



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ALTERACIÓN EN GRADO FACULTATIVO DEL SISTEMA DE TRANSPORTE  
ABC DE LA ACTINOBACTERIA B-686 POR LA INTERACCIÓN DE CIERTOS  
COMPUESTOS AROMÁTICOS EN UN ESTUDIO A NIVEL MATRAZ**

**TESIS**

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

**PRESENTA**

**Mónica Hernández Ruiz**

**DIRECTOR DE TESIS**

**E. en B. Marco Antonio Ortiz Jiménez**



**Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2019**



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:**                   **Profesor: Ortiz Jiménez Marco Antonio**

**VOCAL:**                           **Profesor: Dominguez Valdez Verónica**

**SECRETARIO:**               **Profesor: Araiza Santibañez Javier**

**1er. SUPLENTE:**           **Profesor: Gutierrez Luna Francisca Morayna**

**2º SUPLENTE:**             **Profesor: Gonzalez Reyes Karla Montserrat**

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Laboratorio C-036 Instituto de Investigaciones Biomédicas, Sede Tercer  
Circuito Exterior

Asesor del tema:

Marco Antonio Ortiz Jiménez

---

Sustentante:

Mónica Hernández Ruiz

---

## **UNO ES TODO, TODO ES UNO**

**Alphonse:** ¿Encontraste la respuesta de “Uno es todo, todo es uno”? He estado pensando en ello todo este tiempo pero entiendo muy poco.

**Edward:** No estoy muy seguro, pero, ¿Recuerdas cuando comí hormigas ese día en que teníamos demasiada hambre?

**Alphonse:** ¿Realmente hiciste eso?

**Edward:** Si, lo hice, estaban muy ácidas. Y entonces me puse a pensar; si no hubiese comido nada y estuviésemos muertos, habríamos sido devorados por zorros y hormigas. Finalmente hubiéramos fertilizado la tierra y el pasto, que es lo que comen los conejos.

**Alphonse:** Te refieres a la cadena alimenticia ¿Cierto?

**Edward:** Pero eso no es todo. Incluso esta isla pudo haber estado bajo el agua en la antigüedad, y quizás dentro de miles de años podría transformarse en la cumbre de una montaña.

**Alphonse:** ¿Todo está conectado?

**Edward:** Todo se encuentra dentro de una gran corriente que no puede ser vista. No sé si puede ser llamada universo o mundo, pero, desde el punto de vista de algo tan inmenso, nosotros somos como hormigas diminutas. Unos pequeños individuos dentro de una enorme corriente. No somos más que “uno” dentro del “todo”. Pero, solo cuando esos “uno” se reúnen, el “todo” puede existir. Este mundo fluye cumpliendo con leyes de dimensiones inimaginables. Es posible conocer dichas leyes, analizarlas y reconstruirlas

**Alphonse:** De eso se trata la alquimia.

**Edward:** Y además, de eso se trata la vida.

# Índice

<b>I.</b>	<b>Índice</b>	<b>3</b>
<b>II.</b>	<b>Resumen</b>	<b>6</b>
<b>III.</b>	<b>Introducción</b>	<b>7</b>
<b>IV.</b>	<b>Antecedentes</b>	<b>8</b>
1.	Hongos	8
1.1	Tipos de antifúngicos	11
1.2	Clasificación general de los antifúngicos	11
1.3	Mecanismos de acción de los antifúngicos	12
2.	Resistencia a los antibióticos	13
3.	Actinobacterias	15
4.	Metabolismo secundario	16
4.1	Secreción de antibióticos por microorganismos productores	17
5.	Transportadores ABC en actinobacterias.	18
5.1	Tipos de transportadores ABC	20
5.2	Ejemplos de familias de transportadores tipo ABC involucradas en la excreción de antibióticos	21
5.3	Influencia de los compuestos aromáticos tóxicos en los sistemas de transporte	22
6.	Compuestos aromáticos utilizados en los experimentos	24
6.1	Bromuro de etidio	24
6.2	Benzoato de sodio	25
6.3	Ácido 2,4-Dinitrobenzoico	25
6.4	Fenol	26
<b>V.</b>	<b>Justificación</b>	<b>26</b>
<b>VI.</b>	<b>Hipótesis</b>	<b>28</b>
<b>VII.</b>	<b>Objetivos</b>	<b>28</b>
	Objetivo general	28
	Objetivos particulares	28
<b>VIII.</b>	<b>Materiales y métodos</b>	<b>29</b>
	Diseño experimental	29

Cepas bacterianas	29
Fermentación	30
Cinética de pH	32
Cinética de consumo de carbohidratos	32
Medición de biomasa total	33
Cinética de biomasa	33
Antibiosis	33
<b>IX. Resultados</b>	<b>34</b>
Cinética de pH	34
Cinética de consumo de carbohidratos.	35
Rendimiento de biomasa	37
Uso eficiente del sustrato	39
Cinética de biomasa	40
Pruebas de antibiosis	42
Análisis estadístico de las pruebas de antibiosis	46
Fermentación 150 mililitros	46
Prueba de valores atípicos: Medida de halo	46
ANOVA unidireccional: Medida de halo vs. Sustancia	47
Comparaciones múltiples de Dunnett con un control	49
Fermentación 75 mililitros	50
Prueba de valores atípicos: Medida de halo	50
ANOVA unidireccional: Medida de halo vs. Sustancia	51
Comparaciones múltiples de Dunnett con un control	53
<b>X. Discusión de resultados</b>	<b>55</b>
Cinética de pH	55
Cinética de consumo de carbohidratos	56
Rendimiento de biomasa	56
Uso eficiente del sustrato	57
Cinética de biomasa	57
Pruebas de antibiosis	58
<b>XI. Conclusiones</b>	<b>59</b>

<b>XII. Bibliografía</b>	<b>61</b>
<b>XIII. Anexos o apéndices</b>	<b>65</b>
1. Cepas utilizadas para las pruebas de antibiosis.	65
2. Curva de calibración para la cuantificación de carbohidratos.	67
3. Ecuaciones	68
4. Composición del medio de fermentación	69
5. Información sobre los análisis estadísticos	69
5.1 Análisis de Grubs.	69
5.2 Análisis de varianza	70
5.3 Prueba de Dunnett	70

# I. Resumen

La producción de antibióticos por medio de técnicas biotecnológicas se ha vuelto en los últimos años una alternativa para economizar los procesos industriales, sin embargo, existen una serie de factores que deben ser supervisados para que la obtención de los compuestos de interés sea eficiente. Uno de ellos, es la excreción de los metabolitos secundarios sintetizados por las bacterias productoras.

La expulsión de los antibióticos, en el caso de las actinobacterias, está mediada por diversas proteínas, sin embargo, existe un tipo de gran importancia llamado Transportadores ABC (ATP Binding Cassette). Estos acarrear a una gran cantidad de moléculas debido a la gran flexibilidad de sus sitios activos, además, se ha demostrado que los genes que los codifican aumentan su expresión cuando se someten a situaciones de estrés debido a moléculas tóxicas.

En el presente trabajo se llevó a cabo la exposición de la actinobacteria B-686 productora de antifúngicos ante compuestos aromáticos (Fenol, Bromuro de etidio, Ácido 2,4-Dinitrobenzoico y Benzoato de sodio) con el fin de conocer si la presencia de éstas sustancias hace posible la excreción de sus metabolitos secundarios.

Para esto se llevaron a cabo fermentaciones donde se adicionaron las sustancias, posteriormente se midieron las propiedades fisicoquímicas con respecto al tiempo, se midió la producción del compuesto de interés por medio de pruebas de antibiosis. Se llegó a la conclusión que los compuestos si influyen en la expulsión de los compuestos, por lo cual, es una alternativa para mejorar la producción.

## **II. Introducción**

En la actualidad una gran parte de los antibióticos que son utilizados en el tratamiento de infecciones por patógenos han disminuído su eficacia debido a que los microorganismos han desarrollado mecanismos de resistencia. Este fenómeno es cada vez más grave y, puesto que la mayoría de las investigaciones en materia de salud están enfocadas en el combate a las enfermedades crónicas, es necesario redoblar esfuerzos para encontrar antibióticos novedosos y métodos de síntesis más eficientes con el fin de que su producción industrial sea rentable.

La biotecnología como herramienta para lograr este objetivo es una gran alternativa, dado que los microorganismos son capaces de sintetizar muchas de las moléculas utilizadas en terapéutica de manera más económica, con buenos rendimientos y sin la obtención de moléculas indeseadas que son resultado de reacciones químicas secundarias durante los métodos de síntesis tradicionales. Esto ha dado como resultado la necesidad de conocer las variables que influyen en los microorganismos con el fin de obtener buenos resultados.

El presente trabajo se enfocó en la optimización de la producción de antibióticos antifúngicos por parte de la actinobacteria B-686, a la cual se sometió a estrés ambiental con cuatro compuestos aromáticos en distintas concentraciones; esto con el fin de conocer si la presencia de ellos en el medio de crecimiento donde se desarrollaron las actinobacterias tenía como resultado una mayor excreción de antibióticos ya que que una gran cantidad de células eucariotas y procariotas aumentan su expresión de los transportadores ATP-Binding Cassette cuando están expuestos a compuestos tóxicos.

Para ésto, se llevó a cabo la fermentación a nivel matraz de la actinobacteria B-686, a la cual se sometió a diferentes concentraciones de Bromuro de etidio, 2,4-Dinitrobenzoico, Benzoato de sodio y Fenol durante la parte final de la fase estacionaria de crecimiento. Posteriormente se eligió la concentración de cada una de las sustancias que demostró mejorar la producción por medio de pruebas de antibiosis y, de manera consiguiente se llevó a cabo la comparación de todos los compuestos con el fin de conocer cuál de ellos tiene mayor efecto en los microorganismos. Adicionalmente se identificaron las especies de hongos que muestran mayor susceptibilidad ante los compuestos excretados por las actinobacterias con el fin de seguir con investigaciones posteriores.

Por otro lado se llevó a cabo una fermentación en la que se cambió el volumen de fermentación con el fin de saber el impacto de una agitación más eficiente y compararlo con el sistema inicial.

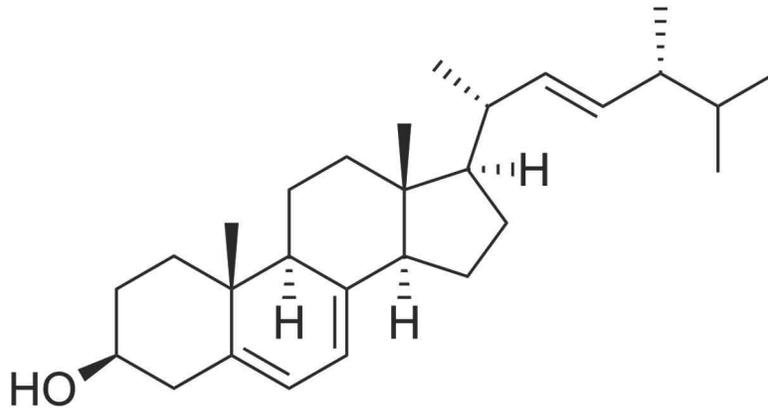
## **III. Antecedentes**

### **1. Hongos**

Los hongos son organismos aerobios, heterótrofos, no móviles que se reproducen por esporas. Se distinguen por tener dos tipos de células; las somáticas (las cuales llevan a cabo la mitosis y poseen núcleos pequeños) y las reproductoras (cuyos núcleos son de mayor tamaño y realizan la meiosis) También poseen mitocondrias y un sistema endomembranoso.

Este tipo de eucariontes poseen una pared celular constituida de microfibrillas de quitina, la cual, tiene como función la estabilización de la pared. Sin ella, la célula pierde su estabilidad osmótica y tiende a la

ruptura. También posee polímeros lineales de glucosa o (como la celulosa) glucanas, mananas y glucoproteínas. En cambio, la membrana se distingue por tener entre sus componentes varios tipos de esteroides; uno de los más importantes es el ergosterol, que, al igual que el colesterol en animales, regula la fluidez y la permeabilidad. En la figura 1 se muestra la estructura del ergosterol.



*Figura 1. Estructura química del ergosterol. Difiere del colesterol debido a que posee un grupo metilo en la posición 24 y dos dobles enlaces  $\Delta 7$  y  $\Delta 22$ . La mayoría de los antimicóticos actúan inhibiendo su síntesis. Ejemplos de antibióticos que actúan a este nivel es el ketoconazol y la terbinafina.*

La nutrición de los hongos se lleva a cabo por absorción y dependiendo el tipo de materia orgánica que utilizan se clasifican en dos grandes grupos:

- Saprófitos: Llevan a cabo su metabolismo con materia orgánica muerta o en descomposición
- Parásitos: Utilizan materia orgánica viva. Este tipo de hongos pueden ser facultativos u obligados.

Todos los hongos necesitan en general una fuente orgánica de carbono, nitrógeno, fósforo y azufre, además de cationes de potasio, calcio, magnesio y otros elementos en trazas. A pesar de que no pueden llevar a cabo la fotosíntesis, la luz es un elemento importante para la

esporulación. La mayoría de los hongos crecen a una temperatura entre 20 y 50°C. Para la regulación de pH donde se ajusta la expresión de genes que secretan enzimas y metabolitos bioactivos.

Las interacciones entre humanos y hongos es muy variada; puede ser directa o indirecta, benéfica o perjudicial. La micología médica se encarga del estudio de las patologías causadas por hongos y esta ciencia ha encontrado que existen alrededor de 400 especies de hongos que causan enfermedades. Aquellos desórdenes que son causados por la colonización de los microorganismos en el cuerpo humano son llamados micosis; en cambio, aquellas afecciones que tienen su origen en las micotoxinas que producen los hongos son llamados micotoxicosis. Además, algunos hongos pueden actuar como alergenicos.

