los mecanismos pueden ser agrupados en dos categorías: resistencia intrínseca y resistencia adquirida.

1.1.3.1. Resistencia intrínseca

Todas las bacterias poseen diferentes mecanismos naturales que les permiten, entre otras cosas, evadir los efectos de los antibióticos. A este tipo de procesos se le ha denominado resistencia intrínseca. Existen diversos tipos de resistencia intrínseca, entre los que destacan los siguientes:

Alteración por mutación de la proteína blanco

En el caso de compuestos sintéticos, es muy improbable que las bacterias empleen mecanismos enzimáticos para su desactivación. Sin embargo, éstas aún pueden desarrollar resistencia a través de mutaciones que pueden hacer a la proteína blanco menos susceptible al agente.

Ejemplo de este tipo de resistencia se da ante las fluoroquinolonas, principalmente por mutaciones en las enzimas blanco de ADN-topoisomerasas. Estas mutaciones no hacen completamente resistente a las bacterias y, además, no permiten la transferencia de diversos genes de resistencia (Nikaido, 2009).

Inactivación enzimática del fármaco

Este tipo de mecanismo es muy común para antibióticos de origen natural como aminoglucósidos inactivados a través de fosforilación enzimática por APH (aminoglucósido fosforiltransferasa), acetilación por ACC (aminoglucósido acetiltransferasa) o adenilación (por aminoglucósido adeniltransferasa o

nucleotidiltransferasa), y β -lactámicos inactivados por hidrólisis enzimática por β -lactamasas, usualmente en el periplasma. Los genes que codifican para estas enzimas pueden fácilmente producir resistencia. Entre los antibióticos más estudiados y que pertenecen a este grupo se encuentran:

- a) Aminoglucósidos: Inactivados por modificaciones que reducen las cargas positivas netas de los antibióticos policatiónicos.
- b) β -lactámicos: Los genes para β -lactamasas son probablemente los más conocidos. Estos genes codifican enzimas que pueden aumentar la catálisis y, por lo tanto, producir un mayor espectro de resistencia (Nikaido, 2009).

Evasión del blanco

El modelo de estudio para este grupo es la vancomicina. Este antibiótico tiene un inusual modo de acción debido a que en vez de inhibir una enzima, se une a un sustrato, el disacárido-pentapéptido, un precursor del péptidoglicano de la pared celular. Se creyó que sería muy difícil que las bacterias generaran resistencia a la vancomicina. Sin embargo, hoy es una realidad entre los enterococos, los cuales son además naturalmente resistentes a las β -lactamasas, aminoglucósidos, macrólidos y tetraciclina (Aleksun *et al.*, 2007).

Bombas de expulsión

Las bombas de expulsión fueron descritas por vez primera en células eucariontes provenientes de pacientes con cáncer. Posteriormente, se describió la presencia de las mismas en células procariontes (Borges-Walmsley *et al.*, 2003). Las bombas de expulsión son proteínas transmembranales altamente específicas. Filogenéticamente, están organizadas en cinco superfamilias: MFS, SMR, RND, ABC y MATE. Las familias RND, SMR y MFS utilizan fuerza protón motriz para realizar su acción, mientras que MATE es impulsada por un sistema antiporte y la familia ABC utiliza ATP (Piddock, 2006).

1.1.3.2. Resistencia adquirida

Transferencia horizontal de genes

Una bacteria puede adquirir material genético por medio de algunos de los tres mecanismos de transferencia horizontal de genes (THG) conocidos: transformación, transducción y conjugación.

- a) La transformación bacteriana ocurre cuando el ADN se encuentra desnudo a causa de la lisis de algunas bacterias; este ADN es adoptado por otras bacterias mediante una recombinación genética (Fig. 2). El gen de resistencia al antibiótico puede ser integrado dentro del cromosoma o en el plásmido de la célula receptora.

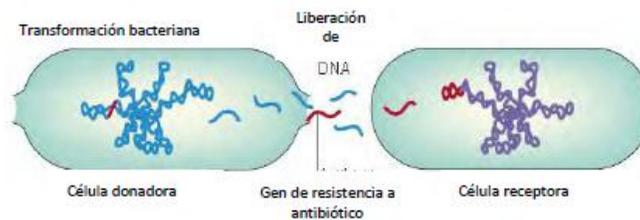


Figura 2. Transferencia de material genético mediante la Transformación (Lowy y Furaya, 2006).

- b) En la transducción, los genes de resistencia al antibiótico son transferidos de una bacteria a otra por medio de bacteriófagos y pueden ser integrados dentro del cromosoma de la célula receptora (Fig. 3). La transducción puede ser generalizada o especializada. En la primera, un ADN bacteriano tanto cromosómico como plasmídico pasa a formar parte del ADN de un hospedero en lugar del genoma del virus. En la segunda, el ADN de una región específica del cromosoma bacteriano se integra directamente en el genoma del hospedero.

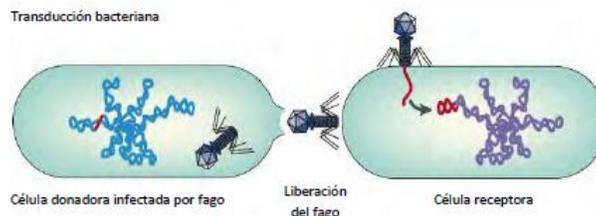


Figura 3. Transferencia de material genético mediante la Transducción (Lowy y Furaya, 2006).

- c) La conjugación ocurre mediante el contacto directo entre dos bacterias y se requiere de una bacteria que contenga un plásmido conjugativo y una

bacteria receptora que carezca de él (Fig. 4) Los genes que regulan la transferencia están situados en una región del plásmido llamada *tra*. Algunos genes de la región *tra* están relacionados con la síntesis de los pili. Los pili permiten el apareamiento específico entre ambas bacterias, dando lugar a la formación de un puente de conjugación por el cual pasa el ADN de una bacteria a otra. El ADN a transferir es el plásmido conjugativo.

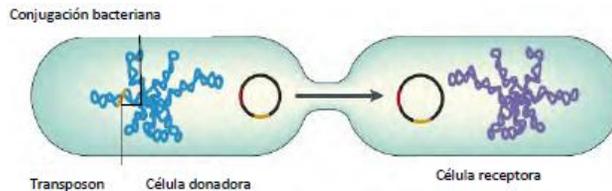


Figura 4. Transferencia de material genético mediante la conjugación (Lowy *et al.*, 2006).

Plásmidos

Un plásmido es un elemento extracromosomal de ADN circular que cuenta con un origen de replicación autónomo y diferentes genes.

La mayor parte de los genes de resistencia son dispersados entre las bacterias a través de plásmidos. Un plásmido puede contener más de un gen de resistencia a antibióticos. De esta manera, en cada evento de conjugación entre las bacterias, se incrementa la dispersión de genes de resistencia. Cuando los plásmidos de resistencia (entonces nombrados plásmidos R) fueron descubiertos en los años cincuenta, muchos de ellos ya contenían genes de resistencia a aminoglucósidos, tetraciclina, cloranfenicol y sulfonamidas (Nikaido, 2009).

Transposones

Un transposón es un elemento genético de gran movilidad que puede existir en plásmidos o integrado en otros transposones o en el cromosoma de la célula hospedera. Están caracterizados por dos componentes principales: repeticiones cortas invertidas en ambos extremos de éste y un gen que codifica para la enzima transposasa, la cual reconoce las repeticiones invertidas y mueve el segmento de ADN flanqueado por ellas de un sitio a otro (Madigan, 2009).

Integrones

Los integrones son plataformas de montaje que incorporan marcos abiertos de lectura exógenos (open reading frames, ORF) que por recombinación sitio-específica se convierten a genes funcionales mediante la aseguración de su correcta expresión. Todos los integrones caracterizados hasta la fecha se componen de tres elementos clave necesarios para la captura de genes exógenos: un gen (*intI*) que codifica para una integrasa que pertenece a la familia de la tirosina-recombinasa, un sitio de recombinación primario (*attI*), y un promotor externo orientado (*Pc*) que dirige la transcripción de los genes capturados (Mazel, 2006). Las integrasas codificadas por el integrón pueden recombinar unidades discretas de ADN circular conocidas como cassettes en una manera independiente de RecA. La integración se produce hacia 3' del promotor *Pc* residente en el sitio *attI*, que permite la expresión de los genes presentes en el cassette.

Una vez integrados, los genes de resistencia son marcados por la secuencia tag, por lo que pueden ser fácilmente integrados a otro integrón, el cual puede contener un juego de genes de resistencia diferentes. Además de esta ventaja de alta movilidad, cuando los genes de resistencia se insertan a un integrón se organizan en un solo operón, con la misma orientación de transcripción bajo un promotor dado por la estructura del integrón (Fluit, 2004).

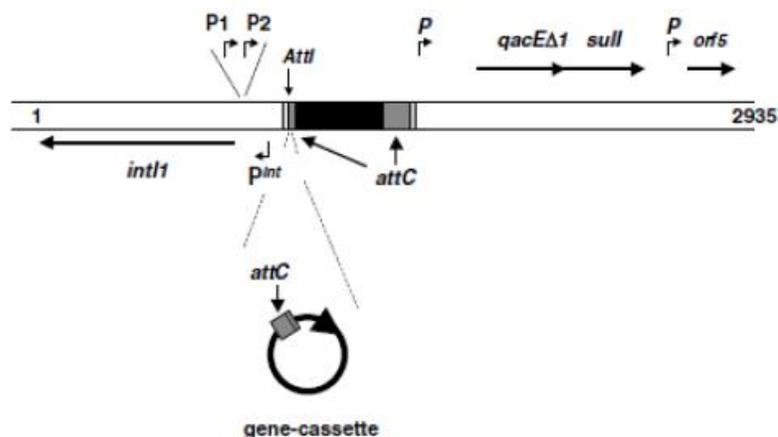


Figura 5. Representación esquemática de un integrón clase 1 (Mazel, 2006).

1.1.4. Fuentes convencionales de antimicrobianos

Los microorganismos son una fuente rica de compuestos útiles y fármacos potenciales con un amplio espectro de actividad biológica y diversidad de estructuras (Pacharawongsakda *et al.*, 2009). Se conocen alrededor de 10000 compuestos diferentes provenientes de microorganismos; cerca del 80% de ellos provienen de procariontes (bacterias), y solo el 20% de eucariontes (principalmente hongos) (Reichenbach, 2001; Weissman y Müller, 2009).

Los hongos son muy utilizados como fuente de compuestos antimicrobianos, por ser organismos ubicuos en prácticamente todo el mundo, muy adaptables y resistentes a los cambios climáticos y químicos (Keller *et al.*, 2005), lo cual les ha permitido adaptarse a multitud de ambientes y desarrollar rutas metabólicas con las que se aprovechan diversos sustratos, o bajo condiciones óptimas y de estrés generan diversos metabolitos que les ayudan a prevalecer sobre especies vecinas (Carillo, 2003; Kabak *et al.*, 2006).

Sin embargo es de las bacterias de las que se obtienen la mayoría de los metabolitos útiles, aunque es limitado el número de géneros que se ha explotado para obtener metabolitos específicamente antimicrobianos. De entre ellos, el género *Actinobacteria* (*Actinomycetes*) es el más recurrido para la obtención de estos metabolitos (Cardona *et al.*, 2009).

Pese a que algunos miembros de este grupo son patógenos, entre ellos *Nocardia basiliensis*, *Actinomyces israeli* y *Streptomyces somaliensis* (Aghamirian y Amir Ghiasian, 2009, Ozgursoy *et al.*, 2008, Park *et al.*, 2008, Welsh *et al.*, 2008), casi dos tercios de los antimicrobianos se obtienen de un solo género de ellas; *Streptomyces* produce alrededor del 70% de los antibióticos a nivel mundial (Cardona *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2008), con alrededor de 8000 compuestos diferentes aislados a partir de ellas, incluidos el cloramfenicol, cicloheximida, estreptomicina, actinomicina y neomicina, ya explotados industrialmente y

comercializados; el resto proviene principalmente del género *Bacillus* y *Pseudomonas* (Reichenbach y Höffle, 1993; Weissman y Müller, 2009).

1.1.5. Fuentes alternativas de antimicrobianos

Los procariotas continúan siendo de gran importancia para conducirnos en la búsqueda de productos naturales bioactivos con valor medicinal (Krug *et al.*, 2008).

Relativamente pocos microorganismos son buenos productores de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana. Entre las bacterias, éste es el caso principalmente de los *Actinomycetales* (alrededor de 8000 compuestos), el género *Bacillus* (1400 compuestos), y las *Pseudomonas* (400 compuestos). Por lo tanto, se han hecho esfuerzos durante muchos años para descubrir nuevos grupos de productores. Esto ha sido logrado, aunque en muy pocos casos. De hecho, sólo dos nuevos grupos de bacterias se han añadido a los productores ya conocidos desde hace 50 años: las cianobacterias y las myxobacterias. En ambos casos, muchos compuestos totalmente nuevos se han encontrado, algunos de ellos con propiedades y posibilidades de aplicación muy interesantes, y se puede esperar, aún más compuestos de ellos (Reichenbach, 2001).

Los antibióticos son los ATM más estudiados y utilizados en ambientes nosocomiales, pero no son las únicas sustancias producidas por bacterias con actividad antimicrobiana; existen también las bacteriocinas, productos proteínicos primarios o modificados (polipéptidos) de síntesis ribosomal, con un sitio biológicamente activo (Bromberg *et al.*, 2004; Khalil *et al.*, 2009), que tienen efecto inhibitorio sobre otras bacterias, incluso a veces entre especies bacterianas relacionadas, excepto para la cepa que los produce, (Chen y Hoover, 2003; Khartikeyan y Santhosh, 2009).

1.2. BACTERIOCINAS

1.2.1. Definición

En 1925 en Bélgica se descubrió que los filtrados de una cepa de *E. coli*, inhibían el crecimiento de otras cepas de la misma especie; con el tiempo se demostró que la sustancia inhibidora era bactericida y se denominó *colicina*. Desde entonces se han realizado aislamientos de agentes similares en varios géneros microbianos que actúan sobre microorganismos taxonómicamente relacionados, o no, con el que las produce; el grupo en conjunto se conoce actualmente como **bacteriocinas** (Freeman, 1989; Jay, 1992; Pelezar, 1991).

Las bacteriocinas son sustancias antibacterianas de origen ribosomal, producidas por una gran cantidad de especies bacterianas. Forman un grupo heterogéneo de moléculas de origen proteico que ejercen acción antimicrobiana sobre bacterias susceptibles. Difieren de los antibióticos en su naturaleza proteica y en su acción sobre especies taxonómicamente relacionadas; además no tienen uso terapéutico ni en humanos ni animales (Jay, 1992).

En la actualidad se someten extractos crudos a diferentes factores fisicoquímicos ya que el efecto de estos sobre la actividad de una bacteriocina no sólo tiene el fin de caracterizarla, sino también sirve para inferir su posible aplicación industrial, ya que las altas temperaturas y las amplias variaciones de pH son, entre otras, algunas de las condiciones que debe resistir una bacteriocina para ser útil como potencial agente inhibidor de microorganismos no deseados en procesos alimenticios (fermentaciones de leche, maduración de quesos, curado de encurtidos, etc.) (Farías, 1996).

1.2.2. Clasificación.

Las bacteriocinas tienen una serie de propiedades bioquímicas comunes como la sensibilidad a la acción de enzimas proteolíticas, debida a su naturaleza proteica, tolerancia a elevadas temperaturas y estabilidad a bajo pH, aunque también difieren en su espectro de actividad, modo de acción, características bioquímicas y

determinantes genéticos, por lo que se han clasificado de la siguiente manera (Kemperman et al, 2003):

- **Grupo I.** Las bacteriocinas de este grupo, llamadas lantibióticos, son pequeños péptidos (<5kDa), con poca estabilidad al calor, que contienen aminoácidos poco comunes como dehidroalanina (DHA), dehidrobutirina (DHB), lantionina y β -metilantionina. Este grupo se divide en dos subgrupos en base a su estructura y funcionalidad.

la) Péptidos catiónicos y alargados. Actúan interfiriendo con la integridad de la membrana del microorganismo objetivo. La Nisina A que es la bacteriocina mejor caracterizada de las producidas por bacterias ácido lácticas, pertenece a éste grupo.

lb) Péptidos globulares, actúan interfiriendo en la función enzimática de la membrana celular.

- **Grupo II.** Son péptidos pequeños (<10kDa), termoestables y sin aminoácidos modificados en su estructura primaria. Se dividen en cuatro subclases:

Ila) Se caracterizan por ser particularmente activas frente a los organismos del género *Listeria spp.* La bacteriocina más estudiada de éste grupo es la pediocina.

IIb) Contiene bacteriocinas cuya actividad depende de la acción complementaria de dos péptidos como la lactococina G.

IIc) Incluye a las bacteriocinas de la clase II que se transportan usando un sistema sec-dependiente.

IId) Son aquellas bacteriocinas del grupo II que no pueden clasificarse en ninguna de las anteriores subclases, como la lactococina A.

- **Grupo III.** Estas bacteriocinas se caracterizan por ser proteínas termolábiles de mayor peso molecular (>30kDa). Hay muy pocas bacteriocinas clasificadas en este grupo (Lantacina A y B, Caseicin, Acidophilucin A, Helveticin J y V-1829) posiblemente por la falta de conocimiento en el tema. (Salminen et al., 2004)

- **Grupo IV.** Las bacteriocinas de este grupo como leuconocina S, lactocina 27 y pediocina SJ-1 tienen una fracción de lípido o carbohidrato. La composición y función de estas porciones no proteicas son desconocidas (Jack, 1995; Montville et al., 1997).

1.2.3. Modo de Acción.

Las bacteriocinas actúan sobre la membrana celular del microorganismo sensible, rompiendo la permeabilidad de la membrana citoplasmática, incrementando la permeabilidad a pequeños compuestos (K^+ , Na^+ , Cl^-), haciendo que las células no sean capaces de proteger al citoplasma del medio ambiente, llevando a la inhibición celular.

Se conocen dos tipos de modos de acción principalmente (Fig. 6):

- **Formación de poros:** los monómeros de bacteriocina enlazados se insertan y polimerizan en la membrana citoplasmática para formar un poro con los residuos hidrofílicos en la cara interior y los hidrofóbicos en la cara exterior (Klaenhammer, 1993; Abee et al., 1994; Chikindas et al., 1993).
- **Efecto detergente:** las bacteriocinas hacen más permeable a la membrana, aumentando la interacción en ésta con el medio ambiente permitiendo la liberación de iones, enzimas y ATP (Sahl, 1985; Chikindas et al., 1993).

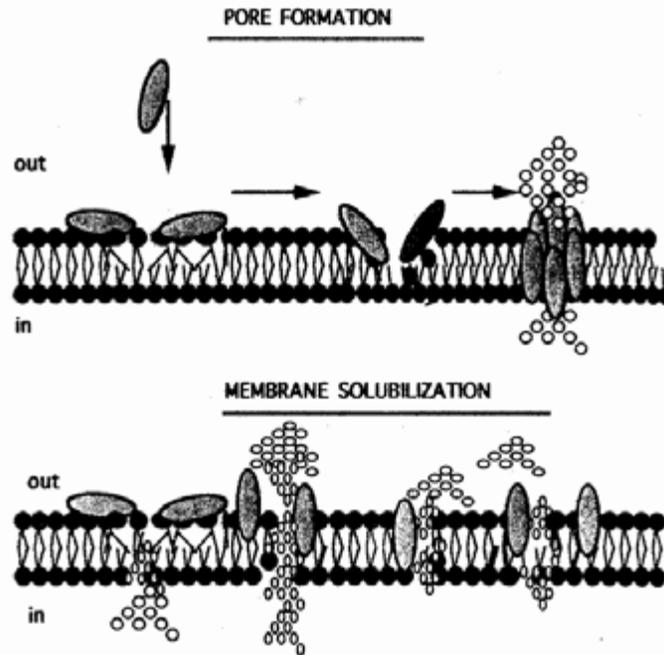


Fig. 6. Modo de acción de las bacteriocinas (Doyle, 1997).

1.2.4. Aplicaciones de bacteriocinas en alimentos

Un amplio rango de bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas (BAL) han sido investigadas intensamente permitiendo su caracterización química detallada (Roos, 1999). Debido a que las BAL han sido usadas por siglos para alimentos fermentados, se consideran como seguras por la FDA (Food and Drug Administration) de Estados Unidos y esto permite su uso en la fermentación de alimentos sin una aprobación adicional. La nisina fue la primer bacteriocina en ser aislada y aprobada para ser usada en alimentos específicamente para prevenir el brote de esporas de *Clostridium botulinum* en quesos distribuidos en Inglaterra (Chung, 1989).

El uso de nisina tiene una larga historia y actualmente es empleada como conservante seguro de alimentos en alrededor de 48 países diferentes siendo aprobada por la FDA en 1988 (Roos, 1999). La atención de los investigadores de bacteriocinas se enfocó en la bacteria *Listeria monocytogenes*, agente causal de listeriosis, ya que la frecuencia de brotes de esta infección aumentó combinada con la resistencia natural del agente causal. Además, el estudio de esta bacteria

fue interesante debido a su capacidad de crecer a temperaturas cercanas a la refrigeración que se utilizan para la preservación tradicional de alimentos. Esto condujo al aislamiento de un gran número de bacteriocinas de clase IIa, las cuales son altamente activas contra *L. monocytogenes* (Ennahar, 2000).

En la actualidad se emplean bacteriocinas para desarrollar envases activos para la conservación de alimentos, este tipo de envase está específicamente diseñado para controlar el crecimiento de los microorganismos que afectan directamente a la estabilidad del alimento, es por ello que las principales tareas que un envase activo debe cumplir son: inocuidad de los alimentos, mantenimiento de la calidad y extensión de vida del producto (Ahvenainen, 2003).

En 2004 Morales ensayó la pediocina en extracto crudo liofilizado producido en M.R.S. (Man, Rogosa y Sharpe, medio de cultivo apropiado para el aislamiento y recuento de lactobacilos y otras bacterias ácido lácticas) y nisina comercial concentrada por rotoevaporación, para desarrollar películas de polietileno antimicrobianas. Por otra parte, se ha estudiado la producción de envases comestibles con diferentes concentraciones de nisina, con lo que se contribuye a disminuir aditivos en los alimentos (Schause *et al.*, 2004).

1.2.5. Aplicaciones de bacteriocinas en ciencias biomédicas

Aunque en la medicina veterinaria se han usado tradicionalmente los antibióticos para el tratamiento profiláctico y terapéutico, las bacteriocinas ofrecen un tratamiento alternativo que puede tener algunas ventajas (Roos *et al.*, 1999).

La idea de usar bacteriocinas en el área veterinaria surgió en los años 1940's. Desde entonces la nisina fue evaluada como una alternativa en el tratamiento de mastitis. Aún cuando la nisina ofreció resultados positivos en el tratamiento de la mastitis, algunos problemas de irritación fueron encontrados, lo cual fue debido posiblemente a impurezas en las preparaciones de nisina (Taylor *et al.*, 1949). Ha

sido demostrado recientemente que la nisina es inhibitoria de los principales patógenos Gram positivos involucrados en la mastitis como cepas de los géneros *Streptococcus* y *Staphylococcus* (Broadbent *et al.*, 1989). La lacticina 3147 también posee actividad bactericida contra la mayoría de las bacterias responsables de la mastitis (Ryan *et al.*, 1998). La lacticina 3147 ha sido investigada en su potencial para inhibir a patógenos humanos resistentes a diversos antibióticos (Galvin, 1999) como es el caso de *S. aureus*, resistente a meticilina; *Enterococcus faecalis*, resistente a vancomicina; *Pneumococcus*, *Propionibacterium acne* y *Streptococcus mutans*, resistentes a penicilina.

El aumento y diseminación rápida de bacterias patógenas multirresistentes a antibióticos ha forzado la consideración de métodos alternativos para combatir infecciones (Roy, 1997).

Una de las limitaciones de usar antibióticos de amplio espectro es que ellos matan a casi cualquier especie bacteriana sensible. Debido al amplio espectro de los antibióticos y al uso inmoderado se ha provocado una presión de selección muy fuerte para la evolución de resistencia a antibióticos tanto en bacterias comensales como con patógenas (Walter, 2001).

Las soluciones actuales a este dilema implica el desarrollo de métodos más racionales de uso de antibióticos, lo cual involucra reducción de la prescripción de drogas para cualquier otra enfermedad que no sean infecciones, el uso alternado de diferentes drogas en un periodo corto de tiempo y la educación de la población acerca de los antibióticos (Lipsitch, 2000). Las bacteriocinas podrían ofrecer una solución alternativa. Con su espectro relativamente reducido de actividad antagónica, las bacteriocinas pueden ser consideradas “drogas diseñadas” cuyos blancos específicos serian bacterias patógenas (Riley *et al.*, 2002). Dada la diversidad de estas moléculas en la naturaleza, será una tarea relativamente sencilla encontrar bacteriocinas activas contra patógenos específicos de humanos.

El desarrollo y uso de dichos antimicrobianos de espectro reducido no solamente aumentará el número de drogas de uso farmacéutico, sino además, prolongará su vida. Esta última característica emerge debido a que con una droga diseñada, cada antibiótico será usado con una frecuencia muy baja, lo cual conllevará a una reducción en la intensidad de selección de resistencia. Desde un punto de vista ecológico y evolutivo, el uso de antimicrobianos de espectro reducido representa una redirección de la abundancia de los patógenos bacterianos multirresistentes (Riley et al., 2002). Esto permitirá una reducción de la muerte colateral de no patógenos, como las especies comensales, con un cambio que permitirá una disminución en niveles de infección nosocomial. Esto también disminuirá la intensidad de selección de resistencia a antibióticos. Así con pocas especies de bacterias antagonizadas por cada droga diseñada, la resistencia a antibióticos evolucionará y se ampliará más lentamente.

Aún falta mucho por investigar con relación al uso de bacteriocinas y no se debe perder en ningún momento de vista que la mayoría de bacteriocinas son proteicas por lo que será necesario evaluar en cada caso si producen respuesta inmunológica en los humanos.

La búsqueda de nuevas alternativas para aminorar el problema de multirresistencia, se ha convertido en una necesidad, por lo cual este estudio presenta el uso de myxobacterias para la producción de compuestos con actividad antimicrobiana, en especial de bacteriocinas, pues se sabe que de un 50-100% de todas las myxobacterias son capaces de producir compuestos con actividad biológica, ya sea antimicrobiana, antifúngica o antitumoral (Gaspari *et al.*, 2005). La capacidad de producir esta variedad de compuestos, podría ser una alternativa para el tratamiento de enfermedades causadas por bacterias que presentan resistencia a los ATM conocidos.

1.3. MYXOBACTERIAS

1.3.1. Generalidades

Las myxobacterias son un grupo de bacterias pertenecientes al orden *myxococcales*, de las *deltaproteobacterias* (Shimkets *et al.*, 2006; Miyashita *et al.*, 2008). Estas poseen características muy distintas de los demás procariontes, su ciclo de vida complejo culmina con la formación de cuerpos fructíferos con células de resistencia o myxosporas. Además son encontradas en gran variedad de ambientes (Reichenbach, 1999; Dawid, 2000; Jiang *et al.*, 2007).

Una de las características que las diferencian de otros grupos de bacterias es su movilidad por deslizamiento, desarrollan una colonia o biofilm delgado y translúcido que migra hacia sustancias atrayentes, por medio de señales intercelulares que conducen el movimiento (Dworkin 1996; Gaspari *et al.*, 2005). Además de esto, estas bacterias al encontrarse en condiciones estresantes forman una estructura multicelular llamada cuerpo fructífero, conteniendo 10^4 - 10^6 células individuales (Holt *et al.*, 1994). Estos tienen gran cantidad de formas, y pueden tener colores brillantes y llegar a medir entre 50 y 500 μm , por lo que podrían verse a simple vista (Dawid, 2000). En la figura 4 se observan cuerpos fructíferos de algunos géneros distintos, se observa la variedad de formas y colores que presentan.

En estos cuerpos fructíferos (Fig. 7), las células vegetativas se convierten en myxosporas, las cuales son resistentes a la desecación y le permiten sobrevivir en ambientes desfavorables, como periodos de frío y calor, sequedad, pH ácido o condiciones anóxicas (Dawid, 2000; Shimkets *et al.*, 2006).

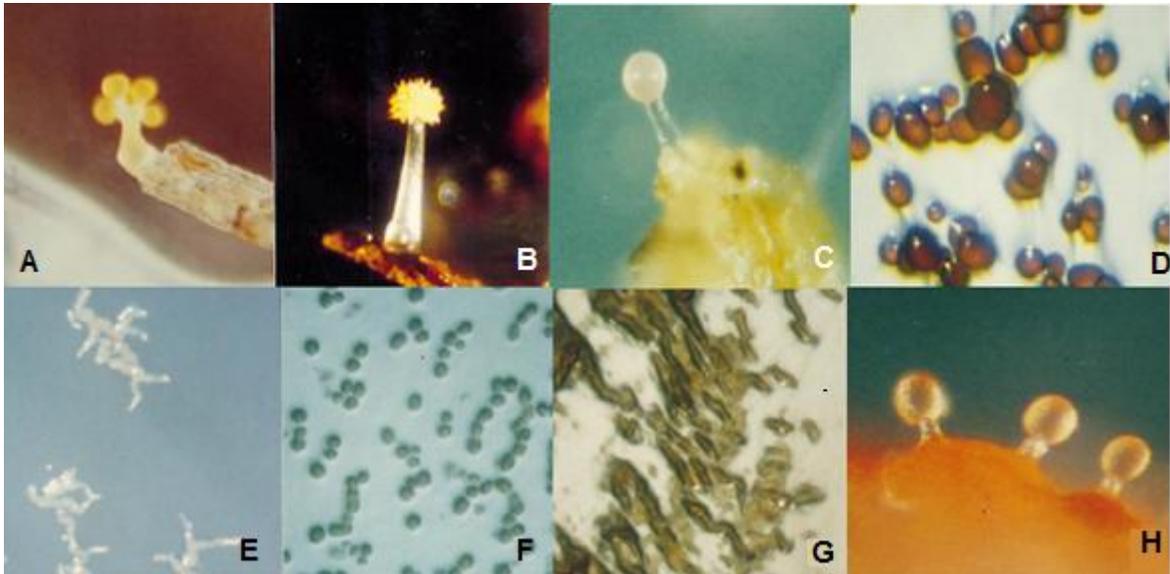


Figura 7. Cuerpos fructíferos de myxobacterias. **A.** *Stigmatella aurantiaca*, **B.** *Chondromyces apiculatus*, **C.** *Myxococcus stipitatus*, **C.** *Cystobacter fuscus*, **E.** *Corallocooccus exiguus*, **F.** *Angiococcus disciformis*, **G.** *Archangium serpens*, **H.** *Melittangium lichenicola* (Dawid, 2000)

Otra característica de este grupo es su actividad depredadora; lisan una variedad de microorganismos como son bacterias, levaduras y hongos (Itzuka *et al.*, 2006), las matan y digieren por medio de la producción de enzimas líticas extracelulares o sustancias antimicrobianas (Sudo & Dworkin 1972; Rosenberg & Dworkin 1996; Gaspari *et al.*, 2005).

Las myxobacterias excretan enzimas hidrolasas, como proteasas y glucanasas, entre otras. Con esto se dice que posiblemente obtengan fácilmente nutrientes descomponiendo las células microbianas o macromoléculas producidas por otros microorganismos en el ambiente. Debido a su actividad depredadora, se apunta que algunos de los metabolitos secundarios posiblemente estén involucrados en matar a sus presas, para después degradarlas con las enzimas liberadas (Itzuka *et al.*, 2006; Bode & Müller, 2006). Los antibióticos inhiben el crecimiento de los organismos presa, y esto los haría más susceptibles a la lisis, liberando su contenido celular, que puede ser degradado por las enzimas (Foster *et al.*, 1992).

Todas las myxobacterias con capaces de degradar biomacromoléculas, esto puede ser la explicación para la formación del cuerpo fructífero. Una comunidad de células es más eficiente en la producción de altos niveles de enzimas extracelulares y es menos sensible a las pérdidas por difusión que una célula

individual. De hecho, las myxobacterias son bien conocidas por sus sistemas de comunicación intercelular que ayudan a mantener a las células juntas. Las señales intercelulares pueden ser de naturaleza mecánica por ejemplo por medio de pili, o químicos por ejemplo las feromonas (Reichenbach, 2001).