Las micotoxicosis son causadas por metabolitos de bajo peso molecular producidos por hongos que pueden causar efectos patogénicos en el huésped; en este caso, el humano. La exposición se lleva a cabo generalmente por el consumo de alimentos los cuales no fueron tratados con las respectivas medidas de higiene en zonas donde los individuos tienen una nutrición deficiente y las regulaciones gubernamentales son incompetentes para controlar este problema de salud. Los hongos que producen más micotoxinas son las del género *Aspergillus*.

En cambio, las micosis son desórdenes causados por la infección de hongos oportunistas o patógenos y se pueden clasificar dependiendo en la zona donde se desarrollan en superficiales, subcutáneas y sistémicas. Los organismos que causan este tipo de enfermedades deben tener las siguientes características; la habilidad de crecer a 37°C, la capacidad de utilizar diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, que puedan eliminar elementos límite y que puedan adaptarse y sobrevivir a las condiciones

ambientales cuando no hay un hospedero disponible. Estas infecciones son cada vez más importantes debido a que poseen altos grados de morbilidad (Velázquez, 2009)

## **1.1 Tipos de antifúngicos**

Generalmente el tratamiento de las micosis se lleva a cabo con agentes quimioterapéuticos que tienen diferentes blancos moleculares:

- 1) La inhibición de la síntesis de la membrana plasmática o la disrupción de la integridad de la misma
- 2) Inhibición o disrupción de la biosíntesis de la pared celular
- 3) Inhibición del metabolismo e irrupción de la mitosis}

## **1.2 Clasificación general de los antifúngicos**

Los antifúngicos se pueden clasificar de acuerdo a su estructura química en siete grupos diferentes.

- Polienos
  - Sistémicos: Anfotericina
  - Tópicos: Nistatina y natamicina
- No polienos: Griseofulvina
- Azoles
  - Imidazoles: Miconazol
  - Triazoles: Ketoconazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol, posaconazol
  - Tópicos: Bifonazol, butoconazol, clotrimazol, econazol, fenticonazol, flutrimazol, omoconazol, oxiconazol, sulconazol, tioconazol, terconazol
- Pirimidinas fluoradas: flucitosina
- Equinocandinas: Caspofungina, micafungina, anidulafungina
- Alilaminas: terbinafina y naftifina

- Otros: Yoduro de potasio, ciclopirox, tolnaftato

### **1.3 Mecanismos de acción de los antifúngicos**

A continuación se enlistan los diferentes mecanismos de acción por los cuales actúan los tipos de antifúngicos mencionados con anterioridad.

- Anfotericina B: Se une al ergosterol de la membrana del hongo y su centro hidrófilo forma un conducto transmembrana que altera la permeabilidad y función de la barrera osmótica. Es selectivo porque no se une al colesterol ni a los esteroides de procarionotas. Debe atravesar la pared celular para poder actuar. La resistencia a la anfotericina está relacionada con la disminución de la cantidad de ergosterol en la membrana y al cambio en la estructura química del ergosterol.
- Nistatina: Antibiótico macrólido polieno tópico que actúa con un mecanismo de acción parecido a la anfotericina.
- Griseofulvina: Inhibe la mitosis actuando sobre los microtúbulos del huso mitótico
- Azoles: Se caracterizan por poseer un anillo imidazólico. Se pueden clasificar en imidazoles (contiene dos nitrógenos en el anillo) y triazoles (posee tres nitrógenos en su estructura). Actúan inhibiendo la enzima 14 $\alpha$ -desmetilasa cuando se forma un complejo del azol con el citocromo P-450 del hongo. El bloqueo impide la conversión a partir del lanosterol a ergosterol.
- Pirimidinas fluoradas, flucitosina: Impide la síntesis del DNA del hongo debido a que es el análogo fluorado de un constituyente del cuerpo normal de la citosina. La flucitosina se convierte por medio de una desaminación en el 5-fluorouracilo, un inhibidor no competitivo de la timidilato-sintetasa que es importante en la duplicación del material genético.

- Equinocandinas: Son compuestos lipopéptidos cíclicos semisintéticos con una cadena lateral N-acil o N-aril alifática. Actúan inhibiendo la producción del 1,3 $\beta$ -D-glucano, el cual es un componente clave de la pared celular. Esto provoca un desequilibrio osmótico que no permite el desarrollo de las células.
- Alilaminas, terbinafina: Inhibe la síntesis del ergosterol por la inhibición de la enzima escualeno epoxidasa
- Yoduro potásico: Uso válido solo para la esporotricosis cutánea
- Ciclopirox, naftifina y tolnaftato: antibióticos de uso tópico útil en dermatofitosis y la pitiriasis versicolor.

## **2. Resistencia a los antibióticos**

Desde el descubrimiento de la penicilina las infecciones han logrado ser controladas por el uso de antibióticos, sin embargo, el uso indiscriminado de los antimicrobianos que se ha llevado a cabo en las últimas décadas ha causado un fenómeno denominado como "Resistencia microbiana" la cual se define como la capacidad que tienen los microorganismos para desarrollar sistemas que resten eficacia o hacen inútil a un antibiótico. (Torres, 2001). Hay diferentes tipos de mecanismos por lo cuales se logra la resistencia; algunos de ellos son la producción de enzimas que destruyen los fármacos, defectos en las porinas que evitan la entrada del medicamento a la célula, alteraciones en la estructura de la pared celular, cambios en el RNA ribosomal y la síntesis de bombas de expulsión. (Coates, 2012). La resistencia antimicrobiana es causada generalmente por mutaciones cromosomales o intercambio de material genético mediante la transducción, transformación o conjugación así como la transposición.

Este problema se ha intensificado debido a los siguientes factores:

1. La prescripción irracional de antibióticos

2. La adquisición de enfermedades hospitalarias donde las bacterias desarrollan diversos mecanismos de resistencia debido a las dificultades para llevar a cabo las precauciones de aislamiento recomendadas
3. El uso de antibióticos en agricultura y acuicultura para promover el crecimiento de los animales de granja y peces.
4. Factores ambientales como la producción natural de antibióticos, la presencia de bacterias resistentes en el agua debido a las prácticas agrícolas,
5. Uso de desinfectantes en los hogares que, al tener estructuras parecidas a los antibióticos, pueden ocasionar la formación de cepas resistentes. (Kapil, 2004)

A pesar de que el problema fue reconocido por Alexander Fleming y Howard Walter Florey cuando recibieron el premio nobel por el descubrimiento de la penicilina en 1945, es hasta la actualidad que diversas organizaciones como la Organización Mundial de la Salud y el Foro Económico Mundial han convertido la resistencia de antibióticos como objeto de análisis en conferencias, informes y acciones que visibilizan cada vez más el fenómeno. (Nathan, 2004). En el 2015, alrededor de 700,000 personas morían como consecuencia de una infección por microorganismos resistentes y se espera que en el 2050 esta cifra alcance los 10,000,000 por lo cual la problemática debe ser atendida inmediatamente.

Una de las soluciones para este conflicto es el descubrimiento de antibióticos novedosos que actúen por medio de mecanismos de acción distintos y que tengan como objetivo otros blancos moleculares, sin embargo, éste objetivo tiene dos grandes limitaciones; el desarrollo de nuevas moléculas es muy costoso (se requieren alrededor de 300 millones de dólares por cada agente terapéutico) y en la actualidad las

empresas farmacéuticas están enfocadas en la investigación de fármacos que actúan contra enfermedades crónicas.

Frente a este panorama, la biotecnología ofrece diversas alternativas que pueden ayudar al descubrimiento de antimicrobianos, además, a diferencia de la industria farmacéutica, las empresas biotecnológicas tienen mayor enlace con las instituciones académicas y cada investigación tiene un menor costo (para el descubrimiento de una sola molécula se requieren 115 millones de dólares). (Hancock, 1997).

### **3. Actinobacterias**

Para el descubrimiento de nuevos antibióticos por medio de técnicas biotecnológicas, se ha tomado como materia de estudio a las actinobacterias, ya que éstas son capaces de producir una gran variedad de metabolitos secundarios. Estos se definen como procariotas aerobias que forman estructuras filamentosas que no se fragmentan y producen esporas asexuales (conidios o conidiosporas). Su pared celular posee derivados de ácido murámico, lo cual las hace gram positivas. La mayoría de las actinobacterias posee micelio aéreo, no son móviles en medio semilíquido y presenta resistencia a la desecación.

Aunque hay diversos tipos de actinobacterias, éste trabajo se enfoca en el suborden *Streptomycineae* que posee solo una familia; *Streptomycetaceae*. A su vez, esta familia se divide en tres géneros, de los cuales, el más importante es *Streptomyces*. Todos tienen una pared tipo I, la cual se caracteriza por tener el isómero de ácido diaminopimérico L, tienen glicina en el puente interpeptídico y además, son aerobios estrictos. Este género tiene alrededor de 500 especies y su diferenciación se lleva a cabo por la comparación de sus características morfológicas y fisiológicas.

El hábitat natural de los estreptomicetos es el suelo, constituyen alrededor del 1 al 20% de los microorganismos cultivables. Son importantes en el medio ambiente debido a que llevan a cabo la mineralización y pueden degradar compuestos como la pectina, lignina, quitina, queratina, el látex y algunos compuestos aromáticos. En la industria farmacéutica tienen una gran trascendencia debido a que producen la mayoría de los antibióticos conocidos; algunos ejemplos de estos son la anfotericina B, el cloranfenicol, la eritromicina, la neomicina, la nistatina, entre otros. (Prescott, 2004). Estas moléculas son producto del metabolismo secundario de la bacteria.

#### **4. Metabolismo secundario**

El metabolismo se define como el conjunto de reacciones enzimáticas que tienen como objetivo la obtención de la energía química a partir de los nutrientes, la transformación de las moléculas en unidades constitutivas, similares o precursoras de las macromoléculas necesarias para el desarrollo de la vida y la síntesis o degradación de biomoléculas que tienen funciones especializadas. (Teijón, 2006). Las sustancias que se producen en las reacciones químicas se denominan metabolitos y se clasifican en dos tipos, los primarios, que son aquellos necesarios para el crecimiento de los microorganismos y se produce en la fase exponencial del desarrollo, y los secundarios, cuya utilidad radica en otorgar a la célula ventajas para sobrevivir y su obtención es factible en la fase estacionaria.

De forma natural, los microorganismos sólo producen los compuestos necesarios para su desarrollo, sin embargo, es posible alterar las condiciones que influyen en la producción de un metabolito específico

para mejorar su producción. En ésta premisa se basó el estudio llevado a cabo en la presente tesis.

## 4.1 Secreción de antibióticos por microorganismos productores

Los microorganismos productores de antibióticos, como las actinobacterias, han desarrollado diversos mecanismos para evitar ser afectados por sus propios metabolitos secundarios. En algunos casos, como sucede con los antibióticos xenobióticos, estos procesos no son necesarios debido a que el organismo productor no posee el blanco molecular que ataca el antibiótico, sin embargo, la mayoría de los agentes terapéuticos son autotóxicos y es necesario que el microorganismo desarrolle un mecanismo de resistencia eficiente para sobrevivir; algunos ejemplos sobre éste tipo de fenómenos se encuentran en la Tabla 1, donde se describen algunos antibióticos que son expulsados por transportadores tipo ABC.(Méndez, 2000).

ABC transporters in antibiotic-producing actinomycetes

Drug synthesized	Producer organism*	Genes	ATP-binding domains	Membrane component
Type I				
Oleandomycin	<i>S. antibioticus</i>	<i>oleC oleC5</i>	one	present**
Tetronasin	<i>S. longisporoflavus</i>	<i>tnrB2 tnrB3</i>	one	present**
Daunorubicin	<i>S. peucetius</i>	<i>drvA drvB</i>	one	present**
Mithramycin	<i>S. argillaceus</i>	<i>mtrA mtrB</i>	one	present**
Type II				
Carbomycin	<i>S. thermotolerans</i>	<i>carA</i>	two	absent
Spiramycin	<i>S. ambofaciens</i>	<i>srmB</i>	two	absent
Tylosin	<i>S. fradiae</i>	<i>tlrC</i>	two	absent
Oleandomycin	<i>S. antibioticus</i>	<i>oleB</i>	two	absent
A201A	<i>S. capreolus</i>	<i>ardI</i>	two	absent
Lincomycin	<i>S. lincolnensis</i>	<i>lmrC</i>	two	absent
Type III				
Streptomycin	<i>S. glaucescens</i>	<i>strV strW</i>	one	present***
Bleomycin	<i>Stv. verticillium</i>	<i>ble-orf7</i>	one	present***

\*S.: *Streptomyces*; Stv.: *Streptoverticillum*.

\*\*The hydrophilic and hydrophobic components are encoded by two different genes.

\*\*\*A gene encodes both the hydrophilic and hydrophobic components of the transporter.

Tabla 1. Ejemplos de antibióticos producidos por microorganismos en cuya excreción están involucrados transportadores tipo ABC. (Méndez, 1998)

Los mecanismos de resistencia desarrollados por los microorganismos productores más frecuentes son las modificaciones en los blancos moleculares, la presencia de enzimas inactivadoras que ayudan a metabolizar los compuestos tóxicos y los cambios en la permeabilidad celular que pueden ser diferentes tipos; la rigidificación de la membrana celular por la alteración de la composición fosfolipídica, alteraciones en la membrana, formación de vesículas y la expulsión de los compuestos por medio de transportadores dependientes de energía. (Ramos, 2002)

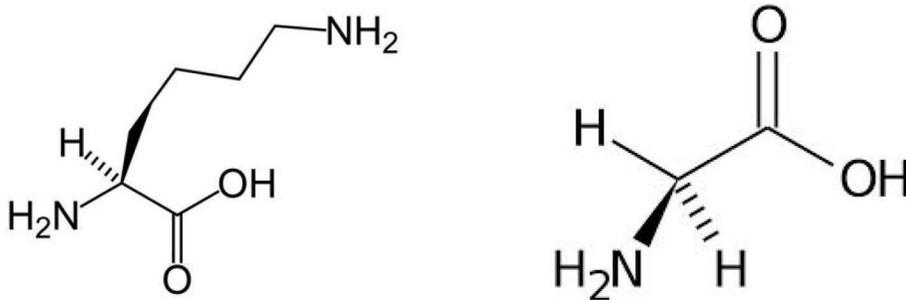
Para entender los cambios en la permeabilidad celular es necesario conocer los sistemas que son utilizados para el transporte de moléculas. Estos se diferencian por el tipo de energía que utilizan para llevar a cabo el acarreo. Por un lado están las proteínas que aprovechan el gradiente electroquímico transmembrana dependiente de protones, mientras que el otro mecanismo consiste en el sistema ABC (ATP Binding cassette) que llevan a cabo el transporte de los metabolitos secundarios utilizando la energía liberada durante la hidrólisis de una molécula de ATP.