El grupo de myxobacterias posee los genomas más grandes en comparación con otros grupos de bacterias (9500-10000 kpb) (Reichenbach & Dworkin, 1992; Dworkin & Kaiser, 1993; Dworkin, 1996; Reichenbach, 1999). Como ejemplo, se sabe que el tamaño del genoma de *Myxococcus xanthus* FB es de 9450 kpb (Chen *et al.*, 1990), que dobla el de *Escherichia coli* (4700 kpb) (Shimkets *et al.*, 2006). Su ADN además posee un alto contenido de G+C, de entre 66 y 72% (Reichenbach, 2001).

1.3.2 Ecología y distribución

Las myxobacterias se encuentran prácticamente en cualquier lugar, de la Antártica a los trópicos, y desde el nivel del mar hasta elevadas altitudes, en todos los cinturones de vegetación de bosques tropicales a desiertos. Es posible que no vivan muy bien en todos estos lugares, y que simplemente hayan sido transportadas a estos ambientes desfavorable y sobrevivido cierto tiempo allí, por lo menos 10 o 20 años según reportes, debido a que sus myxosporas resisten desecación y temperatura. Las floras más ricas en myxobacterias se han encontrado en lugares cálidos, semiáridos (Reichenbach, 1999).

Las myxobacterias viven preferencialmente en lugares que son ricos en materia orgánica y microorganismos (Reichenbach, 2001). El hábitat genuino de estas es el suelo, en el cual están presentes en gran número, varias especies diferentes pueden ser aisladas de una muestra pequeña, lo que sugiere que muchas especies son bastante comunes. Prefieren un suelo que tenga un pH de entre ligeramente ácido y alcalino (5 y 8), lo más cercano a neutro es mejor, esto se refleja en la práctica de utilizar medios con un pH de 7 para el aislamiento (Reichenbach, 1999; Dawid, 2000). A pesar de esto, se han reportado en suelos ácidos (pH 3,7) y alcalinos (pH 8,0-9,3) (Dawid, 2000). Al preferir un pH neutral o

alcalino, las cortezas ácidas, como las de pinos, parecen ser un hábitat no adecuado para el crecimiento de estas bacterias (Gaspari *et al.*, 2005).

Prácticamente, todas las myxobacterias conocidas son estrictamente aerobias, a excepción de *Anaeromyxobacter dehalogenans* (Sanford *et al.*, 2002; Shimkets *et al.*, 2006), y viven en las capas superficiales del suelo. Además del suelo, estas colonizan material vegetal en descomposición, incluyendo madera y corteza de árboles vivos y muertos, líquenes e insectos de igual manera en descomposición, además en excremento, especialmente de ciertos mamíferos herbívoros como conejos silvestres, liebres, ciervos, ovejas y cabras (Reichenbach, 1999).

Las myxobacterias no son un grupo dominante en la comunidad microbiana del suelo (Wu *et al.*, 2005). Existe poca información con respecto a la densidad de las poblaciones de myxobacterias en suelos. En diferentes estudios, en un gramo de suelos distintos, se han contado entre 2000 y 76 000, 80 000 y hasta 450 000 células de myxobacterias (Dawid, 2000). Las especies encontradas en los distintos hábitats varían, esto se demuestra en la Tabla 1, en la cual Shimkets *et al.* (2006) toman en cuenta diversos estudios, y apuntan las especies más típicas de myxobacterias de acuerdo al sustrato, sea suelo, corteza y madera en descomposición, o excremento de herbívoros.

Las myxobacterias son generalmente consideradas como mesófilas (Dawid, 2000), aunque en la naturaleza, los organismos ciertamente crecen a menores temperaturas y probablemente más lentamente. Muchas cepas son psicrófilas que crecen, aunque muy lentamente, a temperaturas de entre 4 y 9 °C (Dawid *et al.*, 1988; Reichenbach, 1999; Shimkets *et al.*, 2006).

| Sustrato | Especies de myxobacterias más típicas |
|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Suelo | <i>Nannocystis exedens</i> , <i>Sorangium cellulosum</i> , <i>Archangium serpens</i> , <i>Corallocooccus coralloides</i> , <i>Polyangium spp.</i> , <i>Cystobacter spp.</i> , <i>Melittangium spp.</i> , <i>Myxococcus fulvus</i> , <i>Myxococcus virescens</i> , y <i>Myxococcus stipitatus</i> . |
| Corteza y madera en descomposición | <i>Stigmatella aurantiaca</i> , <i>Chondromyces apiculatus</i> , <i>Sorangium cellulosum</i> , <i>Corallocooccus coralloides</i> , <i>Myxococcus fulvus</i> , <i>Chondromyces pediculatus</i> , y <i>Haploangium spp.</i> |
| Excremento de herbívoros | <i>Myxococcus fulvus</i> , <i>Corallocooccus coralloides</i> , <i>Myxococcus virescens</i> , <i>Cystobacter fuscus</i> , <i>Cystobacter ferrugineus</i> , <i>Archangium serpens</i> , <i>Nannocystis exedens</i> , <i>Cystobacter violaceus</i> , <i>Polyangium spp.</i> , <i>Stigmatella erecta</i> , <i>Myxococcus xanthus</i> , <i>Melittangium spp.</i> , y <i>Cystobacter velatus</i> . |

Tabla 1. Especies de myxobacterias más típicas en diferentes sustratos según frecuencia de ocurrencia (Shimkets *et al.*, 2006).

1.3.3. Aislamiento, purificación y preservación

Las características únicas de estas bacterias son la base no sólo para su taxonomía, sino también para las técnicas de aislamiento (Wu, 2005). Las estrategias de aislamiento de las myxobacterias usualmente involucran la incubación de muestras naturales en un medio selectivo, con agar, seguido del esparcimiento celular o la formación del cuerpo fructífero; ocasionalmente los cuerpos fructíferos pueden ser recolectados directamente de la naturaleza (Reichenbach & Dworkin, 1992; Dawid, 2000; Jiang *et al.*, 2007).

Las técnicas de aislamiento de myxobacterias se han modificado varias veces, pero todas contemplan la recolección y/o promoción del crecimiento de cuerpos fructíferos (Fig. 8). Por esto, se podría decir que el aislamiento basado en morfología ha permitido el descubrimiento de la mayoría de tipos de myxobacterias productoras de cuerpo fructífero (Jiang *et al.*, 2007).

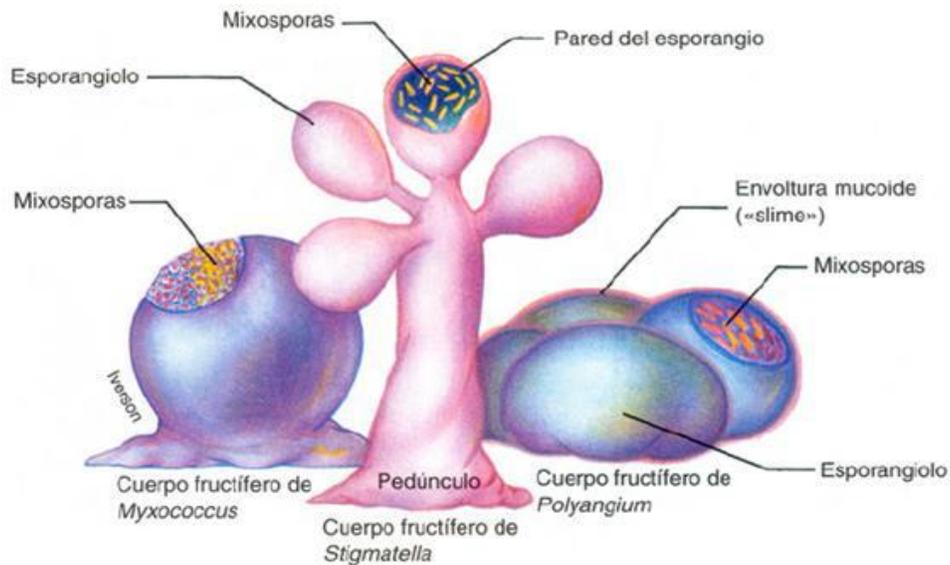


Figura 8. Ilustración de la estructura típica de los cuerpos fructíferos de myxobacterias de los géneros *Myxococcus*, *Stigmatella* y *Polyangium* (Shimkets et al., 2006).

La mayoría de las especies de myxobacterias viven por degradación de proteínas e incluso células enteras de otros microorganismos, principalmente bacterias y levaduras, y requieren péptidos y aminoácidos como nutrientes. Existe un grupo de myxobacterias, los miembros del género *Sorangium*, que son degradadores de celulosa (Reichenbach, 2001).

Las técnicas de aislamiento clásicas poseen varios factores limitantes: el basarse en la producción de cuerpos fructíferos, la morfogénesis de estos no es un carácter confiable y en muchas condiciones se degeneran o pierden; además de esto, la baja tasa de crecimiento de las myxobacterias hace que sea fácil su contaminación por otras bacterias y hongos de crecimiento más rápido. Por lo tanto, con estas técnicas de aislamiento, fácilmente se pierden cepas de myxobacterias (Wu *et al.*, 2005).

Como es bien conocido, las myxobacterias son problemáticas de manejar en laboratorio, y su purificación no es sencilla (Reichenbach & Höfle, 1993). Como lo menciona Guo (2008) en su estudio, las biopelículas o cuerpos fructíferos se podrían descubrir después de 2 a 20 días de inocular el medio, pero el proceso de purificación se vuelve tedioso, y las myxobacterias se contaminan fácilmente con *Mucor*, *Rhizopus*, y *Aspergillus*. Una manera de eliminar contaminantes, es

aprovechar que los cuerpos fructíferos no germinan en un medio rico en nutrientes, y se pueden tratar con altas concentraciones de antibióticos como cicloheximida, terramicina y kanamicina.

En cultivo, el rango de pH de las myxobacterias es normalmente de 6,8 a 7,8. Las degradadoras de celulosa pueden continuar creciendo a un pH más bajo pero, con un límite de entre 6,0 y 6,4 (Reichenbach, 1999; Dawid, 2000). La tolerancia de estas bacterias a la sal parece ser bastante baja (Reichenbach, 1999).

En laboratorio, el rango de temperatura adecuado para cultivarlas es de 28-34 °C, con tiempos de generación de entre 4 y 14 horas. Varias cepas continúan creciendo a 38-40 °C (Gerth *et al.*, 1994; Reichenbach, 1999), pero los cultivos se vuelven muy inestables a estas altas temperaturas y rápidamente se descomponen y se lisan al final del ciclo de crecimiento.

El medio CY (ver anexos) suele ser muy útil para el aislamiento de myxobacterias ya que el crecimiento a menudo es más vigoroso, pero las colonias se dispersan menos y pueden convertirse en algo viscoso y, a menudo, las células mueren antes (después de 1-2 semanas), a causa de la abundante producción de amoníaco. La elección de la peptona para medios de este tipo es crítica (Shimkets *et al.*, 2006).

1.3.4. Metabolismo Secundario

El metabolismo secundario incluye aquellos procesos metabólicos que tienen lugar después de terminado el crecimiento, a través de vías biosintéticas específicas que no tienen función estructural ni de reserva (De Baets *et al.*, 2000).

Los metabolitos secundarios no son necesarios para la biosíntesis celular, no tienen por tanto un papel directo en el metabolismo energético; en consecuencia, no se conoce con claridad la razón de su existencia. (Estrohl, 1997). Algunos de estos compuestos principalmente los antibióticos, son útiles para el organismo puesto que pueden inhibir a otros organismos de su entorno. Además tienden a ser sintetizados como familias de compuestos relacionados (Demain. 1996).

Los metabolitos secundarios son productos de bacterias, hongos y plantas. Aunque se desconoce en la mayoría de los casos, la función del metabolito secundario, la bioactividad de estos compuestos ha sido explotada como medicamentos, venenos, agentes saborizantes en alimentos, fitohormonas y otros de aplicación industrial (Bentley. 1997).

Generalmente, su producción está limitada a un grupo taxonómico en particular (Keller *et al.*, 2005), es decir, ese grupo de compuestos es sintetizado por un género en particular. Por ejemplo, las epotilonas solo se han reportado como producto exclusivo de myxobacterias (Lee *et al.*, 2008).

En las myxobacterias cuyo genoma se conoce, se ha estudiado que una parte considerable de este está dedicado a la producción de metabolitos secundarios (Berelman y Kirby, 2009; Meiser, 2008, Meiser *et al.*, 2006, Schneiker *et al.*, 2007, Rachid *et al.*, 2007).

A la fecha, han sido aislados alrededor de 100 estructuras básicas con más de 500 isómeros y derivados de compuestos sintetizados en laboratorio por diferentes cepas de myxobacterias, algunos de los cuales han sido obtenidos sintéticamente en diversos laboratorios alrededor del mundo (García *et al.*, 2009; Meiser, 2008, Reichenbach, 2001).

Pese a que el número de cepas descubiertas de actinobacterias es aún superior al de myxobacterias, se cree que estas últimas pueden llegar a estar al mismo nivel como productoras de antimicrobianos una vez que se caractericen y se optimice la producción de éstos. Pueden incluso llegar a constituirse patentes farmacéuticas y amplios nichos de mercado al optimizarse su producción (García *et al.*, 2009; Sakar y Gould, 2006, Shimkets *et al.*, 2006).

Se ha esclarecido que la capacidad para producir un metabolito en particular depende de la cepa y no de la especie, es decir, diferentes especies pueden producir la misma molécula, y cepas de la misma familias o especies relacionadas

pueden producir moléculas diametralmente diferentes, ya que las mismas rutas metabólicas están presentes en diferentes géneros aunque no estén reguladas por los mismos grupos de genes (Dawid, 2000; García *et al.*, 2009, Shneiker *et al.*, 2007).

En general, casi todas las myxobacterias son capaces de producir metabolitos con algún efecto antimicrobiano, especialmente las celulolíticas (Bull *et al.*, 2002).

1.3.4.1. Metabolitos con actividad biológica obtenidos de myxobacterias

Pese a lo anterior, aún son pocos los géneros de myxobacterias de los que se han aislado metabolitos útiles. Esto se debe a que muchos géneros son difíciles de encontrar y aislar, otros no han sido completamente caracterizados, y en algunos casos es difícil habituarlos a crecer *in vitro* (García *et al.*, 2009; Kunze *et al.*, 1994), o porque su capacidad para producir metabolitos secundarios es pobre (Gerth *et al.*, 2003).

Entre los géneros de myxobacterias productores de metabolitos secundarios, el género *Sorangium* es el más sobresaliente, pues además produce un candidato promisorio como droga anticáncer, con un potencial económico elevado, el ***epotilon*** (Lee *et al.*, 2001).

El resto de los metabolitos conocidos de myxobacterias provienen del suborden *Cystobacterinae* en especial de *Myxococcus*, *Archangium* y *Corallococcus*. Por ejemplo bloqueadores de la ARN polimerasa bacteriana como la **coralopironina** o la ***mixosporina***, o inhibidores de la síntesis de proteínas en eucariontes como la ***mixovalargina*** (Dawid, 2000; Jansen *et al.*, 2008).

En lo que respecta a la capacidad de producir antimicrobianos, esta fue observada por primera vez en *Myxococcus xanthus* (Norén y Raper, 1962), y de este género

se aislaron los primeros metabolitos de myxobacterias, el primero de ellos, la **ambruticina** en 1977 (Bode y Muller, 2006; Dawid, 2000).

De otros géneros como *Chondrommces*, y *Polyangium* también se han aislado compuestos con actividad antimicrobiana e incluso sobre células eucariontes, pero, dada la dificultad del aislamiento y cultivo de éstos géneros, el número de compuestos conocidos es considerablemente limitado con respecto a los primeros (García *et al.*, 2009; Kunze *et al.*, 1992, Kunze *et al.*, 1994).