## **5. Transportadores ABC en actinobacterias.**

Los transportadores ABC son una gran familia de proteínas útiles para acarrear moléculas de casi cualquier naturaleza química a través de la membrana celular. Se caracterizan por poseer dos dominios citoplásmicos hidrofílicos (conocidos como NBFs por sus siglas en inglés Nucleotide-Binding Folds) y dos dominios integrales transmembrana hidrofóbicos (TMDs por sus siglas en inglés Transmembrane Domain). Los primeros se encuentran extendidos en el citoplasma y son el sitio donde se lleva a cabo la unión e hidrólisis del ATP. Esta subunidad se

distingue debido a que posee una región de 200 subunidades que constituyen los motivos Walker A y B.

El motivo Walker A es una región rica en glicina que posee el siguiente patrón GXXGXGK(S,T) (donde X significa cualquier aminoácido). El residuo lisina es posiblemente el responsable de la interacción con el grupo fosfato presente en el nucleótido.



*Figura 2. Aminoácidos lisina (A) y glicina (B). Ambos están presentes en el motivo Walker A. La lisina es la responsable de la interacción con el grupo fosfato debido a la presencia de la amina primaria.*

En cambio, el motivo Walker B es una región hidrofóbica que posee algunos aminoácidos cargados y el patrón que posee es el siguiente; hhhhD(D,E,S)(P,A) (donde h significa aminoácidos de carácter hidrofóbico). En este motivo el ácido aspártico es el posible responsable de la interacción con magnesio. Entre ambos motivos hay una región conservada que posee el siguiente patrón: SX(G,C) y es útil para mantener juntos los motivos Walker A y B durante los cambios conformacionales (Méndez, 1998)

El modelo general para explicar cómo funcionan este tipo de proteínas consiste en la hidrólisis del ATP en la subunidad hidrofílica para formar ADP + Pi. Con la liberación de la energía de ésta reacción exérgica, cambia la conformación del transportador formando una separación de los dominios en la parte exterior de la célula y la aproximación de los sitios de unión al nucleótido que se encuentran en el interior, lo cual

permite la expulsión de las moléculas a transportar por la formación de un canal. Posteriormente, la orientación del transportador cambia a su estado inicial. (Wright, 2018).

## **5.1 Tipos de transportadores ABC**

Se han descrito tres tipos de transportadores ABC en microorganismos productores de antibióticos denominados I, II y III, los cuales se diferencian por el número y la organización de los dominios de unión a nucleótidos y la composición del sistema de transporte. A continuación se presentarán las principales características de cada uno de ellos.

Transportador tipo I: está formado por dos o tres proteínas codificadas por dos o tres genes independientes. Una de las proteínas es la responsable de la unión con el ATP y tiene un solo dominio de unión a nucleótidos, mientras que las demás, que son de naturaleza hidrofóbica, poseen seis dominios transmembrana. Han sido reportados en microorganismos productores de diversos agentes antitumorales, poliéteres ionóforos, inhibidores de síntesis de proteínas y compuestos inmunosupresores.

Transportador tipo II: Están constituidos por una proteína hidrofílica que posee dos dominios de unión a nucleótidos codificados por un solo gen. No se ha identificado un gen que codifique algún dominio de membrana. En éstos transportadores los dominios con extremo N-terminal se agrupan por separado de los dominios con el extremo C-terminal. Está presente en una gran cantidad de microorganismos productores de compuestos inhibidores de la síntesis de proteínas. Se ha reportado que son especialmente útiles para el transporte de macrólidos.

Transportadores tipo III: Se caracterizan por una o dos proteínas que contienen los componentes hidrófilos e hidrófobos en un polipéptido codificado por un solo gen, poseen dos dominios de unión a nucleótidos. Es el grupo más reciente, sin embargo, no se ha establecido con claridad que su presencia sea útil para la expulsión de metabolitos secundarios. (Méndez, 2000)

## **5.2 Ejemplos de familias de transportadores tipo ABC involucradas en la excreción de antibióticos**

La superfamilia de transportadores ABC está constituida por 22 familias de permeasas de captación, 21 familias de proteínas exportadoras que se encuentran exclusivamente en organismos procariontes y 11 familias de sistemas de salida para eucariontes. El estudio llevado a cabo en el trabajo presentado se enfoca en estos transportadores debido a que cinco familias presentes en bacterias son activas en la exportación de agentes terapéuticos. (Saier, 2001)

Estas familias son las enumeradas a continuación

- Drug exporter-1 (DrugE1): Presente en bacterias Gram positivas con alto CCG; por ejemplo, diversas especies del género *Streptomyces*
- Drug exporter-2 (DrugE2): Presente en bacterias Gram positivas con bajo nivel de CCG; por ejemplo, los géneros *Lactococcus* y *Lactobacillus*.
- Drug exporter-3 (DrugE3): Igual que en la familia DrugE1, está presente en bacterias del género *Streptomyces*, *Corynebacterium* y *Mycobacterium*. Algunos de estos transportadores también pueden exportar sideróforos.
- Drug-resistant ATPase-1 (DrugRA1): ATPasa homóloga útil en el transporte de agentes terapéuticos en *Streptomyces*

- Drug-resistant ATPase-2 (DrugRA2) ATPasa homóloga presente en *Staphylococcus* (Saier, 2001)

### **5.3 Influencia de los compuestos aromáticos tóxicos en los sistemas de transporte**

Debido a la gran cantidad de contaminantes y compuestos capaces de dañar a las células que existen en el medio ambiente, cada especie de microorganismos ha desarrollado mecanismos de resistencia para lograr la supervivencia. En algunas bacterias como *Mycoplasma hominis* ya se han reportado que los transportadores ABC son capaces de lograr la expulsión no sólo de antibióticos: también son útiles para exportar antisépticos y tintes catiónicos como el bromuro de etidio (Raheison, 2002).

Esto se debe a que una gran parte de los transportadores multidrogas poseen una cavidad de gran tamaño, hidrofóbica y flexible donde los diferentes compuestos interactúan debido a puentes de hidrógeno o interacciones electrostáticas, por lo cual, la presencia de residuos aromáticos y los cargados son cruciales para la especificidad del transportador. Además, un análisis genómico de 100 organismos llegó a la conclusión de que los microorganismos asociados con el suelo son los que poseen mayor cantidad de transportadores de éste tipo, por ejemplo, especies de *Pseudomonas* spp., *Streptomyces* spp., *Sinorhizobium* spp., *Mesorhizobium* spp., *Agrobacterium* spp. y *Bacillus* spp, de tal forma que es posible que estos transportadores estén relacionados con la secreción de metabolitos secundarios (Paulsen, 2003).

Además, se han documentado algunos estudios que indican que las células al estar expuestas a compuestos tóxicos aumentan la expresión de los genes relacionados con los transportadores ABC; por ejemplo, en el artículo "Gene Expression Profiling in Chemoresistant, Variants of Three Cell Lines of Different Origin" escrito por Aders Johnsson et al., los autores expusieron una serie de líneas celulares cancerosas ante cinco citotóxicos: daunorrubicina, doxorrubicina, vincristina, etopósido y mitoxantrona para observar los patrones de expresión genética, en este estudio lograron encontrar que hubo una expresión alterada estadísticamente significativa de las proteínas ABCB1, ABCG2, ABCB4, ABCC2, ABCC4, ABCC5 y ABCC6, las cuales, han estado vinculadas a la resistencia a agentes quimioterapéuticos. (Johnsson, 2005)

En el caso de microorganismos, en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se han identificado al menos cinco transportadores tipo ABC que al ser sobreexpresados demuestran farmacorresistencia múltiple o pleiotrópica, de los cuales, el caso del transportador Pdr5p es sumamente interesante puesto que está relacionado con la resistencia a cientos de compuestos químicamente no relacionados como antimicóticos clínicos, fungicidas agrícolas, antibióticos, micotoxinas, herbicidas y fármacos citotóxicos, mientras que su transportador Pdr12p tiene especificidad para el transporte de ácidos orgánicos C1-C7, por ejemplo, el ácido sórbico, benzoico y propiónico, los cuales utilizados como conservadores de alimentos. (Del Sorbo, 2000)

En el hongo *Candida albicans*, el cual es un patógeno oportunista del humano, se han estudiado ampliamente los transportadores tipo ABC debido a la resistencia a los antibióticos y se ha identificado que en los aislamientos en cepas resistentes al fluconazol la expresión del gen

CDR1. Este mismo transportador está involucrado en la resistencia a las alilaminas, morfolininas y otros fármacos. (Del Sorbo, 2000)

## 6. Compuestos aromáticos utilizados en los experimentos

### 6.1 Bromuro de etidio

El bromuro de etidio (Figura 3) es un compuesto aromático cuya fórmula es  $C_{21}H_{20}BrN_3$  que posee un peso molecular de 394.31 g/mol. Esta molécula contiene en su estructura la fenantridina cuya estructura consiste en un anillo heterocíclico nitrogenado planar que emite fluorescencia alrededor de los 605-620 nm. Presenta efectos carcinogénicos, citotóxicos, embriotóxicos, genotóxicos, mutagénicos, neurotóxicos y fototóxicos. Debido a su disposición espacial puede intercalarse entre las bases nitrogenadas del DNA (Patil, 2009) por lo cual es utilizado para la detección, cuantificación y amplificación de ácidos nucleicos. No se reportan usos industriales. (Sabins, 2010)

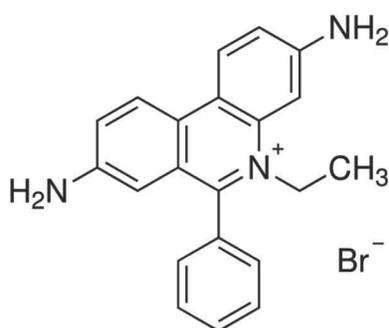


Figura 3. Estructura del bromuro de etidio

## 6.2 Benzoato de sodio

El benzoato de sodio (Figura 4) es una sal de ácido carboxílico aromático cuya fórmula es  $C_7H_6COONa$  y posee un peso molecular de 144.11 g/mol. Es un fungicida, antimicrobiano. Es utilizado como conservador utilizado en alimentos y productos farmacéuticos, nucleante de plásticos, agente saborizante, lubricante de tabletas farmacéuticas, antiséptico, entre otros usos. (Ash, 2004)

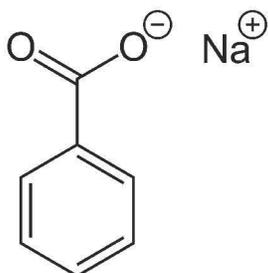


Figura 4. Benzoato de sodio

## 6.3 Ácido 2,4-Dinitrobenzoico

El ácido 2,4-Dinitrobenzoico (Figura 5) es un derivado del ácido carboxílico que contiene grupos nitro ( $-NO_2$ ) cuya fórmula es  $C_7H_4N_2O_6$  y su peso molecular es de 212.12 g/mol. Es utilizado para síntesis química. Tiene potencial mutagénico aunque en general no ha demostrado efectos tóxicos para la salud. (NIH, 2005)

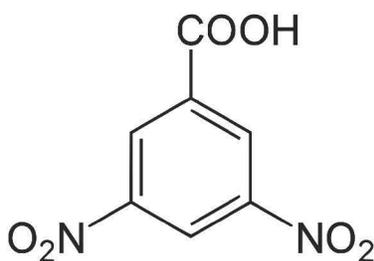


Figura 5. Ácido 2,4-Dinitrobenzoico

## 6.4 Fenol

El fenol (Figura 6) es un compuesto aromático cuya fórmula es  $C_6H_5OH$  y su peso molecular de 94.11 g/mol. Es utilizado como agente germicida, desinfectante, antiséptico y anestésico local. También es útil como intermediario en síntesis química. (NCBI, 2004)

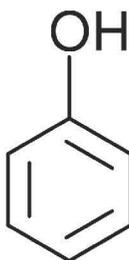


Figura 6. Fenol

## IV. Justificación

En los últimos años la industria de los antibióticos ha enfocado sus esfuerzos en el descubrimiento de sustancias novedosas capaces de contrarrestar los efectos de la resistencia microbiana que se ha desarrollado desde el hallazgo de los antibióticos, la cual es resultado del uso irracional de medicamentos, la utilización de desinfectantes, la administración en animales de granja, entre otras prácticas inadecuadas.

Asimismo, cada vez es más urgente la necesidad de optimizar la producción de estos medicamentos debido a que una gran variedad de moléculas que han sido propuestas como nuevos agentes terapéuticos en la actualidad son de origen natural y su síntesis por medio de las técnicas químicas tradicionales resultaría en una labor costosa y

sumamente complicada que no es rentable para las empresas farmacéuticas.

Es por esto que la biotecnología se ha convertido en una alternativa viable para llevar a cabo las producciones industriales, sin embargo, la manipulación de los microorganismos utilizados en cada proceso debe ser ampliamente estudiada para lograr obtener la mayor eficiencia.