A pesar de ser pocos comparados con los de otras especies de myxobacterias, los metabolitos encontrados a partir de éstas especies tienen actividades muy prometedoras, como las **tugacinas**, derivadas de *Chondromyces crocatus*, macrólidos que inhiben el crecimiento de cepas estándar y clínicas de micobacterias a concentraciones muy bajas (Steinmetz *et al.*, 2007); **crocacinas**, activas sobre algunas levaduras, que además inhiben la cadena respiratoria en mitocondrias eucariontes y los **ayudazoles** sustancias activas contra algunos mohos, que también inhiben la cadena respiratoria de mitocondrias eucariontes (Feutril *et al.*, 2008; Kunze *et al.*, 1994, Kunze *et al.*, 2003), entre otros metabolitos.

De *Polyangium* se conoce el **fenoxan**, antifúngico, que también tiene actividad sobre células cancerosas.(Bjorn Bode *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2008, Kunze *et al.*, 1992).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la posible producción de sustancias antimicrobianas producidas por myxobacterias cultivadas in vitro.

2.2. OBJETIVOS PARTICULARES

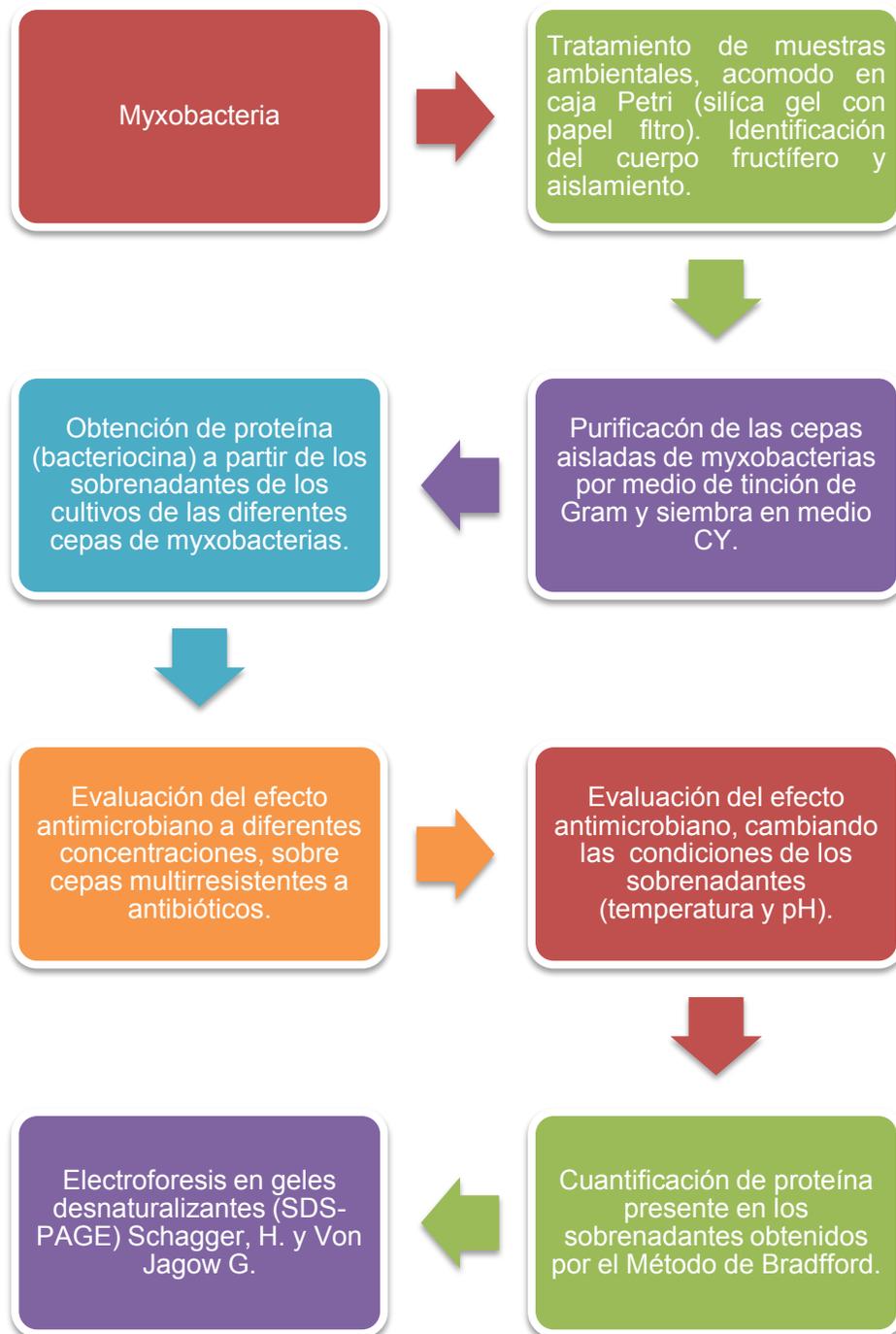
- Aislar y caracterizar myxobacterias provenientes de muestras ambientales de suelos rurales, urbanos y semiurbanos del valle de México.
- Detectar la posible producción de sustancias antimicrobianas en sobrenadantes de cepas de myxobacterias
- Evaluar el efecto antimicrobiano del sobrenadante ante dos microorganismos tipo *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*.
- Determinar la naturaleza química de las sustancias antimicrobianas producidas por las distintas cepas de myxobacterias y evaluar su efecto sobre bacterias multirresistentes a antibióticos.

2.3. HIPÓTESIS

Debido a que las myxobacterias han mostrado la capacidad de producir distintas sustancias con efecto antimicrobiano es posible que estas produzcan sustancias que inhiban el crecimiento de bacterias multirresistentes a antibióticos, y que su naturaleza sea proteica.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Diagrama de flujo



3.2. Obtención y preparación de muestras ambientales

Se trabajó con muestras obtenidas de suelos rurales, urbanos y semiurbanos provenientes de diferentes lugares de la zona metropolitana del Valle de México. Se recolectaron de la superficie de la tierra y fueron almacenadas en bolsas de plástico estériles. Posteriormente la muestra de tierra fue cernida y se sumergió en una solución de Benomilo [Metil 1-(butilcarbamoil) bencimidazol-2-ilcarbamato] en concentración 12.5 mg/mL por 1 semana, después se secaron a 27° C por 7 días; una vez secas se guardaron en bolsas estériles.

Las muestras ambientales cernidas de tierra y hojarasca se colocaron en cajas con sílica gel, dispuestas en pequeños montones (Fig. 9), hidratándose con una solución de medio mineral con cicloheximida en una concentración de 500 µg/mL (que es un inhibidor de la síntesis proteica en organismos eucariotas), evitando así la proliferación de hongos y favoreciendo la aparición de los cuerpos fructíferos. Se utilizó papel filtro como única fuente de carbono, ya que la sílica gel es un medio inerte que solo sirve para dar soporte a las placas.

Las cajas se mantuvieron en una cámara húmeda. A partir del tercer día se realizó el seguimiento de las cajas con un microscopio estereoscópico hasta lograr ver los cuerpos fructíferos ó halos de degradación. Una vez observados se procedió a fotografiarlos.



Figura 9. Muestras ambientales para el aislamiento de Myxobacterias

3.3. Aislamiento y caracterización de las Myxobacterias

El crecimiento de las Myxobacterias se siguió con base a los lineamientos de Reinchenbach (1981) mediante la observación de cuerpos fructíferos, tomando en cuenta: color, tamaño, forma, coloración y degradación del papel filtro sin la presencia de hongos.

Al identificar los cuerpos fructíferos, se tomó una muestra y se sembró en un medio selectivo (agar Mc Conkey) que favorece el crecimiento de microorganismos Gram negativos. Las cepas aisladas, presuntivamente myxobacterias, se incubaron a 32° C por 24 horas, con diferentes resiembras hasta la obtención de una colonia pura. Dependiendo de la cantidad y tipo de colonias que crecieron en este medio, se realizó una tinción de gram a cada tipo, y los que resultaron bacilos largos gram negativos se resembraron hasta la obtención de cepas puras. Las colonias puras aisladas se mantuvieron en caldo CY para la conservación de cada cepa.

3.4. Obtención de sustancias antimicrobianas

Se resembró cada cepa de myxobacteria con 150 µL de inóculo en caldo Luria (3 mL en cada tubo) incubándolas 24 h a 32°C para obtener cultivos jóvenes. Transcurrido el tiempo se inoculó 1×10^8 células/mL en matraces Erlenmeyer con 100 ml de medio Luria (LB), se incubaron a 32°C a agitación constante de 160 rpm en una incubadora con agitación orbital durante una semana, tomando muestras de 5 mL cada 24 h.

De cada muestra obtenida a los diferentes tiempos se tomó 1 mL y se colocó en tubos eppendorf, se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 minutos en microcentrífuga, Centrifuge Eppendorf S415R, para retirar el mayor número de células. El sobrenadante obtenido se separó y guardó para su posterior uso.

3.4.1. Prueba para evaluar la actividad antimicrobiana

Prueba de difusión en agar

Para evaluar la producción de sustancias antimicrobianas se utilizaron las siguientes bacterias tipo : *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Se resembró cada cepa con 150 μL de inóculo en caldo LB para obtener cultivos jóvenes de 24 h. Siguiendo la metodología de Bauer-Kirby, las cepas fueron ajustadas a una densidad de 0.5 Unidades Mc Farland ($1 \times 10^8 \text{ cel/mL}$). Se inoculó la cantidad necesaria de células en cajas de Petri con 20 mL de agar Müller-Hinton. Una vez inoculadas las dos cepas, en cada caja se colocaron 6 discos de papel filtro impregnados con 15 μL del sobrenadante obtenido a diferentes tiempos y un disco con 15 μL de aceite mineral en el centro de la caja como control negativo, cada caja se hizo por triplicado (Fig.10). Las cajas fueron incubadas durante 24 h a 37°C y finalmente se observaron los halos de inhibición producidos por el sobrenadante.

Esta parte nos ayudará a determinar el tiempo en que se producen las sustancias antimicrobianas, lo que servirá para la obtención de la proteína de interés.

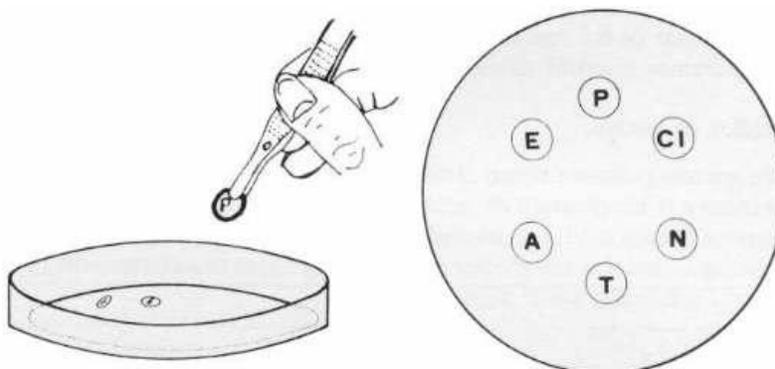


Figura 10. Prueba difusión en agar

3.5. Selección de cepas multirresistentes

Se trabajó con 4 cepas multirresistentes a antibióticos congeladas y previamente aisladas y caracterizadas. Estas cepas provenían de distintos alimentos para

consumo humano: pollo (*Enterococcus raffinosus*), papaya (*Pseudomonas sp.*), champiñón (*Actinobacillus suis*) y queso (*Escherichia coli*). Para su descongelación se dejaron en un refrigerador a 7°C (aproximadamente) durante 24 h. La reactivación de las cepas se hizo tomando 150 µL de inóculo de cada cepa y se resembraron en caldo Luria (3 mL en cada tubo) incubándolas 24 h a 37°C. Este procedimiento se realizó durante 6 días consecutivos.

3.5.1. Pruebas de sensibilidad a antibióticos

Una vez reactivadas las cepas puras se inocularon 150 µL en un medio enriquecido para tener cultivos jóvenes de 24 h y así poder realizar las pruebas de susceptibilidad a antibióticos. Esto se realizó en agar Müller-Hinton por la metodología de Bauer-Kirby. Tras 24 h de incubación a 37°C se midieron los halos de inhibición de los diversos antibióticos colocados (12 antibióticos, kit comercial de Investigación Diagnóstica®). Esto se realizó con el fin de corroborar que las cepas siguieran presentando resistencia a antibióticos.

3.6. Obtención de proteína a partir de los sobrenadantes de los cultivos de las diferentes cepas de Myxobacterias.

Los sobrenadantes de cada cepa de myxobacterias que produjeron halos de inhibición fueron utilizados en esta parte.

Se colocaron 10 mL de cultivo de cada cepa en tubos de centrifuga de 15 mL, Falcon®, para centrifugarse durante 5 min a 10000 rpm a 4°C en una centrifuga clínica esto con el fin de eliminar el mayor número de células posibles y solo quedarse con el sobrenadante.

A cada sobrenadante se le adicionó 10mM de EDTA y se realizó una precipitación con sulfato de amonio al 50% a 4°C durante 20 minutos, posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 10min y el sobrenadante se precipitó nuevamente con sulfato de amonio 30% para alcanzar una concentración de 80%_f. La mezcla fue centrifugada a 14000 rpm durante 10min.

Los sobrenadantes obtenidos se concentraron hasta el mínimo volumen posible utilizando filtros Millipore Amicon (Fig. 11) de poro de 3, 10,30, KDa. Se centrifugaron primero en el filtro de 30 KDa durante 15 minutos a 4500 rpm a 4°C en una centrifuga clínica. Se obtuvieron dos fracciones: una concentrada (1mL); la cual se depositó en un tubo eppendorf, y otra no concentrada, esta fracción se volvió a centrifugar pero ahora ocupando el filtro Amicon de 10 KDa. Se repitió el mismo procedimiento para el filtro de 3 KDa. Se guardaron a temperatura ambiente.

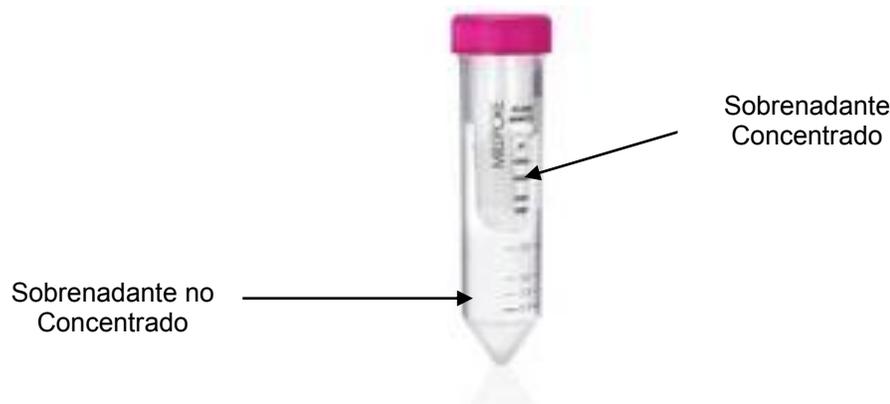


Figura 11. Filtro Millipore Amicon

3.6.1. Prueba para evaluar la actividad antimicrobiana

Prueba de difusión en agar

Se repitió la metodología antes mencionada, pero ahora utilizando los sobrenadantes concentrados de los diferentes filtros sobre las cepas multirresistentes a antibióticos.

3.6.2. Determinación de la cantidad mínima requerida de sustancia antimicrobiana

Para este método una vez inoculadas las cajas de Petri se colocaron 4 discos de papel filtro impregnados con diferentes cantidades de sobrenadante concentrado (5, 10, 15 y 20 μ L) provenientes de los diferentes filtros y 1 disco con aceite mineral como control negativo en cada cepa para determinar la cantidad mínima capaz de producir halos de tamaño significativos (Fig. 12).