El presente trabajo aborda esta problemática; Debido a que en presencia de ciertos compuestos tóxicos en el ambiente las células aumentan la expresión de los transportadores ABC para lograr la expulsión de los mismos, y puesto que estas mismas proteínas están involucradas en la excreción de metabolitos secundarios, se llevó a cabo la exposición de una especie silvestre de actinobacterias productoras de antibióticos ante compuestos aromáticos para conocer cuáles de ellos podrían estimular una secreción más óptima de los compuestos producidos.

Se sometió bajo estudio a la cepa B-686 que será incluida en el Catálogo de colección de cultivos microbianos del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Las sustancias utilizadas para llevar a cabo los experimentos son el bromuro de etidio, el benzoato de sodio, ácido 2, 4-dinitrobenzoico y el fenol, los cuales fueron seleccionados debido a que poseen en su estructura un componente aromático y que en la mayoría de las células pueden actuar como potenciales tóxicos.

## **V. Hipótesis**

La exposición a las bacterias productoras de antibióticos ante compuestos aromáticos tóxicos provocará una mayor expresión de los transportadores ATP-Binding Cassette, lo cual optimizará la excreción de los metabolitos secundarios de la bacteria, posibilitando o facilitando la obtención de los agentes activos.

## **VI. Objetivos**

### **Objetivo general**

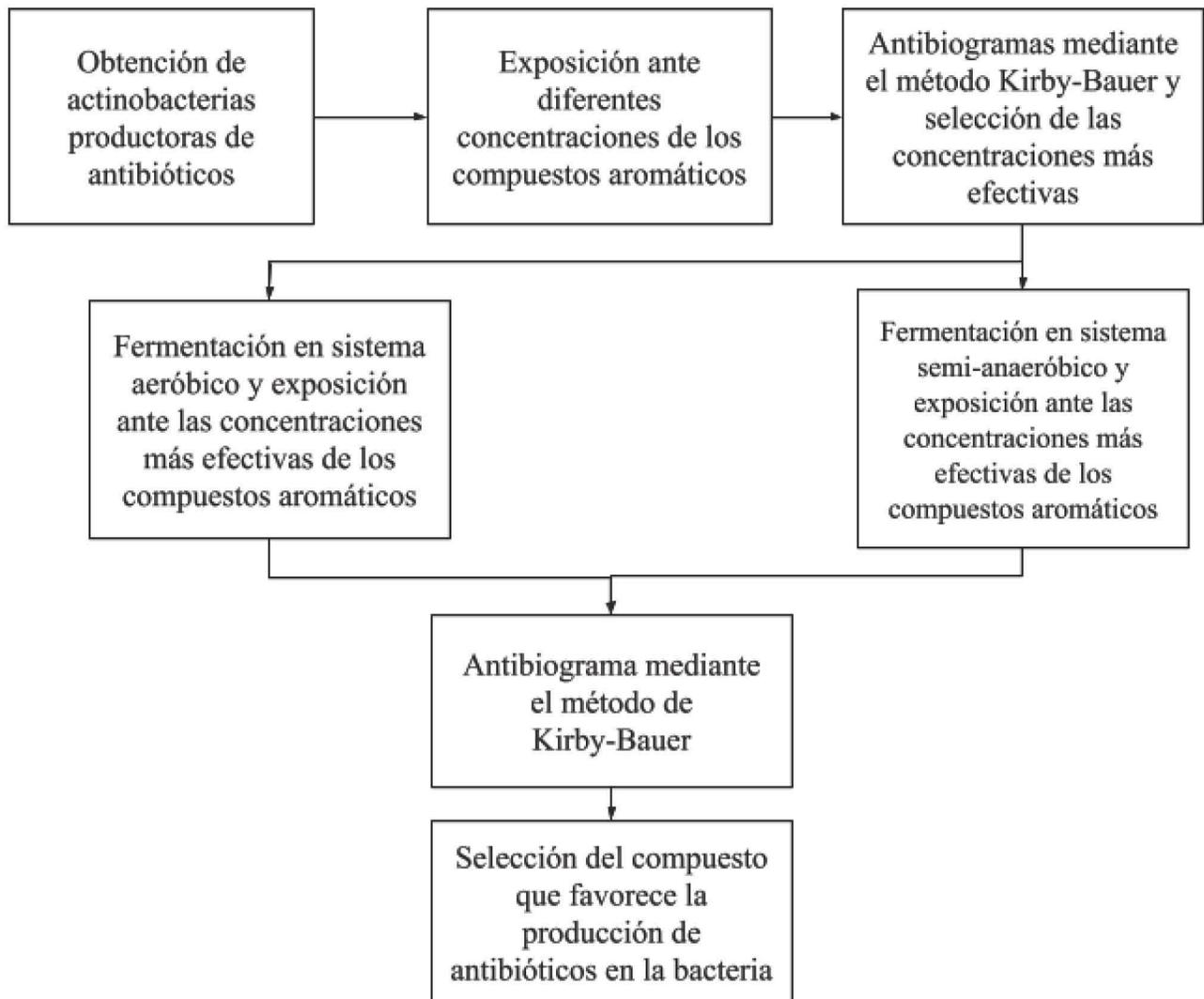
Determinar si la cepa B-686 es capaz de aumentar su capacidad de excreción de antibióticos por medio del transportador ATP-Binding Cassette al ser expuestas a cuatro compuestos aromáticos tóxicos

### **Objetivos particulares**

- Llevar a cabo un estudio de las variaciones fisicoquímicas durante la fermentación a la que es sometida la actinobacteria en análisis
- Conocer los factores que favorecen la producción de los metabolitos secundarios excretados durante una fermentación a nivel matraz.
- Comprender la influencia de la cantidad de oxígeno disponible durante la fermentación en la producción de metabolitos secundarios.
- Identificar los hongos que poseen mayor susceptibilidad a los metabolitos excretados por la actinobacteria.

# VII. Materiales y métodos

## Diseño experimental



## Cepas bacterianas

La cepa bacteriana fue aislada de un terreno agrícola del estado de Hidalgo que está en proceso de incorporación a la Colección Microbiana UNAM-48 del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM, la cual

proporcionó su registro. El microorganismo no se ha identificado en forma completa pero los análisis preliminares indican que se trata de una actinobacteria cuyos metabolitos han demostrado actividad antifúngica a través de diferentes experimentos realizados.

Su morfología consiste en bacilos gram positivos que no poseen la característica de ácido alcohol resistentes. Su micelio de sustrato posee filamentos no septados, mientras que su micelio aéreo está constituido de cadenas de conidias.

En medios sólidos crecen como colonias blancas, opacas, de forma irregular, bordes filamentosos, consistencia membranosa y elevación convexa. En el caso de los medios líquidos la opacidad del caldo durante el día ocho es densa y la masa celular se observa sedimentada al reposo. Las pruebas bioquímicas arrojaron que son catalasa positivos, arabinosa y galactosa negativos.

## **Fermentación**

La composición del medio de fermentación utilizado para el crecimiento de la cepa se encuentra en el anexo 4.

Las condiciones de desarrollo consistieron en 12 días de incubación a 29°C a un pH aproximado de 8.2 y agitación a 150 rpm, tomándose una muestra cada 24 horas para llevar a cabo diferentes determinaciones; Cinética de pH, cinética de consumo de azúcares reductores, medición de biomasa total, cinética de biomasa y antibiosis.

Consecuentemente se determinó el mejor día para llevar a cabo la adición de los compuestos a los medios de fermentación. Para esto se llevó a cabo la adición de 100 microlitros de bromuro de etidio a diferentes matraces del día 8 al 11 y se determinó que el día en que la

sustancia tuvo mejor efecto en la producción basado en los resultados de antibiosis fue el día 8 (Resultados no mostrados)

Posteriormente se llevaron a cabo adiciones de diferentes concentraciones de Bromuro de etidio, Benzoato de sodio, Ácido 2,4-Dinitrobenzoico y fenol a las fermentaciones el día ocho para determinar la concentración que mostraba optimizar la producción. Todos estos tratamientos fueron comparados con un control al cual no se le adicionó ningún tipo de compuesto, con el fin de conocer los efectos.

*Tabla 2. Cantidades de sustancias agregadas a cada fermentación.*

Sustancia	Cantidades agregadas a cada matraz				
Bromuro de etidio	20 µg	40µg	60µg	80µg	100µg
Benzoato de sodio	200µg/mL	400µg/mL	600µg/mL	800µg/mL	1000µg/mL
Ácido 2,4-Dinitrobenzoico	80µg	240µg	400µg	560µg	800µg
Fenol	50µL	200µL	400µL	600µL	800µL

Las cantidades elegidas de cada compuesto para llevar a cabo los experimentos posteriores se sometieron a una fermentación a nivel matraz en un volumen de 150 mL con el fin de comparar y conocer el compuesto que favorece la producción. En un experimento paralelo se llevó a cabo la producción de los antibióticos sin agregar ninguna sustancia y se llevó a cabo la separación del medio por medio de una cromatografía en columna. Por último se replicó el mismo experimento cambiando el volumen de medio a 75mL para observar la influencia de esta variable en el objetivo de la investigación.

## Cinética de pH

El pH se midió diariamente con un potenciómetro marca Beckman 00002342 calibrado con dos buffer, uno a pH 4 y otro a pH 7. Posteriormente con los resultados arrojados se construyó una gráfica de pH en función del tiempo y se llevaron a cabo las comparaciones de cada fermentación.

## Cinética de consumo de carbohidratos

La concentración de carbohidratos reductores de cada muestra se determinó con el método de DNS, la cual se basa en la reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (Figura 7). Posteriormente el complejo formado se cuantifica por medio de espectrofotometría a 540 nm. Por último, la concentración de azúcares se calculan por interpolación con una curva de calibración.

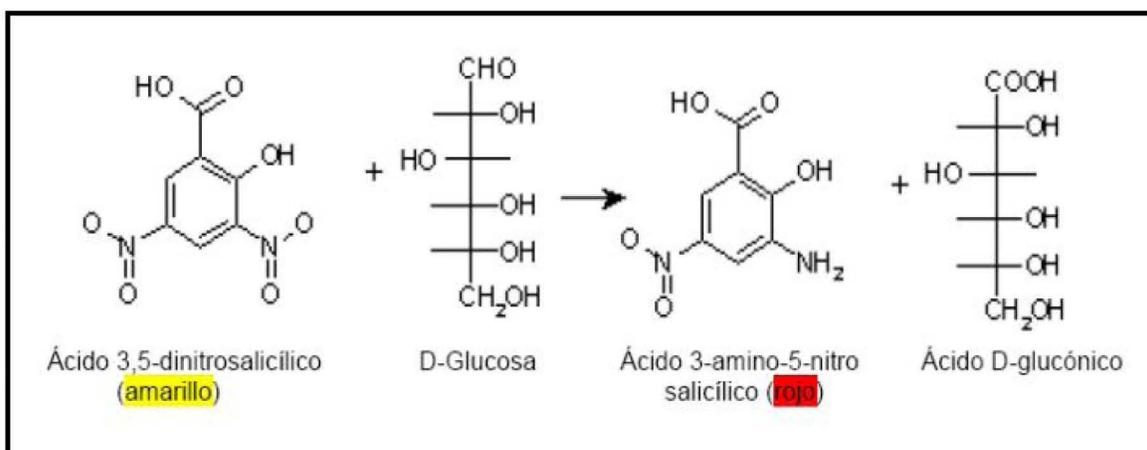


Figura 7. Mecanismo de reacción del método de cuantificación de carbohidratos reductores DNS. En ésta reacción, se lleva a cabo la reducción de uno de los grupos nitros de la molécula, la cual es llevada a cabo por el grupo carbonilo libre que contienen los carbohidratos. La

*cuantificación se lleva a cabo de manera indirecta por la medición del cambio de coloración de amarillo a rojo.*

## **Medición de biomasa total**

Para conocer la cantidad de biomasa, después de la fermentación el medio se filtró y el material sólido obtenido se colocó en una estufa durante tres días. Posteriormente se pesó con una balanza. El contenido se reportó en gramos por mililitro.

## **Cinética de biomasa**

Se llevó a cabo la filtración de un volumen conocido de cada muestra utilizando papel filtro y se colocó en una estufa durante tres días. Posteriormente se pesó con una balanza. El contenido se reportó en gramos por mililitro y se construyeron las cinéticas con los datos obtenidos.

## **Antibiosis**

En cajas de petri con medio PDA se inocularon diferentes hongos y posteriormente se colocaron sensidiscos embebidos con 20 microlitros de las secreciones extracelulares obtenidas al final de cada fermentación y se incubaron a 29°C durante 48 horas. Posteriormente se midieron los halos de inhibición.

# VIII. Resultados

## Cinética de pH

En este experimento, se midió el pH de cada muestra y se cuantificó el cambio que se observaba cada día; para ésto se llevaron a cabo las determinaciones y utilizó la ecuación 1 incluida en el anexo 3.

El pH inicial aproximadamente 8.2 en todas las fermentaciones. Posteriormente se graficó la diferencia de pH con respecto al tiempo.

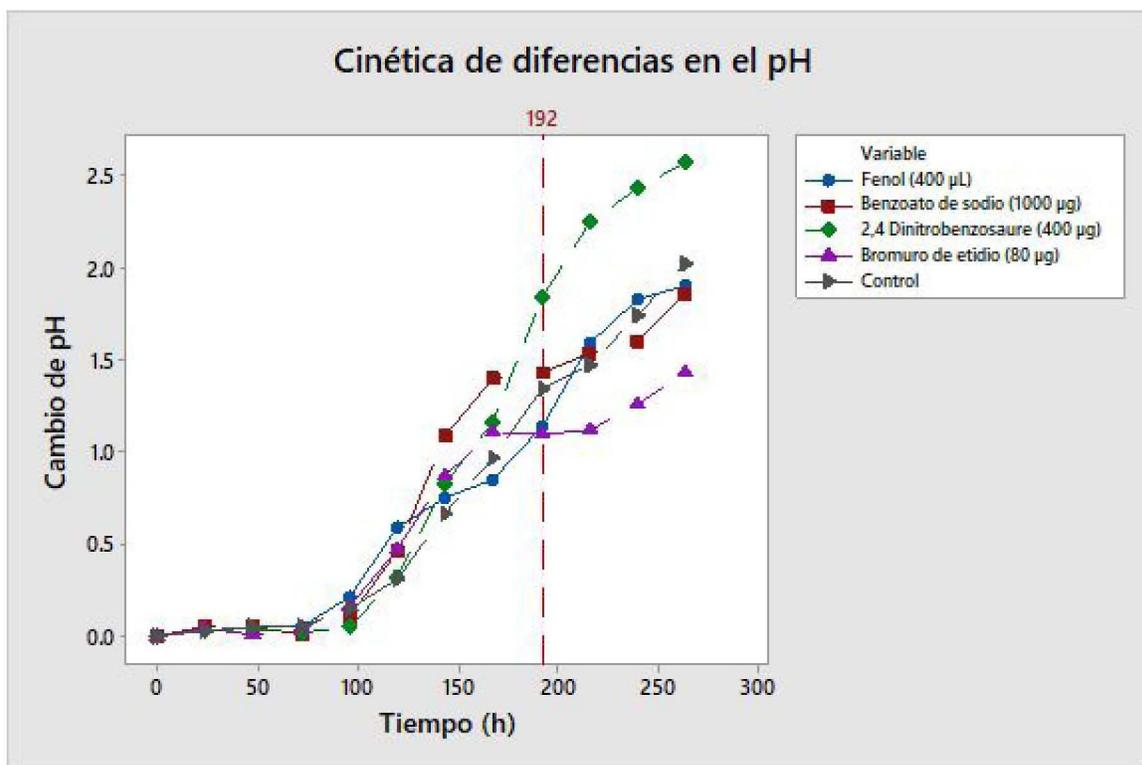


Gráfico 1. Cinética de pH en el sistema de 150 mililitros de volumen.

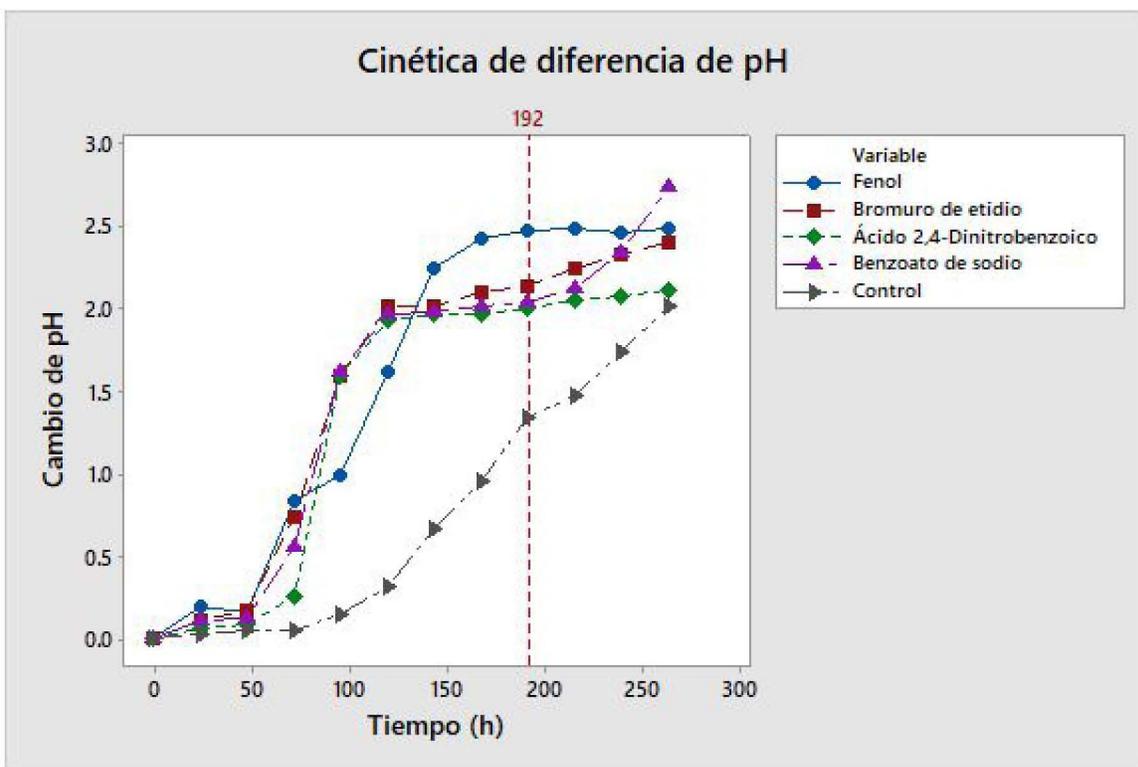


Gráfico 2. Cinética de pH en el sistema de 75 mililitros de volumen.

## Cinética de consumo de carbohidratos.

Para el cálculo de concentraciones de carbohidratos se llevó a cabo la preparación de una curva de calibración con diferentes concentraciones de glucosa (Tabla 11 del Anexo 2) a las cuales se les sometió a la reacción DNS y posteriormente se midió la absorbancia. La curva obtenida se muestra en el anexo 2 y la ecuación obtenida en el ajuste (2) se puede consultar en el anexo 3.

Debido a que durante los experimentos se miden las absorbancias se lleva a cabo el despeje de la concentración, finalmente la ecuación (3) incluida en el anexo 3 es la que se utiliza en los cálculos de las muestras problema.

Es importante considerar que debido a la alta concentración en la que se encuentra la glucosa en el medio de fermentación, se llevó a cabo la dilución de las muestras, por lo cual, durante los cálculos se tomó en cuenta que en cada experimento se utilizaron únicamente 100 microlitros, los cuales se llevaron a un volumen de 3 mililitros (1:30), esto para asegurar que la glucosa fuera cuantificable y que las mediciones realizadas fueran confiables. Después de llevar a cabo el cálculo de concentración de carbohidratos en cada muestra se efectuó el cálculo de la glucosa consumida con el fin de determinar la utilización de sustrato y con esto se construyó la cinética de consumo graficando la glucosa utilizada con respecto al tiempo.

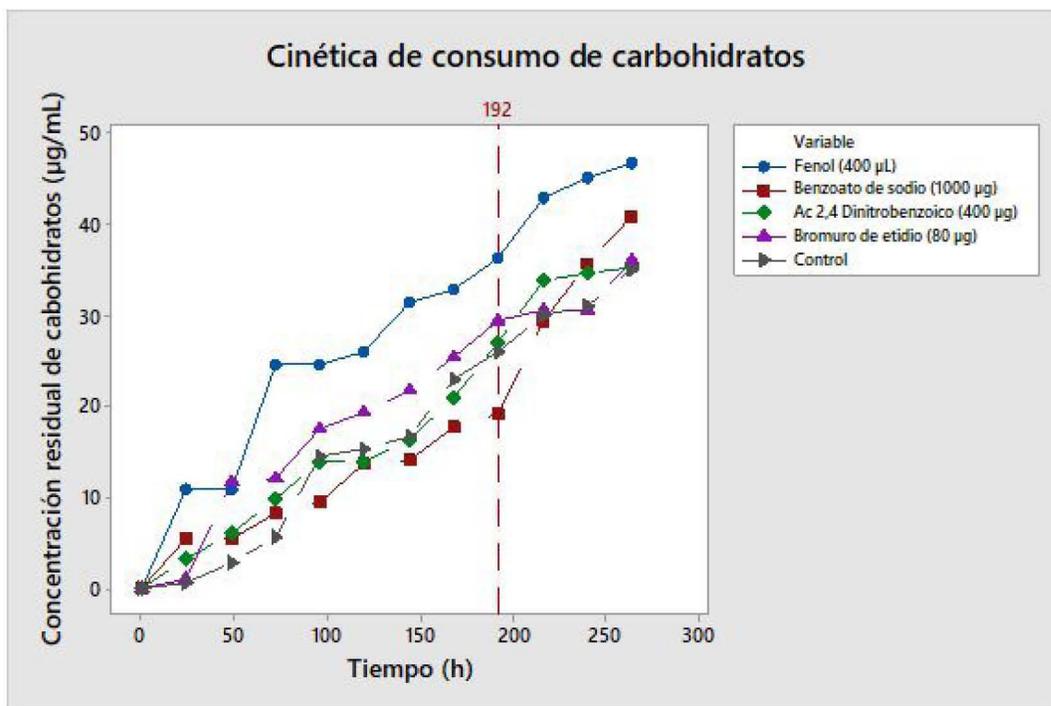


Gráfico 3. Cinética de consumo de carbohidratos en el sistema con 150 mililitros de volumen.

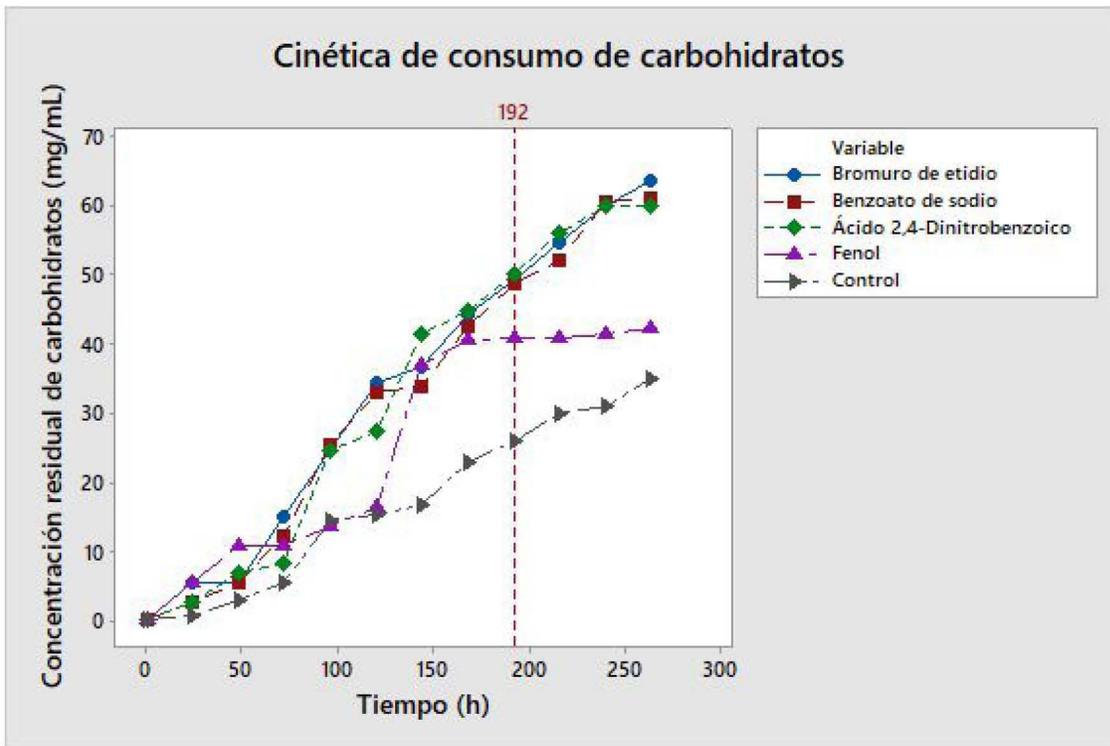


Gráfico 4. Cinética de consumo de carbohidratos en el sistema con 75 mililitros de volumen.

## Rendimiento de biomasa

En el caso de éste experimento, el objetivo es conocer de manera general el efecto que tiene cada compuesto en la producción de biomasa. Para su cálculo se utilizó la ecuación (4) del anexo 3 con el fin de conocer como la velocidad de crecimiento se ve afectada por la presencia de los compuestos aromáticos probados.