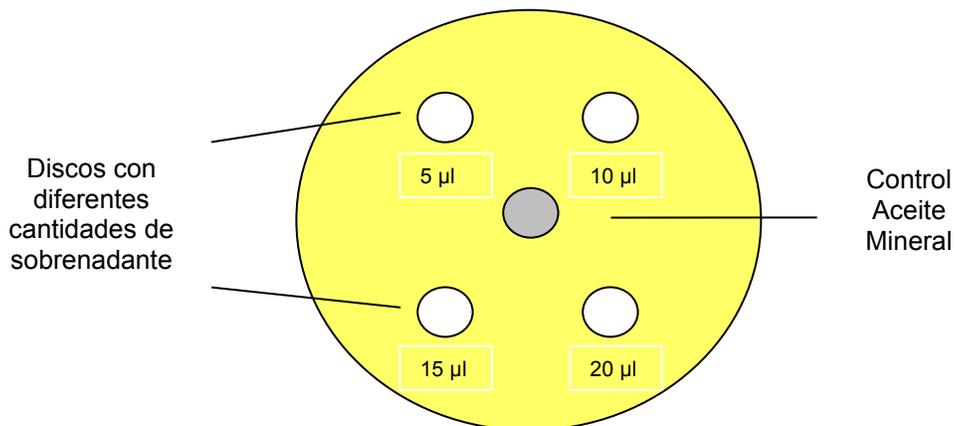


Figura 12. Caja Petri con discos impregnados con 5, 10, 15 y 20 µl de sobrenadante concentrado del filtro 30 KDa.

3.7. Pruebas de caracterización del sobrenadante concentrado

Para poder clasificar las posibles bacteriocinas presentes en el sobrenadante es necesario conocer su termoresistencia, estabilidad a distintos valores de pH y peso molecular.

3.7.1. Termoestabilidad

De acuerdo a la clasificación de Kemperman (2003) las bacteriocinas según el grupo al que pertenezcan, pueden ser termoestables o termolábiles. Para comprobar el efecto de la temperatura en el sobrenadante, se sirvió 1 mL de muestra en tubos eppendorff que se cerraron herméticamente y se calentaron en baño de agua a diferentes temperaturas: 60°C 30 min, 80°C 10 min y 100°C 5 min, dejando enfriar a temperatura ambiente. A continuación se realizó una prueba de inhibición por difusión en agar.

3.7.2. Estabilidad en intervalo de pH

Se colocaron 10 mL de sobrenadante de cada cepa en un matraz Erlenmeyer y se ajustó el pH a distintos valores (4, 7 y 9) mediante adición de tampones a doble concentración (0,2M). Para pH 9 se utilizó un tampón de Tris-HCl, y para pH 4 un tampón cítrico-citrato. Los sobrenadantes se incuban durante 24h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se realizó una prueba de inhibición por difusión en agar.

3.7.3. Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteína se basó en el método diseñado por Bradford (1976), el cual es un procedimiento para determinar la concentración de proteína soluble. Implica la adición de un colorante ácido a la solución de proteína, y se mide su absorbancia a $\lambda=595\text{nm}$. Se compara con una curva estándar que proporciona la concentración relativa de proteína. El colorante azul brillante de Coomassie G-250 (Reactivo de Bradford), cambia de color en respuesta a diferentes concentraciones de proteína (Ver Anexos).

3.7.4. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) Schagger, H. y Von Jagow G.

Este tipo de electroforesis es muy eficiente en la resolución de proteínas de mediano peso molecular, 100KDa, a bajo peso molecular 10KDa. Las proteínas utilizadas durante el proyecto se encuentran en peso en este rango, por lo que decidimos que ésta técnica nos brindaría certidumbre en la definición de estas proteínas.

Se realizaron mini-geles de 0.75mm y 1mm de grosor que estaban compuestos por una porción separadora de aproximadamente 5.5 cm de 12.5% de una mezcla de acrilamida y bis-acrilamida (30%:2.6%) y una porción concentradora de aproximadamente 1.2 cm con 4% de acrilamida/bis, ambas porciones se prepararon en el amortiguador del gel (Tris 1M y SDS 0.1% pH 8.45).

Todas las muestras se centrifugaron 15 minutos a 18000 rpm y temperatura de 4°C. En cada carril se colocó una cantidad de proteína correspondiente a 25 μg . Por otra parte las muestras se diluyeron 1:1 en el amortiguador de muestra (12.5% de amortiguador del gel, 1% SDS, 15% glicerol, 0.5% azul de bromofenol y 10mM de DTT) y se calentaron durante 5 min a 95°C previo a ser cargadas en el gel.

Estas electroforesis se realizaron en cámaras mini-Protean Tetra cell de Biorad, usando el amortiguador de corrida para cátodo (Tris 0.1M, Tricina 0.1M y SDS 0.1% pH 8.25) y amortiguador de ánodo (Tris-HCl 0.2M pH 8.93); los geles se corrieron a 100V hasta que el frente de corrida alcanzó la porción separadora y posteriormente se aumentó a 120V durante aproximadamente 1 hora y media.

Una vez realizada la electroforesis los geles fueron teñidos alrededor de media hora usando una solución al 0.2% de colorante azul de Coomassie R250 (Research Organics) con 47% de etanol y 10% de ácido acético, tras lo cual fueron desteñidos incubando con una solución de 50% metanol y 7.5% ácido acético hasta obtener el contraste deseado.

Los geles obtenidos se fijaron y tiñeron simultáneamente (12 horas) con una solución de metanol, ácido acético y agua (5:5:2) conteniendo 0,1% de Coomassie Brilliant Blue R-250 (Anedra, Argentina).

Se tomaron imágenes de los geles y se analizaron

4. RESULTADOS

4.1. Aislamiento y caracterización de las myxobacterias

Las muestras se clasificaron como sigue:

Suelos urbanos: Parque Hundido (Distrito Federal)

Suelos semiurbanos: Ajusco y Acolman

Suelos rurales: Catemaco, Cuernavaca y Toluca

Después del tratamiento con Benomilo y el secado de las muestras, se colocaron en placas con sílica gel y papel filtro como única fuente de carbono. La aparición de los cuerpos se observó después de 4 semanas. Se observaron diferentes myxobacterias como se muestra en la tabla 2, de las cuales algunos tipos se repetían en muestras diferentes.

| Crecimiento en | Género | Origen |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| Papel filtro | <i>Myxococcus</i> <i>Polyongium</i> <i>Stigmatella</i> | Toluca, Ajusco, Acolman, Catemaco y Parque Hundido |
| Sílica gel | <i>Myxococcus</i> | Parque Hundido |
| Madera y hojas | <i>Myxococcus</i> <i>Polyongium</i> <i>Stigmatella</i> | Cuernavaca, Toluca, Ajusco |

Tabla 2. Distribución de myxobacterias aisladas en las muestras ambientales estudiadas.

La identificación de los cuerpos fructíferos se realizó con ayuda de un microscopio estereoscópico, con base a las claves de identificación de Reichenbach y Dworkin (1992). La forma, color y tipo de cuerpos fructíferos nos permitió hacer una identificación del género al que podrían pertenecer los microorganismos (Fig. 12).

Durante este estudio se aislaron un total de 22 cepas puras de bacterias que cumplieron las características morfológicas de myxobacterias, a partir de las diferentes muestras de tierra y materia vegetal. Estas presentaron: crecimiento

expansivo, una biopelícula translúcida, y en caldo CY crecieron como agregados. Al realizar una tinción de Gram a las cepas, todas ellas fueron bacilos Gram negativos en forma alargada, siendo las células flexibles y puntiagudas, lo que es característico de las myxobacterias. Del total de cepas, el género mayoritario fue *Stigmatella* (50%) seguido de *Myxococcus* (36.4%), y por último el género *Polyangium* (13.6%).

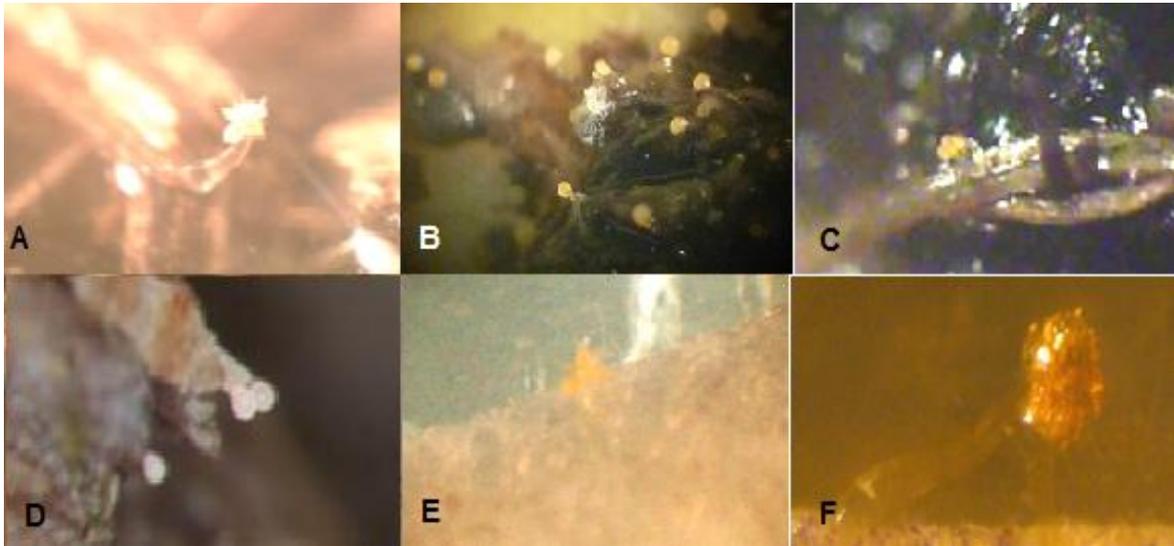


Figura 11. Formación de diferentes cuerpos fructíferos aislados de myxobacterias provenientes de diferentes muestras (zoom 30X): A) *Stigmatella* sobre madera, Parque Hundido. B) *Myxococcus* sobre madera, Parque Hundido. C) *Polyangium* sobre madera, Parque Hundido. D) *Myxococcus* sobre madera, Acolman. E) *Stigmatella* sobre papel filtro, Catemaco. F) *Polyangium* sobre sílica gel, Parque Hundido. La identificación de Myxobacterias se basó en las claves de identificación de Reichenbach y Dworkin (1992.)

Las cepas fueron aisladas a partir de muestras de suelo y materia vegetal tomadas de diferentes partes del Valle de México. El suelo urbano fue la zona de muestreo de la que se obtuvo un mayor número de cepas aisladas (60%), seguida del suelo rural (30%), y suelo semiurbano (10%) (Fig. 13).

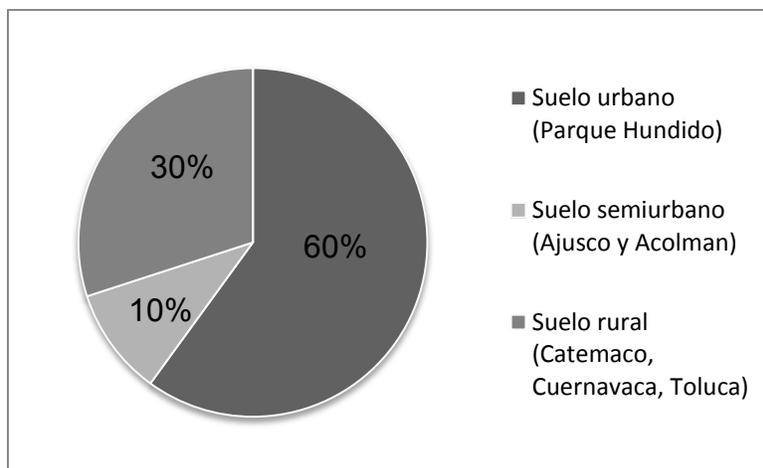


Figura 13. Porcentaje de bacterias aisladas por zona de toma de muestra.

4.2. Obtención de sustancias antimicrobianas

Como se mencionó antes, estas pruebas se realizaron por el método de Bauer-Kirby en cajas con Müller-Hinton, utilizando discos de papel filtro impregnados con 15 μ L del sobrenadante obtenido a diferentes tiempos (Fig. 14).

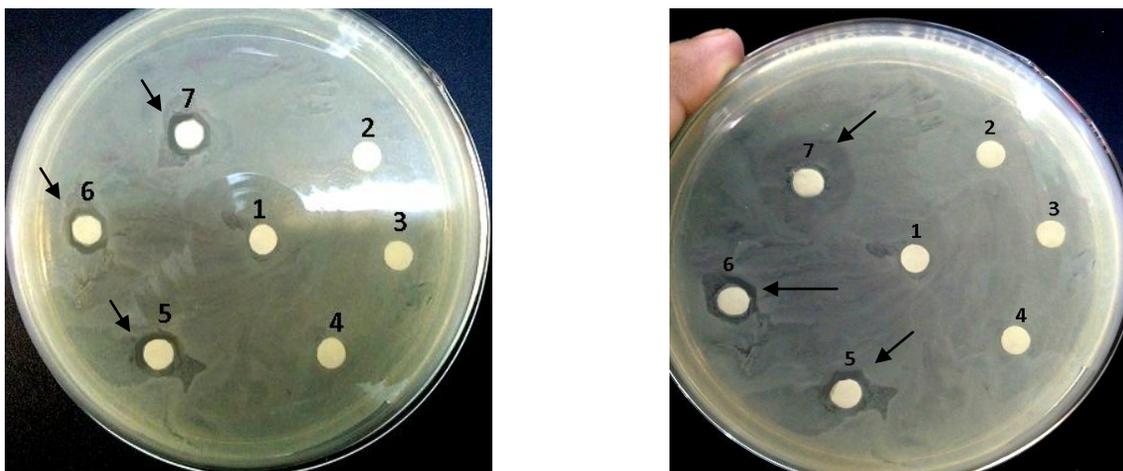


Figura 14. Fotografías de los halos de inhibición (Flecha) originados por el sobrenadante de la cepa CAT a diferentes tiempos en las cepas probadas *B. subtilis* (izquierda) y *S. aureus* (derecha). (1) control, 2) 24 h, 3) 48 h, 4) 72h, 5) 96h, 6) 120h, 7) 144h).

Se consideró como resultado positivo la existencia del halo de inhibición, como se observa en la figura 14 en ambas cepas indicadoras, sin medirse; de los 22 sobrenadantes solo 11 tuvieron efecto y este se observó después de las 72h.

En la figura 15 se muestran los porcentajes de las cepas que tuvieron efecto antimicrobiano de acuerdo al género al que pertenecen.

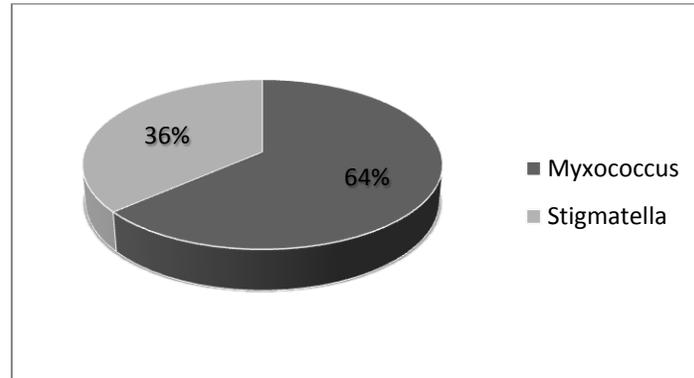


Figura 15. Porcentaje de los géneros de myxobacterias que presentaron actividad antimicrobiana sobre las cepas indicadoras.

4.3. Selección de cepas multirresistentes

Se verificó la pureza de las cepas por medio de una tinción de Gram y una observación detallada al microscopio.

4.3.1 Pruebas de sensibilidad a antibióticos

Los criterios utilizados para determinar la susceptibilidad o resistencia de las cepas fueron los siguientes: Halo < 1.5cm = resistente y halo > 1.5cm = sensible. Límites establecidos indicados en el kit comercial de Investigación Diagnóstica®.



Figura 16. Fotografías de los antibiogramas de las bacterias aisladas de papaya (*Pseudomonas sp.*) y champiñón (*Enterococcus raffinosus*).

Una vez medidos los halos de inhibición en las 4 cepas, se observó que todas son resistentes a más de 5 antibióticos, por lo cual se les considera multirresistentes y se utilizaron para la prueba de inhibición con los sobrenadantes obtenidos de los Filtros Millipore Amicon.

4.4. Obtención de proteína a partir de los sobrenadantes de los cultivos de las diferentes cepas de Myxobacterias.

Se utilizaron sobrenadantes producidos a las 72 h, con las condiciones antes mencionadas, de las 11 cepas de myxobacterias que fueron capaces de inhibir a las cepas indicador.

En la tabla 3 se muestra la nomenclatura de las 11 cepas utilizadas, así como el género al que pertenecen.

Se obtuvo aproximadamente 1 mL de sobrenadante concentrado de cada filtro.

Tabla 3. Cepas aisladas con actividad antimicrobiana sobre cepas tipo.

| Cepa | Género |
|------|------------------------|
| CAT | <i>Myxococcus sp.</i> |
| 2 | <i>Myxococcus sp</i> |
| 5 | <i>Myxococcus sp.</i> |
| CA1 | <i>Stigmatella sp</i> |
| GT | <i>Stigmatella sp.</i> |
| 3T | <i>Myxococcus sp.</i> |
| P1 | <i>Myxococcus sp.</i> |
| CU | <i>Stigmatella sp.</i> |
| JS | <i>Stigmatella sp.</i> |
| SM | <i>Myxococcus sp</i> |
| MX | <i>Myxococcus sp</i> |

4.4.1. Prueba para evaluar la actividad antimicrobiana

En la tabla 4 se presentan los resultados obtenidos del efecto antimicrobiano del sobrenadante concentrado de cada filtro por el método de difusión en discos sobre la población bacteriana de cada muestra.

Tabla 4. Resultados de las pruebas de inhibición de los sobrenadantes concentrados sobre cepas multirresistentes a antibióticos.

| Cepa | Bacteria multirresistente | Filtro | | |
|------|---------------------------|--------|--------|-------|
| | | 30 KDa | 10 KDa | 3 KDa |
| CAT | <i>E. raffinosus</i> | + | + | 0 |
| | <i>Pseudomonas sp.</i> | + | ++ | 0 |
| | <i>A. suis</i> | + | ++ | 0 |
| | <i>E. coli</i> | ++ | ++ | 0 |
| 2 | <i>E. raffinosus</i> | + | + | 0 |
| | <i>Pseudomonas sp.</i> | + | + | 0 |
| | <i>A. suis</i> | ++ | + | 0 |
| | <i>E. coli</i> | ++ | + | 0 |
| 5 | <i>E. raffinosus</i> | + | + | 0 |
| | <i>Pseudomonas sp.</i> | + | + | 0 |
| | <i>A. suis</i> | + | ++ | 0 |
| | <i>E. coli</i> | + | ++ | 0 |
| CA1 | <i>E. raffinosus</i> | + | + | 0 |
| | <i>Pseudomonas sp.</i> | ++ | ++ | 0 |
| | <i>A. suis</i> | ++ | + | 0 |
| | <i>E. coli</i> | ++ | + | 0 |
| GT | <i>E. raffinosus</i> | + | + | 0 |
| | <i>Pseudomonas sp.</i> | + | ++ | 0 |
| | <i>A. suis</i> | + | ++ | 0 |
| | <i>E. coli</i> | + | ++ | 0 |
| 3T | <i>E. raffinosus</i> | + | + | 0 |
| | <i>Pseudomonas sp.</i> | ++ | + | 0 |
| | <i>A. suis</i> | + | + | 0 |
| | <i>E. coli</i> | ++ | ++ | 0 |
| P1 | <i>E. raffinosus</i> | + | + | 0 |
| | <i>Pseudomonas sp.</i> | 0 | 0 | 0 |
| | <i>A. suis</i> | + | + | 0 |
| | <i>E. coli</i> | + | + | 0 |

Nota: +++: Halos de inhibición de diámetro entre 16 y 18 mm. ++: Halos de inhibición de diámetro entre 10 y 15 mm. +: Halos de inhibición de diámetro entre 7 y 9 mm. 0: sin inhibición.

| | | | | |
|----|------------------------|---|---|---|
| | <i>Pseudomonas sp.</i> | 0 | 0 | 0 |
| | <i>A. suis</i> | + | + | 0 |
| | <i>E. coli</i> | + | + | 0 |
| JS | <i>E. raffinosus</i> | + | + | 0 |
| | <i>Pseudomonas sp.</i> | + | + | 0 |
| | <i>A. suis</i> | + | + | 0 |
| | <i>E. coli</i> | + | + | 0 |
| SM | <i>E. raffinosus</i> | 0 | 0 | 0 |
| | <i>Pseudomonas sp.</i> | 0 | 0 | 0 |
| | <i>A. suis</i> | + | + | 0 |
| | <i>E. coli</i> | + | 0 | 0 |
| MX | <i>E. raffinosus</i> | + | 0 | 0 |
| | <i>Pseudomonas sp.</i> | 0 | 0 | 0 |
| | <i>A. suis</i> | + | + | 0 |
| | <i>E. coli</i> | + | + | 0 |

Nota: +++: Halos de inhibición de diámetro entre 16 y 18 mm. ++: Halos de inhibición de diámetro entre 10 y 15 mm. +: Halos de inhibición de diámetro entre 7 y 9 mm. 0: sin inhibición.

De los 33 sobrenadantes utilizados solo 18 tuvieron actividad antimicrobiana (CAT, 2, 5, CA1, GT y 3T) sobre las 4 cepas multirresistentes y estos provenían de los filtros 30 KDa y 10 KDa.

Los halos que se formaron fueron de diferente tamaño, dependiendo del filtro, para el caso de 2, CA1 y 3T existió un mayor efecto antimicrobiano de su sobrenadante proveniente del filtro de 30 KDa, en cambio para CAT, 5 y GT fue mayor el efecto con el sobrenadante de 10 KDa; por lo que para la parte de caracterización solo se ocuparon estos 6 sobrenadantes.

En la figura 17 se muestran imágenes del efecto antimicrobiano de los distintos sobrenadantes sobre la población bacteriana por la metodología de difusión en discos.

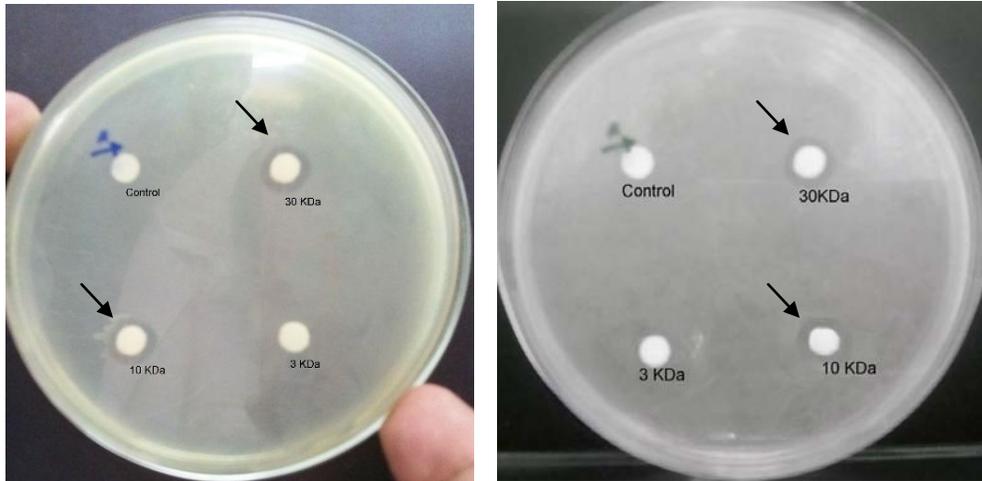


Figura 17. Fotografías del efecto antimicrobiano del sobrenadante de la cepa CAT sobre *Pseudomonas sp.* (izquierda) y *E. coli* (derecha).

De las 6 cepas 67% pertenecen al género *Myxococcus* y 33% a *Stigmatella*.

4.4.2. Determinación de la cantidad mínima requerida de sustancia antimicrobiana

Una vez que se comprobó que hubo inhibición del crecimiento bacteriano con 15 μ L del sobrenadante concentrado se prosiguió a probar diferentes cantidades del mismo.

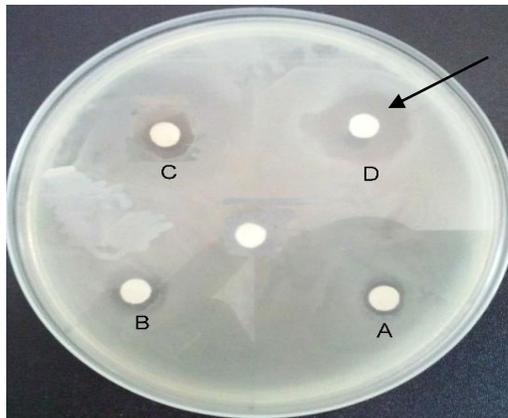


Figura 18. Fotografía de los halos de inhibición originados con la cepa *Actinobacillus suis* con diferentes cantidades del sobrenadante de la cepa CA1, filtro 30 KDa: A) 5 μ L, B) 10 μ L, C) 15 μ L y D) 20 μ L

En la tabla 5 se observa el tamaño de los halos producidos en cada cepa con diferentes cantidades de sobrenadante.

Tabla 5. Tamaño de los halos producidos en cada cepa por las diferentes cantidades de sobrenadante.

| Cepa myxobacteria | Cantidad de sobrenadante | Cepas multirresistentes | | | |
|----------------------|-----------------------------|-------------------------|------------------------|----------------|----------------|
| | | <i>E. raffinosus</i> | <i>Pseudomonas sp.</i> | <i>A. suis</i> | <i>E. coli</i> |
| 2 (30KDa) | 5 µL | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 10 µL | 0 | + | + | + |
| | 15 µL | + | ++ | ++ | ++ |
| | 20 µL | ++ | +++ | +++ | +++ |
| CA1 (30KDa) | 5 µL | + | 0 | 0 | + |
| | 10 µL | + | + | 0 | 0 |
| | 15 µL | + | ++ | ++ | ++ |
| | 20 µL | +++ | ++ | ++ | +++ |
| 3T (30KDa) | 5 µL | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 10 µL | 0 | + | 0 | + |
| | 15 µL | + | ++ | + | ++ |
| | 20 µL | ++ | ++ | ++ | +++ |
| CAT (10KDa) | 5 µL | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 10 µL | 0 | 0 | + | + |
| | 15 µL | + | + | ++ | ++ |
| | 20 µL | ++ | ++ | +++ | ++ |
| 5 (10KDa) | 5 µL | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 10 µL | 0 | + | + | + |
| | 15 µL | + | + | ++ | ++ |
| | 20 µL | ++ | ++ | +++ | +++ |
| GT (10KDa) | 5 µL | 0 | + | + | 0 |
| | 10 µL | 0 | + | + | + |
| | 15 µL | + | ++ | ++ | ++ |
| | 20 µL | ++ | +++ | +++ | +++ |

Nota: +++: Halos de inhibición de diámetro entre 16 y 18 mm. ++: Halos de inhibición de diámetro entre 11 y 15 mm. +: Halos de inhibición de diámetro entre 7 y 10 mm. 0: sin inhibición.

4.5. Pruebas de caracterización del sobrenadante concentrado

4.5.1. Termoestabilidad. Después de someter las muestras a las distintas temperaturas, los sobrenadantes de las cepas que aún presentaron actividad inhibitoria fueron la CAT, CA1 Y 2. Lo que indica que la sustancia antimicrobiana

que está causando el efecto inhibitorio en dichas cepas es termoestable. En la Tabla 6, se muestran los resultados obtenidos en los ensayos.

Tabla 6. Resultados de la prueba de termoestabilidad

| Cepa | Bacteria multirresistente | Temperatura (°C) | | |
|----------------|---------------------------|------------------|----|-----|
| | | 60 | 80 | 100 |
| 2 (30KDa) | <i>E. raffinosus</i> | + | + | + |
| | <i>Pseudomonas sp.</i> | + | + | + |
| | <i>A. suis</i> | ++ | ++ | ++ |
| | <i>E. coli</i> | ++ | ++ | ++ |
| CA1 (30KDa) | <i>E. raffinosus</i> | + | + | + |
| | <i>Pseudomonas sp.</i> | ++ | ++ | ++ |
| | <i>A. suis</i> | ++ | ++ | ++ |
| | <i>E. coli</i> | ++ | ++ | ++ |
| 3T (30KDa) | <i>E. raffinosus</i> | 0 | 0 | 0 |
| | <i>Pseudomonas sp.</i> | 0 | 0 | 0 |
| | <i>A. suis</i> | 0 | 0 | 0 |
| | <i>E. coli</i> | 0 | 0 | 0 |
| CAT (10KDa) | <i>E. raffinosus</i> | + | + | + |
| | <i>Pseudomonas sp.</i> | ++ | ++ | ++ |
| | <i>A. suis</i> | ++ | ++ | ++ |
| | <i>E. coli</i> | ++ | ++ | ++ |
| 5 (10KDa) | <i>E. raffinosus</i> | 0 | 0 | 0 |
| | <i>Pseudomonas sp.</i> | 0 | 0 | 0 |
| | <i>A. suis</i> | 0 | 0 | 0 |
| | <i>E. coli</i> | 0 | 0 | 0 |
| GT (10KDa) | <i>E. raffinosus</i> | 0 | 0 | 0 |
| | <i>Pseudomonas sp.</i> | 0 | 0 | 0 |
| | <i>A. suis</i> | 0 | 0 | 0 |
| | <i>E. coli</i> | 0 | 0 | 0 |

Nota: +++: Halos de inhibición de diámetro entre 16 y 18 mm. ++: Halos de inhibición de diámetro entre 11 y 15 mm. +: Halos de inhibición de diámetro entre 7 y 10 mm. 0: sin inhibición.

4.5.2. Estabilidad en intervalo de pH. Los sobrenadantes de todas las cepas presentaron efecto inhibitorio solo a pH 7, y los resultados fueron los mismos que en la tabla 4, ya que fue al pH con el que se estuvo trabajando desde la obtención de las sustancias antimicrobianas.

4.5.3. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) Schagger, H. y Von Jagow G.

Para poder observar la posible presencia de bacteriocinas se corrieron geles de proteínas con el sobrenadante de las myxobacterias crecidas en el medio LB; se utilizó el sobrenadante concentrado, filtro 30 KDa (2, CA1 Y 3T) y 10 KDa (CAT, 5, y GT), de las 72 horas de incubación.

En la figura 19 se muestra un gel de proteínas realizado; se observan las bandas de los pesos moleculares (KDa) y las bandas obtenidas de los distintos sobrenadantes.

Para calcular el peso molecular de las bandas obtenidas se utilizó la siguiente ecuación:

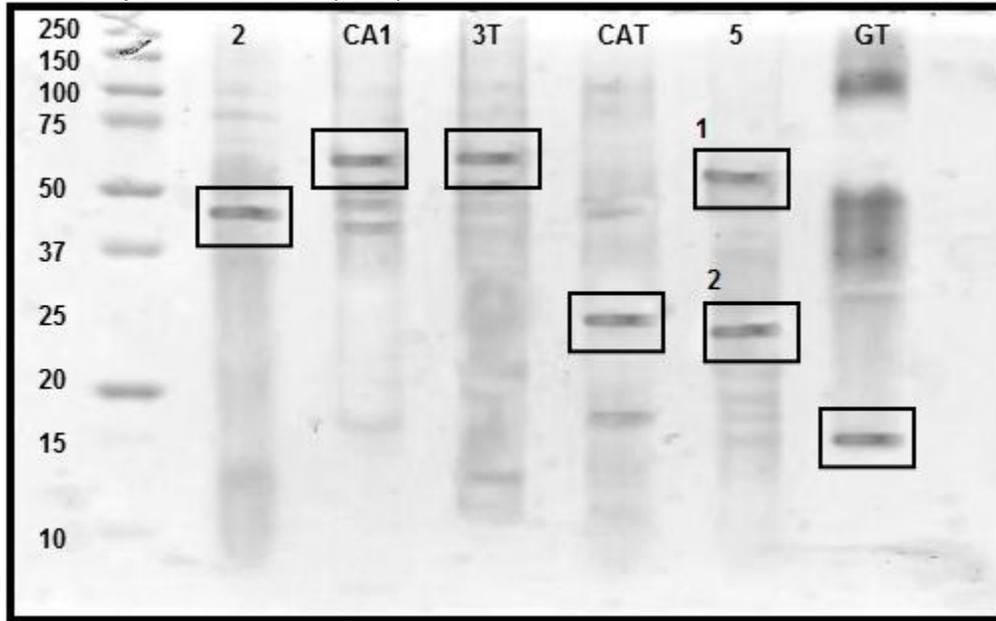
$$y = 1.3396x + 0.8425 \text{ ec. 1}$$

donde x= Rf de la muestra problema.