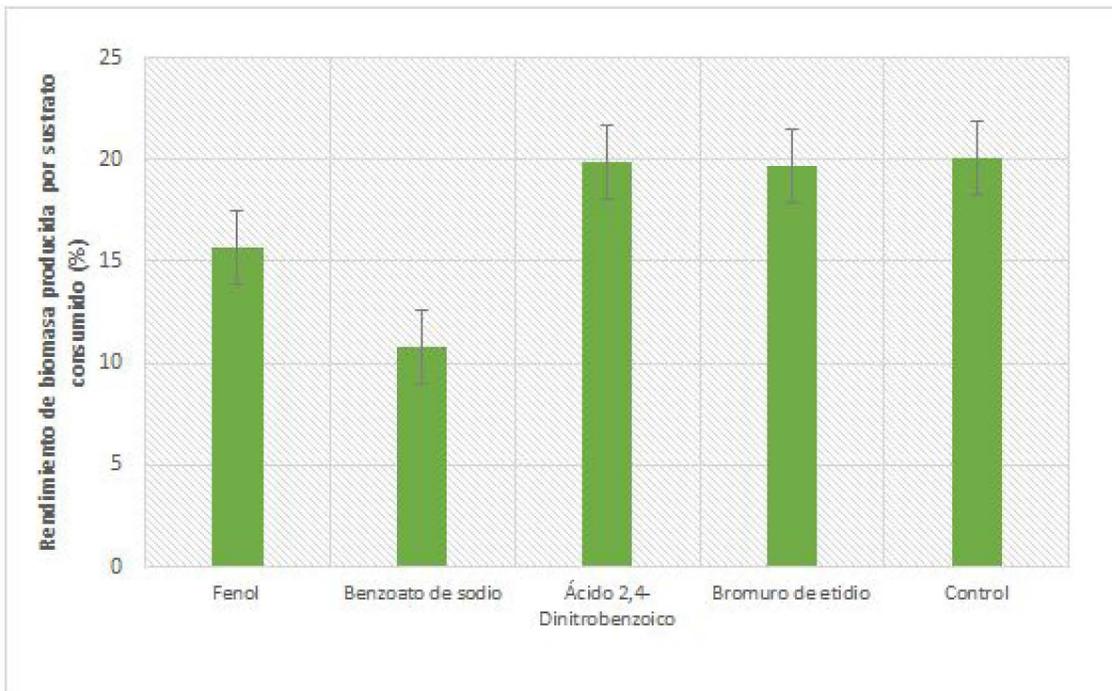


Gráfico 5. Rendimiento de biomasa producida por sustrato consumido en la fermentación de 150 mililitros

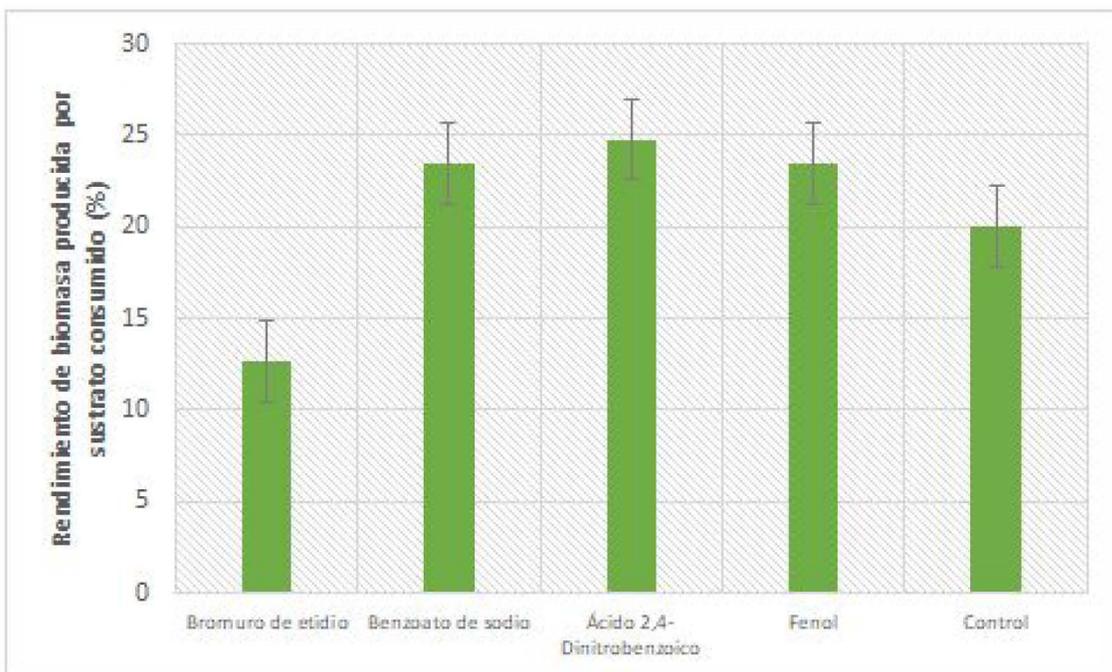


Gráfico 6. Rendimiento de biomasa producida por sustrato consumido en la fermentación de 75 mililitros

## Uso eficiente del sustrato

Para conocer cómo es que influye la presencia de cada sustancia en la utilización de la glucosa en cada fermentación se estimó el Uso eficiente del sustrato, el cual, se puede calcular con la ecuación (5) incluida en el anexo 3.

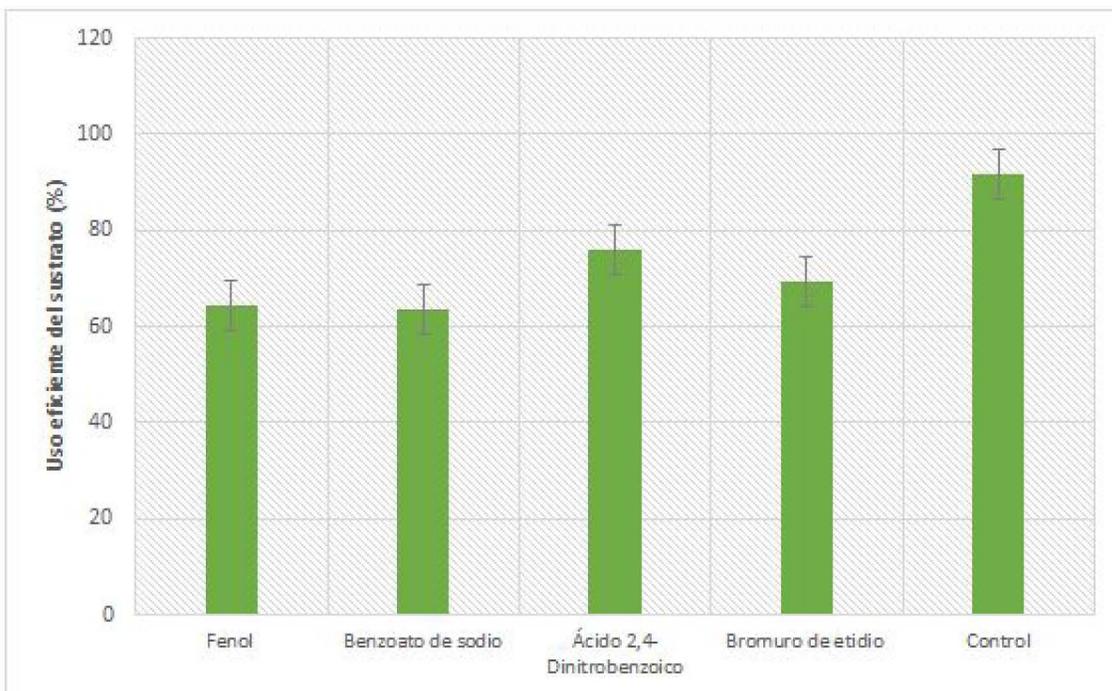


Gráfico 7. *Uso eficiente del sustrato de la fermentación cuyo volumen es de 150 mililitros.*

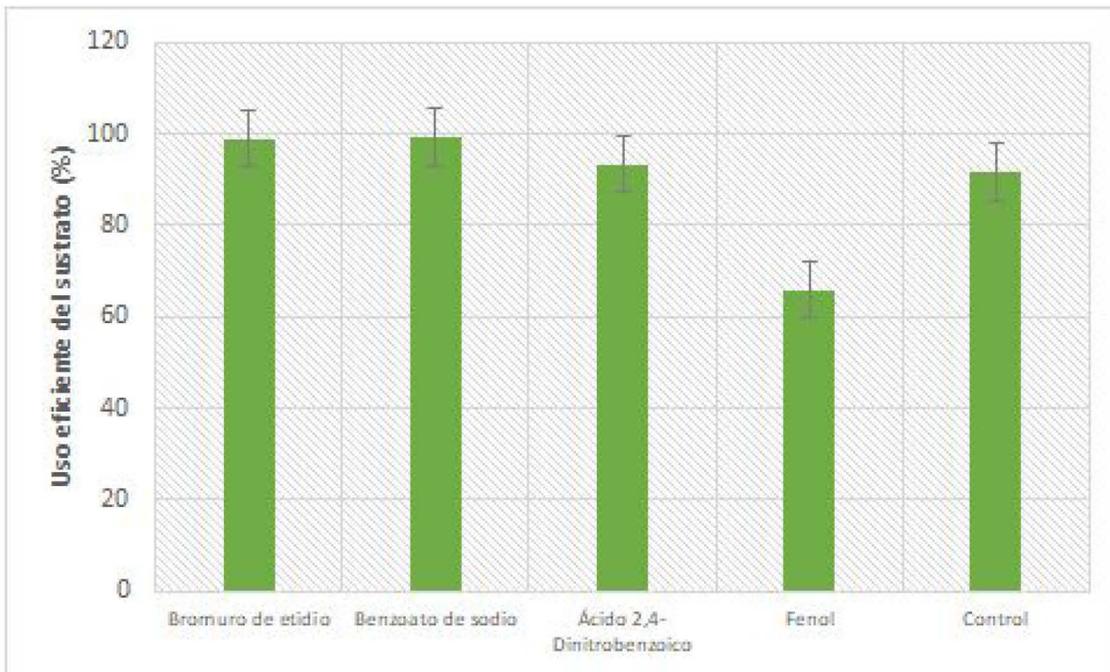


Gráfico 8. Uso eficiente del sustrato de la fermentación cuyo volumen es de 75 mL

## Cinética de biomasa

Para la construcción de las cinéticas de biomasa se realizó la filtración de 5mL de cada muestra en el caso de la fermentación de 150mL y 2mL de la fermentación cuyo volumen de fermentación es de 75 mL. Posteriormente el sedimento obtenido se secó en una estufa durante tres días, se pesó y se calculó la biomasa producida durante el experimento dividiendo entre el volumen con el fin de conocer la producción en unidades de miligramos por mililitro.

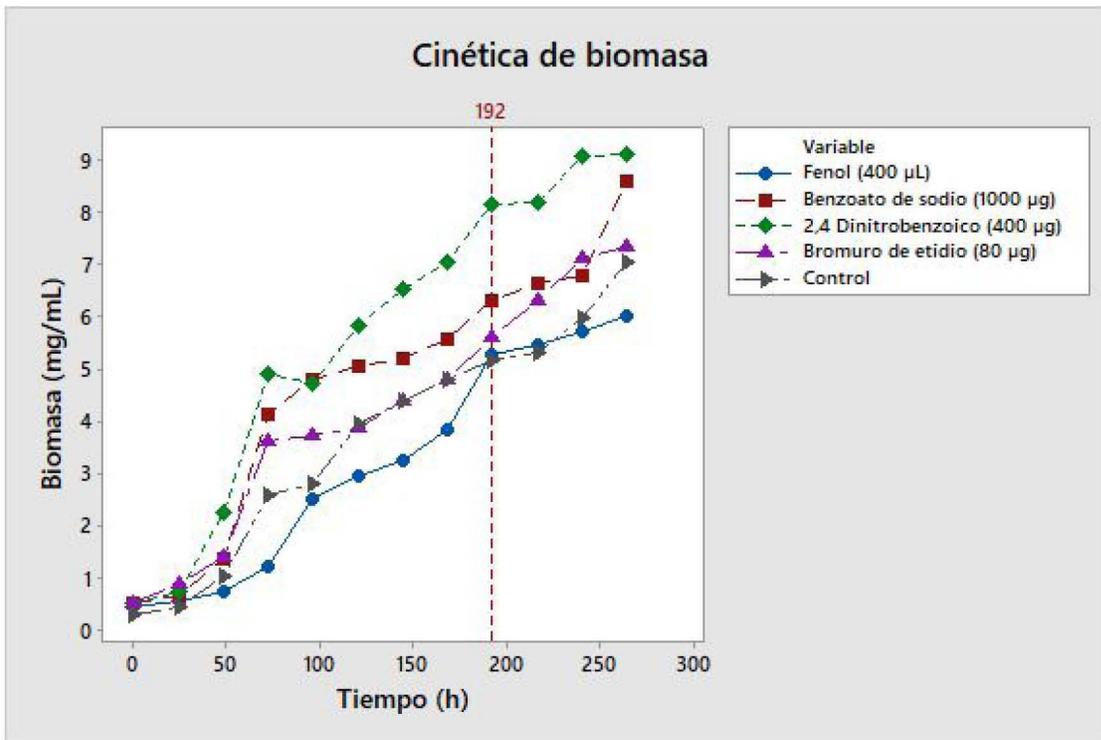


Gráfico 9. Cinética de biomasa en el sistema de 150 mililitros de volumen.

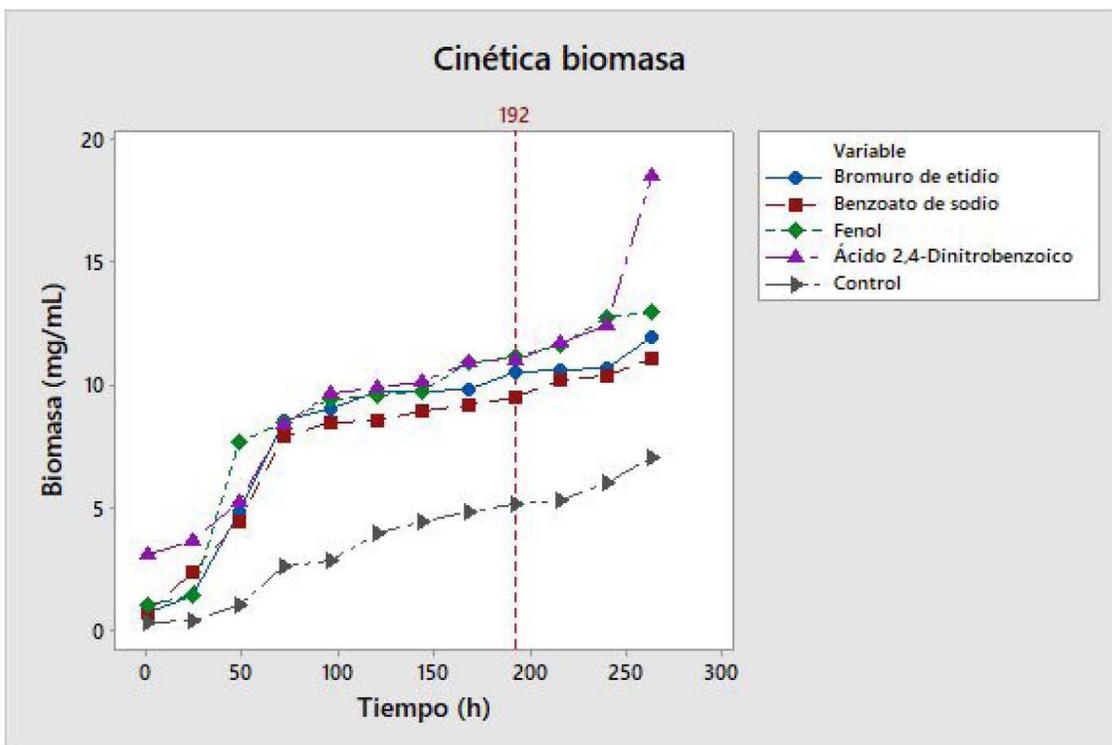


Gráfico 10. Cinética de biomasa en el sistema de 75 mililitros de volumen.

## Pruebas de antibiosis

Para obtener los resultados de antibiosis se llevaron a cabo las pruebas en placas de agar de PDA con sensidiscos impregnados con los productos de fermentación y se midieron los halos obtenidos. Posteriormente se graficaron los datos. Primero, se comparó cómo difería la respuesta de cada hongo a las excreciones de las actinobacterias sometidas a los diferentes tratamientos. *A posteriori* se graficó el número de hongos y efecto de cada uno en función del tratamiento

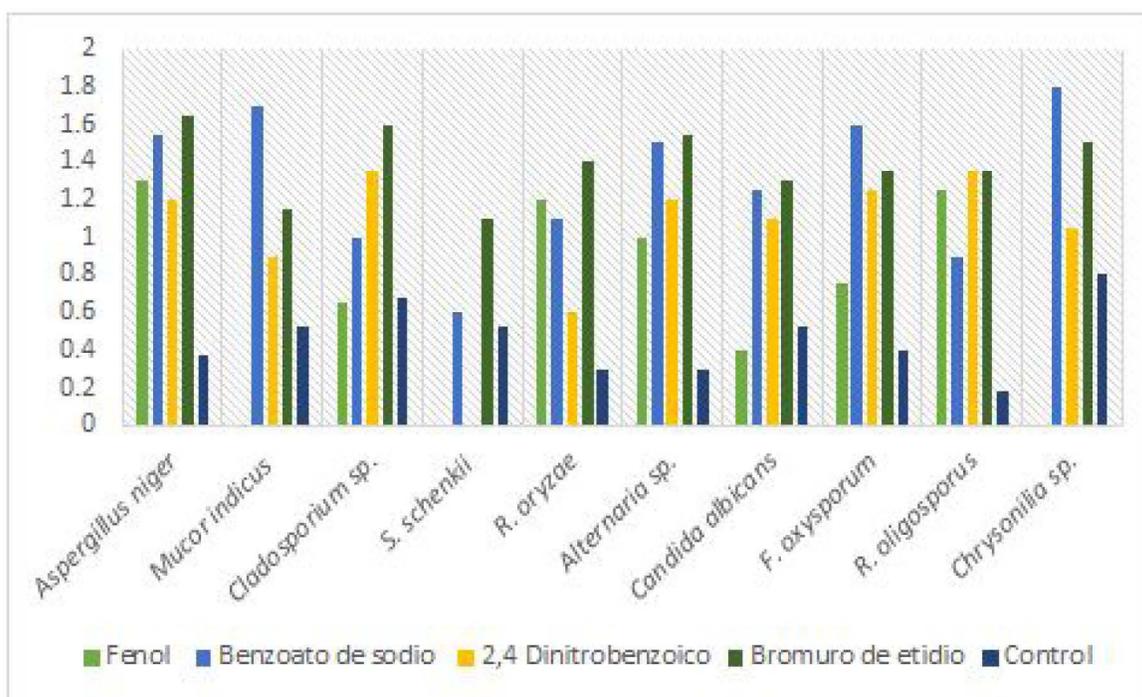


Gráfico 11. Efecto de cada sustancia en los diferentes hongos, fermentación de 150 mililitros.

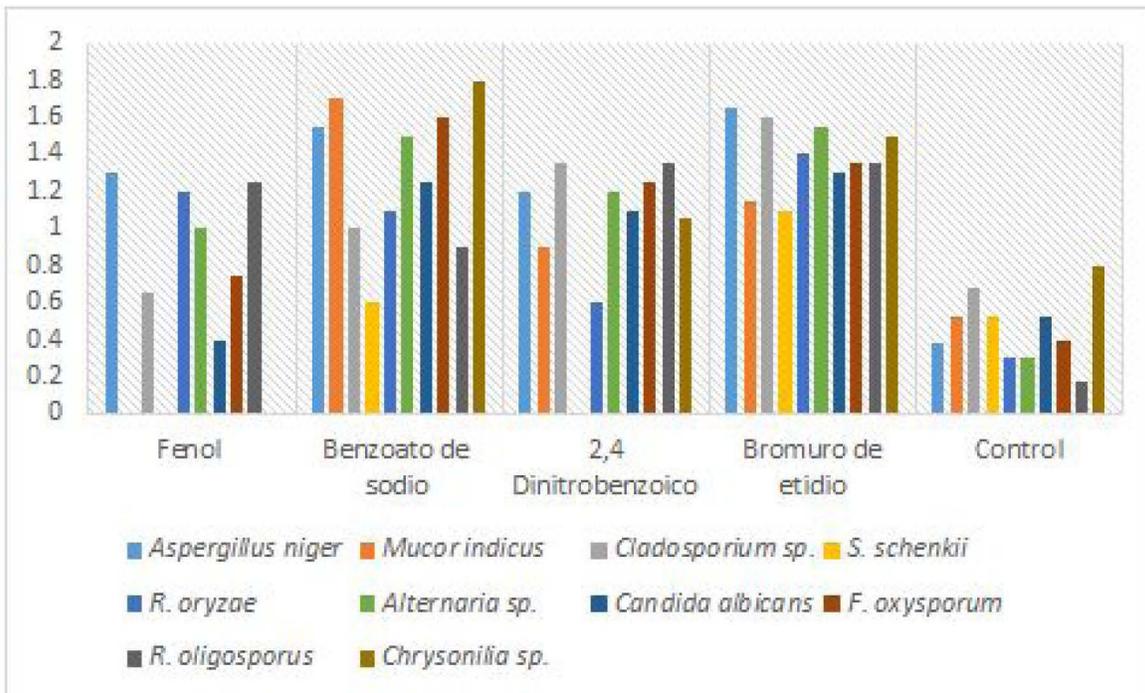


Gráfico 12. Número de hongos afectados por cada sustancia en la fermentación de 150 mililitros.

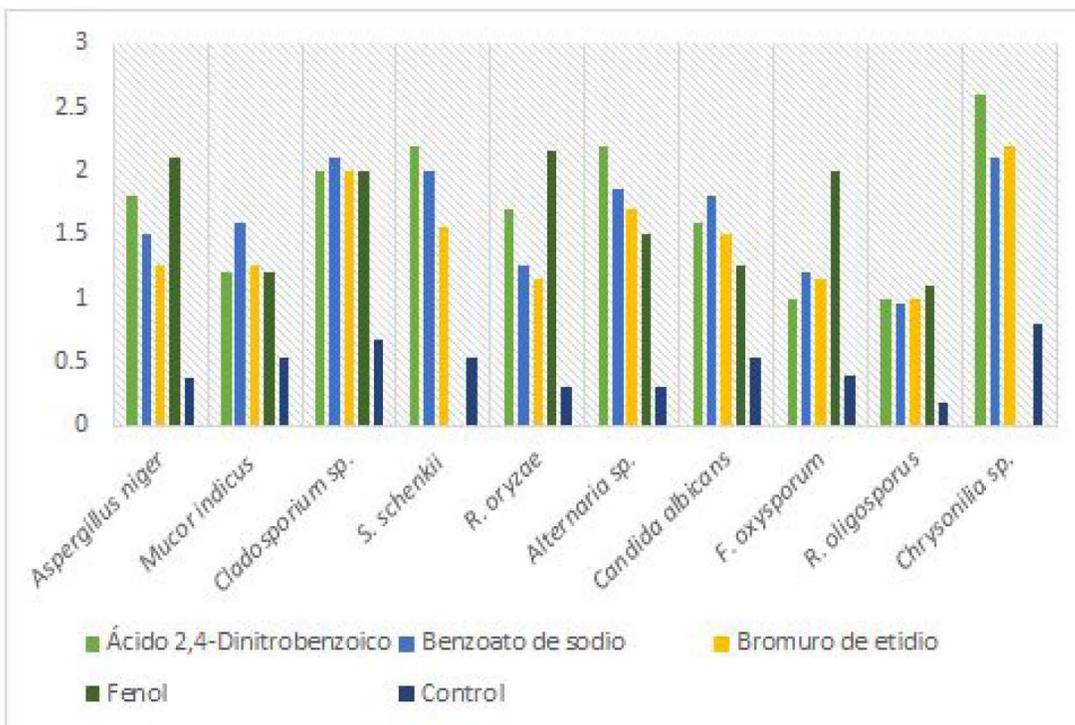


Gráfico 13. Efecto de cada sustancia en los diferentes hongos, fermentación de 75 mililitros.

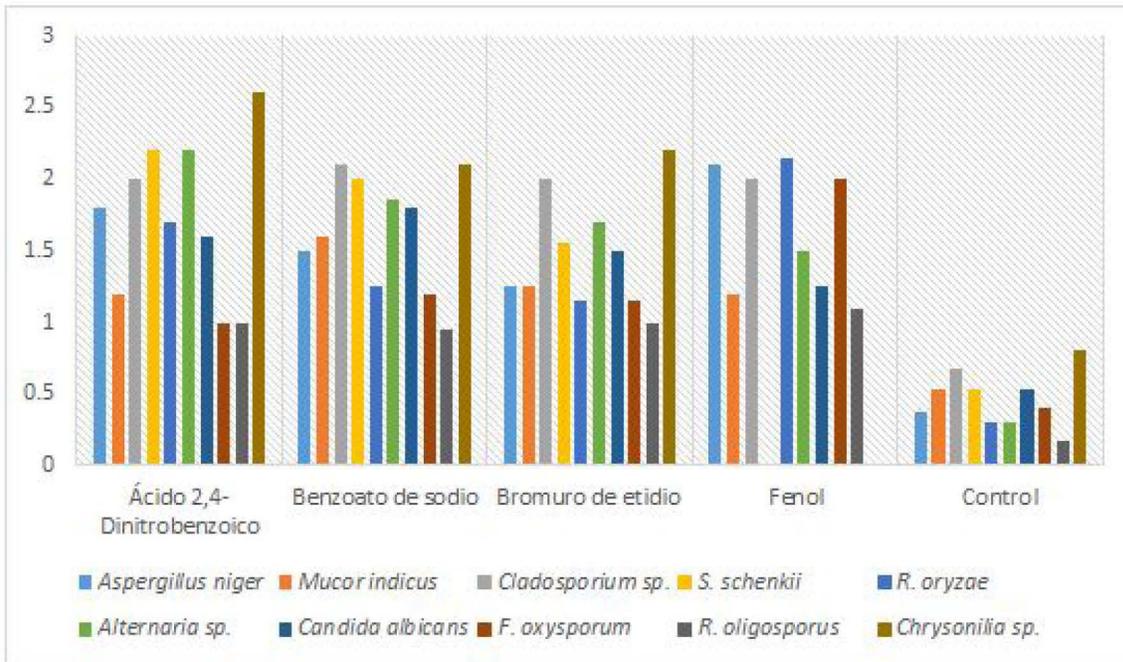


Gráfico 14. Número de hongos afectados por cada sustancia en la fermentación de 75 mililitros.

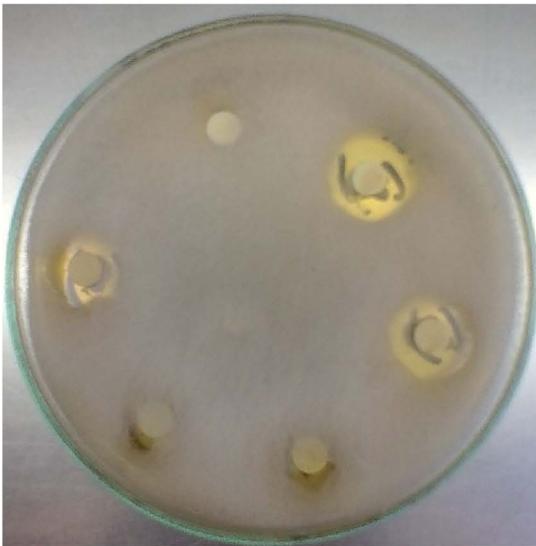


Fig. 8 Pruebas de antibiosis en placa, donde se muestran algunos resultados obtenidos después de los tratamientos con las sustancias tóxicas; Superior izquierda-*Candida albicans*, Superior derecha- *Aspergillus niger*, Inferior izquierda- *Mucor indicus*, Inferior derecha- *Chrysonilia sp.*

## Análisis estadístico de las pruebas de antibiosis

Con el fin de conocer si hay diferencias significativas entre los tratamientos de cada fermentación con respecto al control se llevó a cabo un análisis de varianza; para esto es necesario comprobar que no hay valores atípicos en los datos con una prueba de Grubbs. Posteriormente se llevó a cabo la prueba ANOVA con el fin de saber si hay diferencias entre las medias de todos los experimentos y una prueba de comparaciones múltiples de Dunnett para identificar cuales son los tratamientos que poseen diferencias con el control. Estos análisis se realizaron con el software estadístico Minitab 17.