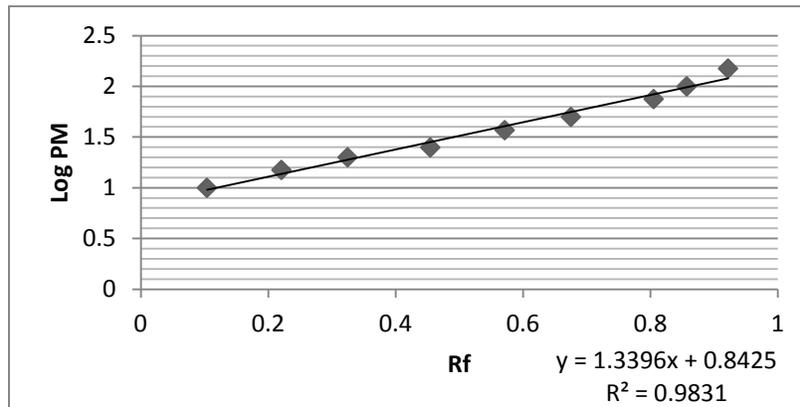
$$Rf = \frac{\text{distancia recorrida de la proteína (mm)}}{\text{distancia total recorrida (mm)}} \text{ ec. 2}$$

El peso molecular se calculó solo para las bandas que están dentro de los recuadros (Fig. 19), ya que como se observa la banda es más intensa comparada con las demás lo que nos indica que existe una mayor cantidad de proteína y que esta posiblemente sea la que tiene actividad antimicrobiana.

Figura 19. Fotografía del gel de proteínas realizado con el sobrenadante de cada cepa y el marcador de peso molecular (KDa).



Gráfica 1. Gráfica del logaritmo del peso molecular de los marcadores contra el Rf de los marcadores para el gel de proteínas.



En la tabla 7 se muestran los pesos moleculares calculados con la ecuación 1 para las bandas dentro de los recuadros.

Estos resultados son coherentes si vemos del filtro del que venía la muestra. Por ejemplo, el sobrenadante que se ocupó para el gel de la cepa 2 fue el del filtro de 30KDa por lo que se tenían que ver bandas de proteínas solo con peso molecular mayor a 30 KDa , y en este caso la proteína tuvo un peso de 49.53 KDa.

Tabla 7. Peso molecular calculado con la ecuación 1.

| Sobrenadante | PM (KDa) |
|---------------------|-----------------|
| 2 | 49.53 |
| CA1 | 62.99 |
| 3T | 62.99 |
| CAT | 40.55 |
| 5 | 58.15 |
| | 26.09 |
| GT | 14.31 |

En la tabla 8 se presente el resumen de los resultados obtenidos durante toda la parte experimental para cada una de las myxobacterias estudiadas.

Tabla 8. Resumen de resultados para cada cepa de myxobacteria

| Cepa | Género | PM de las posibles bacteriocinas que producen (KDa) | Prueba de termoestabilidad |
|-------------|--------------------|------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| 2 | <i>Myxococcus</i> | 49.53 | Termoestable |
| CA1 | <i>Stigmatella</i> | 62.99 | Termoestable |
| 3T | <i>Myxococcus</i> | 62.99 | Termolábil |
| CAT | <i>Myxococcus</i> | 40.55 | Termoestable |
| 5 | <i>Myxococcus</i> | 58.15 | Termolábil |
| | | 26.09 | Termolábil |
| GT | <i>Stigmatella</i> | 14.31 | Termolábil |

5. DISCUSIÓN

Se aislaron un total de 22 cepas de myxobacterias a partir de 6 muestras de tierra y materia vegetal en descomposición, de distintas partes del Valle de México. De estas cepas, el 50% fueron del género *Stigmatella*, 36.4% a *Myxococcus* y el 13.6% pertenecen a *Polyangium*. Cabe mencionar que para la identificación de estas cepas se tomaron en cuenta las características macroscópicas y microscópicas y se siguieron los criterios morfológicos de Reichenbach (1990) para poder identificar el género al que pertenecían.

Posteriormente, las bacterias aisladas y purificadas se inocularon en un medio adecuado para la obtención de las sustancias antimicrobianas. En este caso se utilizó 100 mL de medio LB, ya que éste contiene peptona y extracto de levadura los cuales le proporcionaron la fuente de nitrógeno necesaria para su crecimiento y además también contribuyen a la producción de bacteriocinas.

La temperatura se mantuvo en 32 °C, con base a los criterios que establecieron en estudios previos Gaspari, Guo y Tao y Shimkets, donde indican que para una producción adecuada de estas sustancias se debe mantener la temperatura entre 28 y 32 °C. Respecto al pH, debe mantenerse entre 6.5-8.5, en nuestro caso utilizamos un pH de 7 que lo proporcionó el medio LB. La agitación se mantuvo constante, 160 rpm, debido a que si se ejercía demasiado estrés mecánico algunas cepas podrían llegar a lisarse y además se evitaba la formación de espuma.

Se realizaron pruebas de inhibición con los sobrenadantes obtenidos de cada cepa a distintos tiempos de incubación. Se observó que a partir de las 72 hr comenzaba la producción de sustancias antimicrobianas (Fig. 14); esto se vio reflejado en la formación de halos de inhibición. De las 22 cepas solo 11 fueron capaces de producir estas sustancias e inhibir a las dos cepas tipo, siendo 64% del género *Myxococcus* y 36% *Stigmatella*. Esta parte nos sirvió para seleccionar

las cepas de myxobacterias que ocuparíamos para la obtención y caracterización de la proteína de interés (bacteriocina), y además para determinar el tiempo en que se comenzaban a producir.

En la tabla 3 se observan las 11 cepas que produjeron sustancias antimicrobianas, con su nomenclatura y al género al que pertenecen. Estas de nuevo se inocularon en medio LB y transcurridas las 72 hr se procedió a centrifugar 10 mL para la obtención solo del sobrenadante; este se precipitó con sulfato de amonio para separar los posibles proteínas presentes en el sobrenadante de las demás sustancias y que estas pudieran ser bacteriocinas.

Una vez obtenidos estos sobrenadantes se concentraron con Filtros Millipore Amicon de distintos tamaños (30 KDa, 10 KDa y 3KDa). Se ocuparon debido a que las bacteriocinas tiene un peso molecular de <5KDa hasta >30 KDa, basándonos en la clasificación de Kemperman (2003) para bacteriocinas producidas por bacterias lácticas. Se realizó la prueba de inhibición con los sobrenadantes concentrados sobre las cepas multirresistentes a antibióticos, las cuales previamente se habían caracterizado (Fig. 16).

En la tabla 4 se observa el tamaño de los halos de inhibición en las cepas multirresistentes, viéndose que de los 33 sobrenadantes solo 18 inhibieron a las 4, siendo 67% provenientes de las myxobacterias del género *Myxococcus* y 33% de *Stigmatella*, y estos eran de los filtros de 30KDa (2, CA1, 3T) y 10KDa (CAT, 5, GT) lo que nos indica que solamente tenemos posibles bacteriocinas que tienen un peso molecular >10KDa y estas están presentes en mínimas cantidades por lo cual los halos se veían pequeños (Fig. 16), también hay que tomar en cuenta otros factores que pudieron influir en el tamaño del halo como es: la sensibilidad de las bacterias a las posibles bacteriocinas, que tal vez estas no difundieran bien en el agar, el tiempo y temperatura de incubación. Si bien esos 18 sobrenadantes inhibieron a todas las cepas multirresistentes, el tamaño de los halos formados fue menor en la cepa *Enterococcus raffinosus*, teniendo un diámetro entre 7 y 9 mm,

lo que nos indica que el efecto antimicrobiano fue menor, esto puede deberse a que las posibles bacteriocinas presentes en el sobrenadante tienen un espectro de acción más amplio contra bacterias Gram negativas, lo que coincide con lo descrito en la literatura de que las bacteriocinas tienen una mayor actividad antimicrobiana sobre bacterias estrechamente relacionadas. En general se puede decir que las bacteriocinas producidas por las bacterias Gram negativas tienen un espectro de acción más amplio contra bacterias Gram negativas y algunas veces contra unas pocas bacterias Gram positivas.

El mecanismo por el cual estas bacteriocinas inhibieron a las bacterias multirresistentes puede ser por medio de la formación de poros en la membrana bacteriana, la cual queda permeabilizada, la célula empieza a perder iones y metabolitos fundamentales para su supervivencia y eventualmente se produce la muerte. Otro mecanismo es por medio de la inhibición de la biosíntesis del ADN que conlleva a la muerte celular (Brötz y Shal 2000).

Como se vio en los resultados de la tabla 4 el sobrenadante concentrado del filtro de 3KDa no tuvo efecto antimicrobiano en ninguna de las cepas, esto puede indicar dos cosas: una que las myxobacterias utilizadas no producen bacteriocinas del rango de >3KDa a 10KDa o bien sí las producen pero las cepas multirresistentes no fueron sensibles a este tipo.

Una vez que se observó que con 15 μ L del sobrenadante concentrado se originaban halos de un tamaño satisfactorio, se procedió a probar diferentes cantidades de éste (5, 10 y 20 μ L). En la tabla 5 se presentan los tamaños de los diferentes halos generados en cada cepa y se observa que conforme la cantidad del sobrenadante disminuye se generan halos de tamaño un poco menor, tanto que con 5 μ L ya el halo casi no era visible en la mayoría de las cepas por lo que ya no se probó con volúmenes más pequeños.

De igual manera, se observó que con 20 μ L el halo era mucho más visible en las cepas multirresistentes teniendo un tamaño entre 16 y 18 mm, lo que nos dice que se tenía mayor cantidad de proteína y que para tener un mayor efecto inhibitorio necesitamos una cantidad mayor a 20 μ L por lo que se recomienda utilizar otra técnica para volúmenes mayores. En la figura 18 se pueden observar los halos producidos en la cepa *A. suis* con las diferentes cantidades del sobrenadante producido por la cepa CA1.

El actual uso de las bacteriocinas es como conservador de alimentos, como por ejemplo la nisina que se utiliza para prevenir el desarrollo y crecimiento de *Clostridium botulinum* y, por tanto la producción de la toxina botulínica, en la elaboración de quesos pasteurizados. Para que una bacteriocina sea ideal para usarse como conservador debe de cumplir con los siguientes parámetros: resistencia térmica, ya que esto permite su aplicación a productos enlatados y conservados a altas temperaturas, y su estabilidad a valores bajos de pH (menos a 6). Teniendo como antecedente lo anterior se procedió a realizar las pruebas de termoestabilidad, estabilidad a intervalo de pH y peso molecular, los resultados obtenidos de estas pruebas se utilizaron para clasificar a las posibles bacteriocinas de acuerdo a la clasificación de Kemperman (2003).

En la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos de la prueba de termoestabilidad. Se observa que las bacteriocinas presentes en los sobrenadantes de las cepas CAT, CA1 y 2 son termoestables mientras que los de las cepas 3T, 5 y GT son termolábiles. Para la prueba de estabilidad a intervalo de pH los resultados nos indicaron que las bacteriocinas pierden su actividad antimicrobiana tanto para valores menores a 7 y mayores, por lo que esto sería una desventaja para utilizarse como conservador o en procesos de fermentación.

Para conocer el peso molecular de las posibles bacteriocinas que se encontraban en los sobrenadantes se realizó una electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Schagger, H. y Von Jagow G.), este tipo de

electroforesis es muy eficiente en la resolución de proteínas de peso molecular menores a 100KDa, y además tiene como ventaja que no hay necesidad de concentrar la proteína si se tiene poco de esta en la muestra.

En el gel que se realizó (Fig.19, Pág. 51) se observan bandas de bajo peso molecular (<100KDa) que estas están separadas y definidas. En cada carril se colocó la muestra de cada cepa y en todas se observa que hay más de una banda, esto se debe a que solo se realizó una purificación parcial, y por tanto tenemos más de una proteína en la muestra. Esto no está del todo mal ya que la literatura nos dice que todas las bacterias son capaces de producir más de un tipo de bacteriocina.

Para realizar el cálculo del peso molecular solo se tomaron en cuenta las bandas de los recuadros, las cuales son más intensas en comparación a las demás, lo que nos indica que se tiene una mayor cantidad de esa proteína en particular y esta podría ser la que tenga la capacidad de inhibir a las cepas multirresistentes a antibióticos. Para confirmar esto se necesitaría realizar una purificación total de esta proteína y de las demás presentes en la muestra por medio de una cromatografía HPLC y una vez purificadas de nuevo realizar una prueba de inhibición por difusión en agar, para ver si sigue existiendo actividad antimicrobiana sobre las cepas multirresistentes.

Relacionando los resultados obtenidos con la clasificación de bacteriocinas de Kemperman (2003), se vio que solo las bacteriocinas de las cepas 3T y 5 (Tabla 8) se podían clasificar dentro de la clase III, las cuales son de elevado peso molecular (>30KDa) y termolábiles.

Tanto del género *Myxococcus* y *Stigmatella* se pudieron identificar más de un tipo de bacteriocina, por ejemplo en la cepa 2 que corresponde al género *Myxococcus* se tuvo una bacteriocina de peso molecular de 43.53KDa y en la cepa 5 del mismo género una de 26.09KDa; esto reafirma lo dicho anteriormente de que las

bacterias con capaces de producir diferentes tipos de bacteriocinas. De este género (*Myxococcus*) fue del que más bacteriocinas se identificaron.

La detección de cepas de myxobacterias productoras de sustancias antimicrobianas de origen proteico (bacteriocinas) es muy importante porque permitirá hacer estudios posteriores que puedan establecer su potencial en el manejo y control de procesos infecciosos ocasionado por bacterias multirresistentes a antibióticos, así como su uso en la industria alimenticia. Sin embargo, como se vió esto no es nada fácil y se requieren de varios pasos metodológicos para identificar, producir y purificar dichas sustancias.

6. CONCLUSIONES

1. Se aislaron y caracterizaron 22 cepas de myxobacterias de suelos urbanos, semiurbanos y rurales del Valle de México de las cuales el 50% fueron del género *Stigmatella*, 36.4% a *Myxococcus* y el 13.6% a *Polyangium*.
2. De los 22 sobrenadantes obtenidos de las cepas de myxobacterias solo 11 (64% *Myxococcus* y 35% *Stigmatella*) tuvieron un efecto inhibitorio efectivo y satisfactorio sobre las cepas indicador.
3. Se obtuvieron sustancias antimicrobianas de origen proteico de los sobrenadantes de 6 cepas de myxobacterias, los cuales tuvieron un efecto inhibitorio efectivo sobre las diferentes cepas de bacterias multirresistentes a antibióticos, teniendo un espectro de acción más amplio contra bacterias Gram negativas.
4. De las posibles bacteriocinas presentes en los sobrenadantes concentrados 57% fueron termolábiles y 43% termoestables, tienen un peso molecular >10KDa y su efecto inhibitorio solo es a pH de 7.
5. Las posibles bacteriocinas presentes en mayor proporción en los sobrenadantes podrían ser las principales causantes de la inhibición de las bacterias multirresistentes a antibióticos, pero no se puede descartar la posibilidad de que los bacteriocinas que se encuentran en menor proporción contribuyan con algunas propiedades antibacterianas.
6. Los géneros *Myxococcus* y *Stigmatella* producen diferentes tipos de bacteriocinas.
7. Solo se pudo clasificar a las posibles bacteriocinas producidas por las cepas 3T y 5 dentro de la clase III de la clasificación de Kemperman (2003).

REFERENCIAS

1. Abee, T., Rombouts, F. Mode of action on nisin Z against *Listeria monocytogenes* Scott A grown at high and low temperatures. *Appl Environ Microbiol.* Jun 1994; 60(6): 1962–1968.
2. Ali SQ, Zehra A, Naqvi BS, Shah S, Bushra R. Resistance pattern of ciprofloxacin against different pathogens. *Oman Med J.* 2010; 25(4):294-8.
3. Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E., & Lipman, D. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* 215:729–731.
4. Alliance for the Prudent Use of Antibiotic. Antibiotic resistance: Careful antibiotic use can help control the growing problem. 1999
5. Bentley R (1997) Microbial secondary metabolites play important roles in medicine: prospects to discovery of new drugs. *Perspect Biol Med* 40: Pág 364–394
6. Bode, H., & Müller, R. 2006. Analysis of myxobacterial secondary metabolism goes molecular. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33: 577–588.
7. Borges-Walmsley, M.; McKeegan, K. & Walmsley, A. Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. *Biochem. J.* **376**, 313–338 (2003).
8. Broadbent, J. *Lactobacillus casei*. Universidad de California. *sl.* 2003. [Citado mayo 15 de 2014] <http://genome.jgi-psf.org>
9. Broadbent, J. R., C. Chou, K. Guillies, y J. K. Kondo. 1989. Nisin inhibits several gram-positive, mastitis-causing pathogens. *J. Dairy Sci.* 72:3342-3345.
10. Calvo J, Martínez-Martínez L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica.* 2009 Jan; 27(1):44-52.
11. Cancho, García. El uso de los antibióticos en la alimentación animal: perspectiva actual. *Ciencia y Tecnología de los Alimentos de Galicia (ALTAGA).* (2000): 39-47.
12. Chambers H. Quimioterapéuticos. In: Katzung B, editor. *Farmacología básica y clínica.* Décima ed. México: Manual Moderno; 2007. p. 751-806.
13. Chikidinas, M. García-Garcera, M. Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0 forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. *Appl. and Environ Microbiol. sl.* 1993.
14. Chung, H. Control of foodborne pathogens by bacteriocin-like substances from *Lactobacillus spp.* in combination with high pressure processing. Ohio State University. Ohio. 2003.
15. Chung, K. Effects of missing on growth of bacteria attached to meat. *sl.* 1989.
16. Cid Ledesma E, Cid Ledesma MT, Cortés Gabaudan F, Ledesma Martín MC, Marchena M, Pedrero P, et al. *Dicciomed.es. Diccionario médico-biológico, histórico y etimológico:* Ediciones Universidad de Salamanca; 2007.
17. Dawid, W., 2000. Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 403–427.
18. De Baets, S., Vandedrinc, S., Vandamme, E. (2000). Vitamins and related biofactors, microbial production. *Encyclopedia of microbiology.* Academic, London, 4: Pág 837–853
19. Demain, Al. (1996). Fungal secondary metabolism: regulation and functions. In: SuttonB (ed) *A century of mycology.* Cambridge University Press, Cambridge, USA, 23 Pág 3–254.
20. Doyle, M. *Food microbiology. Fundamentals and frontiers. sl.* 1997.
21. Dworkin, M. 1996. Recent advances in the social and developmental biology of myxobacteria. *Microb. Rev.* 60: 70–102.
22. Dworkin, M., & Kaiser, D., eds. 1993. *Myxobacteria II.* Washington DC: American Society for Microbiology Press.
23. Ennahar, S. Class IIa bacteriocinas: Biosynthesis, structure and activity. *sl.* 2000.
24. Estrhol, WR. (1997). Industrial antibiotics: today and the future. In: Strohl WR (ed) *Biotechnology of antibiotics,* 2nd Ed. Marcel Dekker, New York, Pág 1–47.
25. Farías, M.E. Estudios bioquímicos y genéticos de bacteriocinas producidas por bacterias lácticas. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Tucumán. México. 1996.
26. Fishman N. Antimicrobial stewardship. *Am J Med.* 2006 Jun;119(6 Suppl 1):S53-61;S2-70.
27. Fluit, A. & Schmitz, F. Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect.* **10**, 272–288 (2004).
28. Freeman, B. *Tratado de microbiología de URROS.* México. 1989

29. Galvin, M., C. Hill, y R. P. Ross. 1999. Lacticin 3147 displays activity in buffer against Gram-positive pathogens which appear insensitive in standard plate assays. *Lett. Appl. Microbiol.* 28:355-358.
30. Gerth, K. & Müller, R. 2005. Moderately thermophilic Myxobacteria: novel potential for the production of natural products isolation and characterization. *Environ. Microb.* 7: 874–880.
31. Gold HS, Moellering RC, Jr. Antimicrobial-drug resistance. *N Engl J Med.* 1996;335(19):1445-53
32. Gustafsson I, Sjolund M, Torell E, Johannesson M, Engstrand L, Cars O, et al. Bacteria with increased mutation frequency and antibiotic resistance are enriched in the commensal flora of patients with high antibiotic usage. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52(4):645-50.
33. Hsueh PR, Shyr JM, Wu JJ. Decreased erythromycin use after antimicrobial reimbursement restriction for undocumented bacterial upper respiratory tract infections significantly reduced erythromycin resistance in *Streptococcus pyogenes* in Taiwan. *Clin Infect Dis.* 2005; 40(6):903-5.
34. Jack, R. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *sl.* 1995.
35. Jay, J. Microbiología moderna de que los alimentos. Zaragoza (España). 1992.
36. Kalchayanand. Hydrostatic pressure and electroporation have increased bacterial efficiency in combination with bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol. sl.* 1994.
37. Kemperman, R., A., Karsens, H., Naura, A., Kuipers, O., & Kok, J., Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574, *Appl Environ Microbiol*, 69, 1589-1597. 2003.
38. Keller, N.P., *et al.*, Fungal secondary metabolism, from biochemistry to genomics, *Nature reviews, Microbiology*, 3: 937-947, 2005.
39. Klaenhammer, T. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *sl.* 1993.
40. Lee. F., *et al.*, Preclinical discovery of ixabepilone, a highly active antineoplastic agent, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 63:157–166, 2008.
41. Lipsitch, M., C. T. Bergstrom, y B. R. Levin. 2000. The epidemiology of antibiotic resistance in hospitals: paradoxes and prescriptions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:1938-1943.
42. Lowy, Furuya. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nature* (2006): 36-45.
43. MacDougall C, Polk RE. Antimicrobial stewardship programs in health care systems. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(4):638-56.
44. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock. *Biología de los medicamentos.* 10a ed. Madrid: Pearson Educación, S.A.; 2004.
45. Mazel, D. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature Rev.* 4, 608-620 (2006)
46. Monnet DL, MacKenzie FM, Lopez-Lozano JM, Beyaert A, Camacho M, Wilson R, et al. Antimicrobial drug use and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Aberdeen, 1996-2000. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(8):1432-41.
47. Montville, T.J., Winkowski, K. Biologically based preservation systems and probiotic bacteria. *Food microbiology.* First edition. Editorial Am. Soc. Microbiol. USA. 1997.
48. Morales, J.M., Martínez, D.C., Tejero, J.M., Mendoza, P.G. Desarrollo y caracterización de una película activa de estructura monocapa y bicapa. *RESPYN, Revista Salud Pública y Nutrición.* México. 2004.
49. Nikaido, H. Multidrug resistance in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 119–146 (2009).
50. Pelezar. Elementos de microbiología. México. 1991
51. Piddock, L. Multidrug-resistance efflux pumps— not just for resistance. *Nature Rev.* 4, 629-636 (2006).
52. Reichenbach, H. 1983. A simple method for the purification of myxobacteria. *J. Microbiol. Meth.* 1:77–79.
53. Reichenbach, H. 1993. *Myxobacteria II.* Washington, DC, USA: American Society for Microbiology.
54. Reichenbach, H., 1999. The ecology of the myxobacteria. *Environ. Microbiol.* 1: 15–21.
55. Reichenbach, H. 2001. Myxobacteria, producers of novel bioactive substances. *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.* 27:149–156.

56. Reichenbach, H. & Dworkin, M., 1992. The myxobacteria. In: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.H. (Eds.), *The Prokaryotes*, second ed. Springer-Verlag, New York, pp. 3416–3487.
57. Reichenbach, H., & Höfle, G. 1993. Biologically active secondary metabolites from myxobacteria. *Biotech. Adv.* 11:219–277.
58. Riley, M. A., y J. E. Wertz. 2002. Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. *Annu. Rev. Microbiol.* 56:117-137.
59. Roos, R. Developing applications for Lactococcal bacteriocins. *sl.* 1999.
60. Roy, P. H., 1997. Dissemination of antibiotic resistance. *Med. Sci.* 13:927-933.
61. Ryan, M. P., W. J. Meaney, R. P. Ross, y C. Hill. 1998. Evaluation of lacticin 3147 and teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2287-2290.
62. Salminen, S., Wright, A. V., Owehand, A. *Lactic Acid Bacteria*. Third edition. Editorial Board. 2004.
63. Sahl, H. Structural similarities of the Staphylococcin-like peptide Pep 5 to the antibiotic nisin. *sl.* 1985.
64. Schause, A., Rojas, C. Envases activos en nisina (bacteriocina) a partir de almidón y harina de sorgo. *RESPYN, Revista Salud Pública y Nutrición*. México. 2004.
65. Stevens, D. Nisin treatment for inactivation of salmonella species and other Gram-negative bacteria. *sl.* 1991.
66. Taylor, J.I., A. Hirsh, y T. R. Mattick. 1949. The treatment of bovine streptococcal and staphylococcal mastitis with nisin. *The Vet Record* 61:197-198.
67. Uetrecht. *Principios de la terapéutica antimicrobiana*. Kalant, Roschlau. *Principios de la farmacología médica*. Reverte, 2002. 648,649,674,675,682,683,691,692.
68. Walter, E. S., y F. Levy. 2001. Genetic trends in a population evolving antibiotic resistance. *Evolution* 55:1110-1122.
69. Waksman. What is an antibiotic or an antibiotic substance? *Mycological Society of America*. (1947): 565-569.
70. Yamaguchi, Saga. History of Antimicrobial Agents and Resistant Bacteria. *JMAJ* (2001): 103-108.
71. Zhang, L., Wang, H., Fang, X., Stackebrandt, E., & Ding, Y. 2003. Improved methods of isolation and purification of myxobacteria and development of fruiting body formation of two strains. *J. Microbiol. Meth.* 54: 21–27.

ANEXOS

ELABORACIÓN DE CAJAS DE SÍLICA GEL

Para la elaboración de la sílica gel se preparan las soluciones según lo indica la tabla 1.

| Solución A | | Solución B | |
|----------------------------|-------|----------------------------|-------|
| HCl concentrado | 61 mL | Silicato de sodio | 18 mL |
| H ₂ O destilada | 39 mL | H ₂ O destilada | 82 mL |

Tabla 1. Soluciones para preparar la sílica gel

Se mezclan volúmenes iguales, vertiendo lentamente la mezcla B en la mezcla A, con agitación. La mezcla se vacía en cajas Petri, una vez solidificadas se dializan en agua destilada por 3 días, cambiando el agua cada día; se monitorea el pH, cuando se llegue a pH aproximado de 5 se coloca un círculo de papel filtro Whatman 1. Por el pH ácido (debido al HCl) se agrega 1 mL de CaCO₃ al 2%, hasta obtener un pH de 7.

MEDIO CY

| Ingrediente | Porcentaje |
|---------------------------------------|------------|
| Peptona de Caseína | 0.3 |
| Extracto de levadura | 0.1 |
| CaCl ₂ · 2H ₂ O | 0.1 |
| Agar bacteriológico | 1.5 |

Para preparar caldo CY, solo se omite el agar bacteriológico.

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LAS CEPAS AISLADAS DE MYXOBACTERIAS EN MEDIO MC CONKEY

| Cepa | Colonias en agar Mc Conkey |
|------|---------------------------------------------------------|
| Cat | Circular, borde entero, elevada, viscosa, rosa |
| 2 | Puntiforme, borde entero, elevada, cremosa, rosa |
| 4 | Circular, borde entero, elevada, cremosas, rosa |
| 5 | Puntiforme, borde entero, elevada, cremosa, rosa |
| 7 | Puntiforme, borde entero, elevada, cremosa, rosa |
| 8 | Circular pequeña, borde entero, elevada, cremosas, rosa |
| 10 | Circular, borde entero, elevada, viscosa, rosa |
| 11 | Circular, borde entero, elevada, cremosas, rosa |
| Ca1 | Puntiforme, borde entero, cremosa, rosa |
| Ca2 | Circular, borde entero, elevada, cremosa, rosa |

| | |
|-----|--------------------------------------------------------|
| Ca3 | Circular, borde entero, elevada, viscosa, rosa |
| CuA | Circular, borde entero, elevada, viscosa, rosa |
| 8 | Puntiforme, borde entero, elevada, cremosa, rosa |
| 4T | Circular, borde entero, elevada, cremosas, rosa |
| GT | Circular, borde entero, elevada, viscosa, rosa |
| 2T | Circular pequeña, borde entero, elevada, cremosa, rosa |
| 3T | Puntiforme, borde entero, elevada, cremosa, rosa |
| P1 | Puntiforme, borde entero, elevada, cremosa, rosa |
| CU | Puntiforme, borde entero, elevada, cremosa, rosa |
| JS | Circular, borde entero, elevada, viscosa, rosa |
| SM | Circular, borde entero, elevada, cremosas, rosa |
| MX | Puntiforme, borde entero, elevada, cremosa, rosa |

Nota: La nomenclatura de cada cepa se designo arbitrariamente.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA

La cuantificación de proteína se basó en el método diseñado por Bradford (1976). En una placa de 96 pozos (Corning incorporated, Corning, NY, USA) se colocaron 2.0 μL de muestra y se añadió el volumen de agua necesario para alcanzar 100 μL . Se preparó una curva estándar de albúmina sérica bovina (ABS) a partir de un stock que tenía 10 mg/mL de ABS, colocando el volumen de muestra y agua que se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Preparación de la curva patrón de ABS para la determinación de proteína mediante Bradford

| Tubo | Vol. del stock μL | Agua μL | Concentración final de ABS $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ |
|------|------------------------------|--------------------|------------------------------------------------------|
| 0 | 0 | 100 | 0 |
| 1 | 10 | 90 | 1.2 |
| 2 | 20 | 80 | 2.4 |
| 3 | 30 | 70 | 3.6 |
| 4 | 40 | 60 | 4.8 |
| 5 | 50 | 50 | 6.0 |
| 6 | 60 | 40 | 7.2 |
| 7 | 70 | 30 | 8.4 |
| 8 | 80 | 20 | 9.6 |
| 9 | 90 | 10 | 10.8 |
| 10 | 100 | 0 | 12 |

Tanto a la curva patrón como a las muestras se le agregó 150 μL del reactivo de Bradford (previamente diluido 1:4 con agua destilada) (Bio-Rad Protein assay, Bio-Rad Laboratories inc., CA, USA). Posteriormente se leyó a una longitud de onda de 595 nm y se interpolaron los resultados de la lectura de las muestras en la curva patrón.

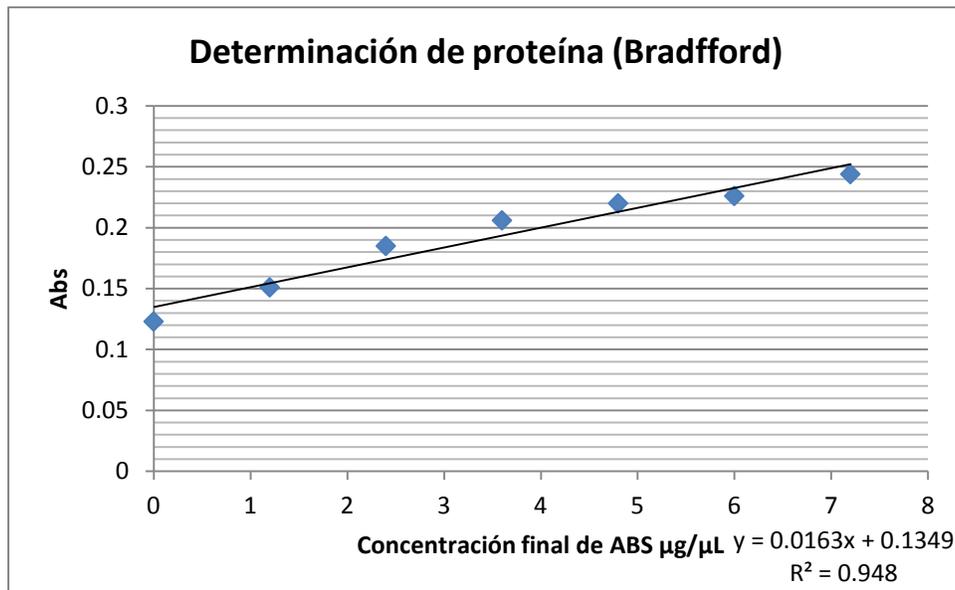


Figura 1. Curva patrón