### Fermentación 150 mililitros

#### Prueba de valores atípicos: Medida de halo

Método

Hipótesis nula: Todos los valores de los datos provienen de la misma población normal

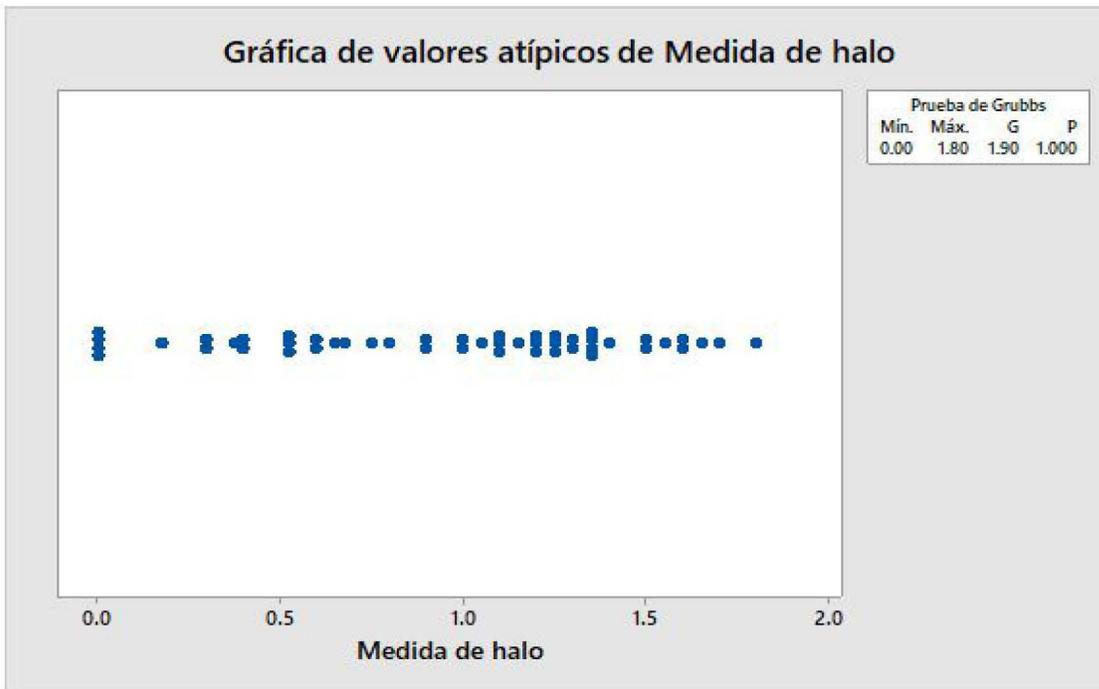
Hipótesis alterna: El valor más pequeño o más grande de los datos es un valor atípico

Nivel de significancia:  $\alpha = 0.05$

Tabla 3. Prueba de Grubbs

Variable	N	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo	G	P
Medida de halo	50	0.9620	0.5074	0.0000	1.8000	1.90	1.000

\* NOTA \* No hay valor atípico en el nivel de significancia de 5%



*Gráfica 15. Valores atípicos de Medida de halo*

### **ANOVA unidireccional: Medida de halo vs. Sustancia**

Método

Hipótesis nula: Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna: Por lo menos una media es diferente

Nivel de significancia:  $\alpha = 0.05$

Se presupone igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor: Sustancia, Niveles: 5

Valores: Ácido 2,4-Dinitrobenzoico, Benzoato de sodio, Bromuro de etidio, Control, Fenol

*Tabla 4. Análisis de Varianza*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Sustancia	4	6.494	1.6236	11.93	0.000
Error	45	6.122	0.1360		
Total	49	12.617			

### Resumen del modelo

S: 0.368850

R-cuadrada: 51.47%

R-cuadrada (ajustado): 47.16%

R-cuadrada (pred): 40.09%

*Tabla 5. Medias*

Sustancia	N	Media	Desviación estándar	IC de 95%
Ácido 2,4 Dinitrobenzoico	10	1	0.418	( 0.765, 1.235)
Benzoato de sodio	10	1.3	0.392	( 1.065, 1.535)
Bromuro de etidio	10	1.395	0.1833	(1.1601, 1.6299)
Control	10	0.46	0.1879	(0.2251, 0.6949)
Fenol	10	0.655	0.532	( 0.420, 0.890)

Desv. Est. agrupada = 0.368850

$p=0.000 < \alpha=0.05$

Se rechaza la hipótesis nula

Por lo menos una media es diferente

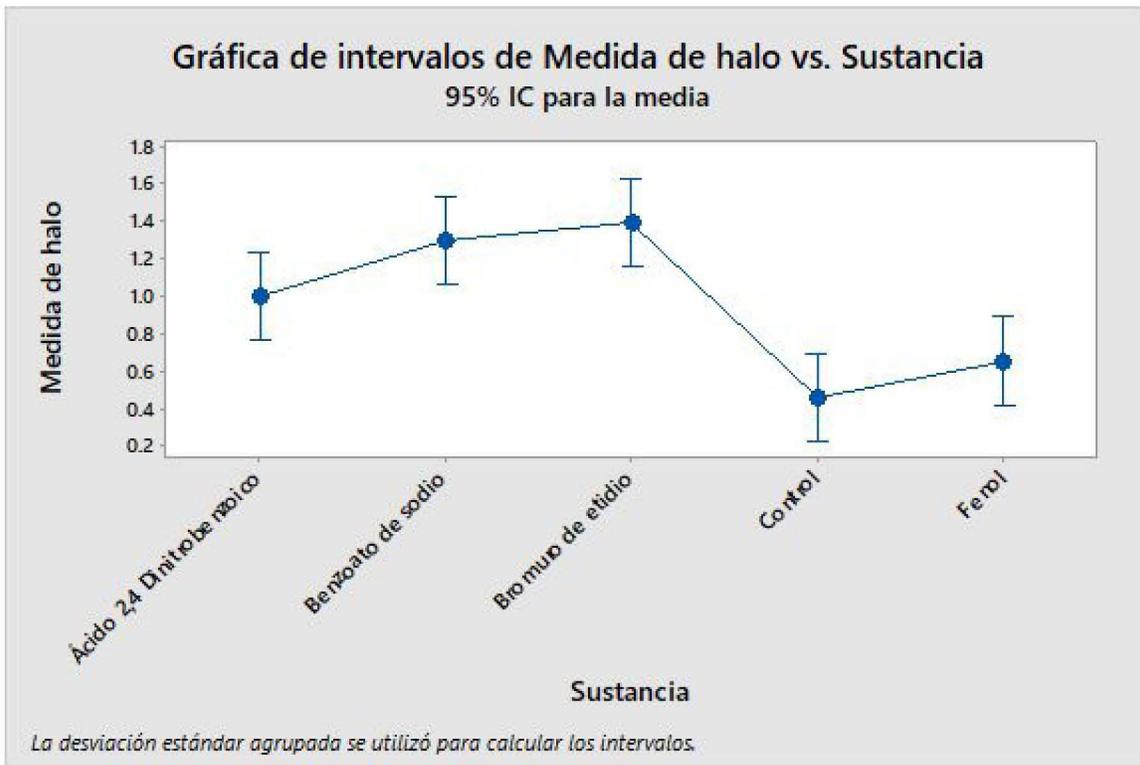


Gráfico 16. Desviaciones estándar

### Comparaciones múltiples de Dunnett con un control

Agrupar información utilizando el método de Dunnett y una confianza de 95%

Tabla 6. Comparaciones por medio del método de Dunnett.

Sustancia	N	Media	Agrupación
Control (control)	10	0.460	A
Bromuro de etidio	10	1.395	
Benzoato de sodio	10	1.300	
Ácido 2,4 Dinitrobenzoico	10	1.000	
Fenol	10	0.655	A

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.

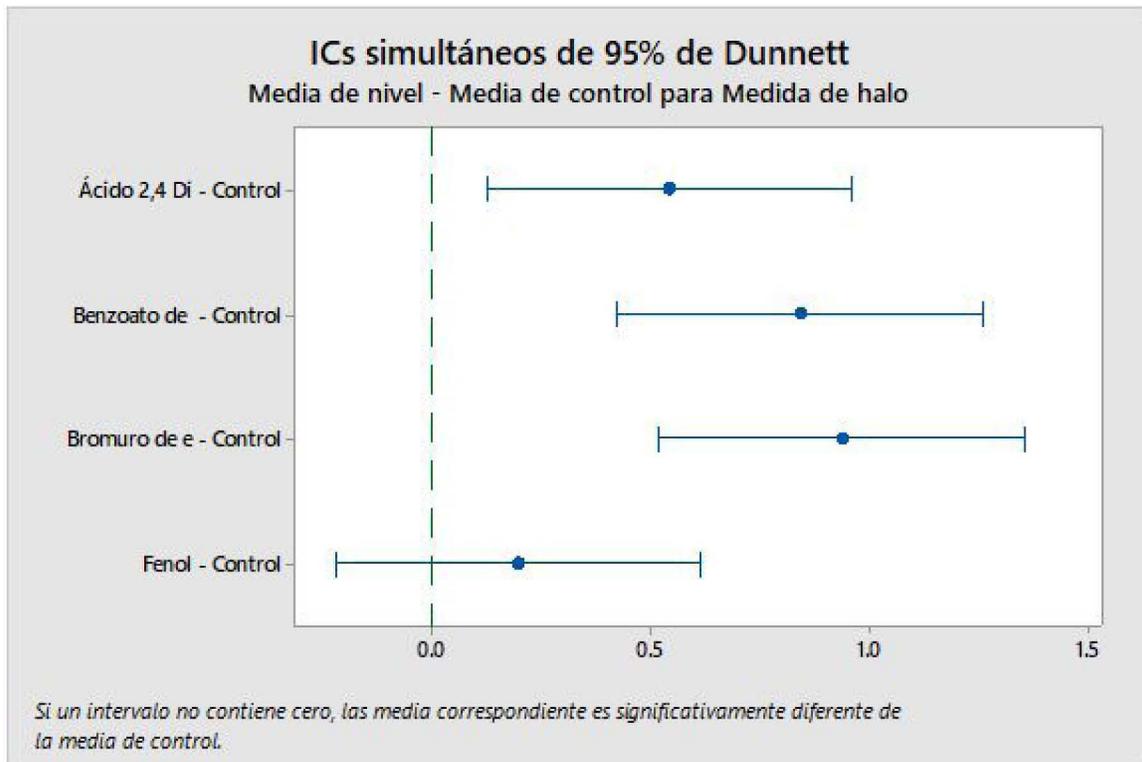


Gráfico 17. Prueba de Dunnett.

## Fermentación 75 mililitros

### Prueba de valores atípicos: Medida de halo

Método

Hipótesis nula: Todos los valores de los datos provienen de la misma población normal

Hipótesis alterna: El valor más pequeño o más grande de los datos es un valor atípico

Nivel de significancia:  $\alpha = 0.05$

Tabla 7. Prueba de Grubbs

Variable	N	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo	G	P
Medida de halo	50	1.3260	0.6691	0.0000	2.6000	1.9800	1.0000

\* NOTA \* No hay valor atípico en el nivel de significancia de 5%

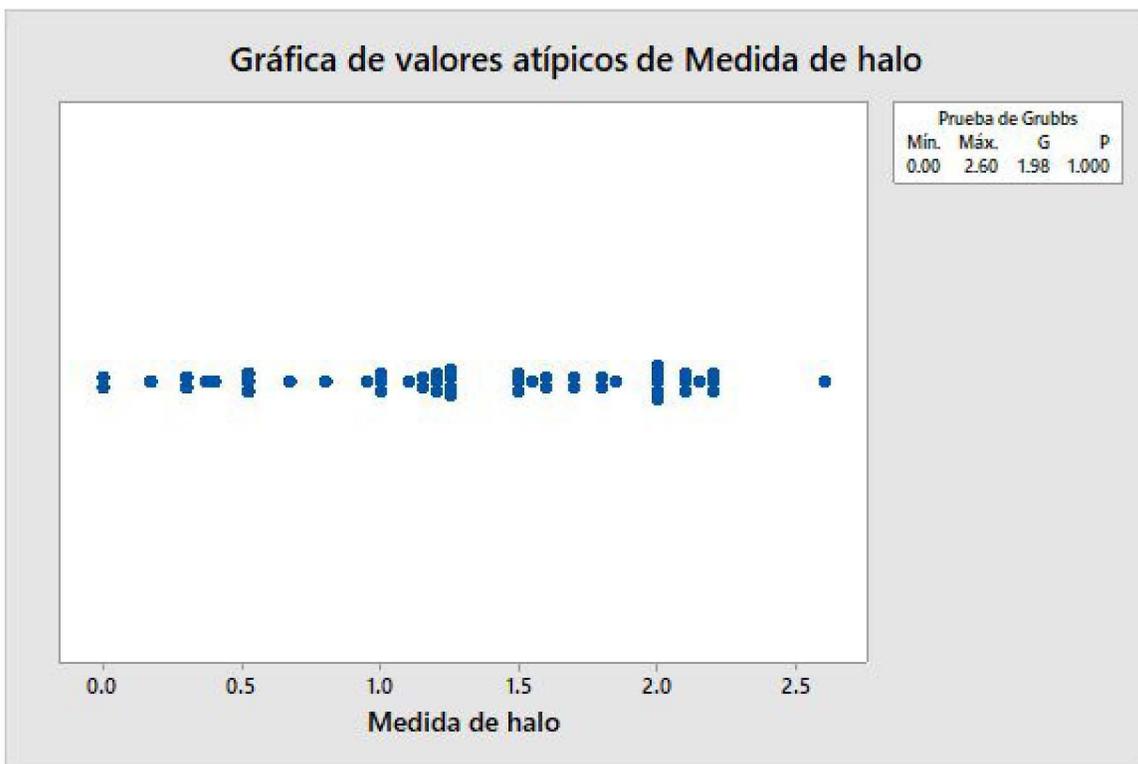


Gráfico 18. de valores atípicos de Medida de halo

### **ANOVA unidireccional: Medida de halo vs. Sustancia**

Método

Hipótesis nula                      Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna                    Por lo menos una media es diferente

Nivel de significancia  $\alpha = 0.05$

Se presupone igualdad de varianzas para el análisis.

### Información del factor

Factor: Sustancia, Niveles: 5

Valores: Ácido 2,4-Dinitrobenzoico, Benzoato de sodio, Bromuro de etidio, Control, Fenol

*Tabla 8. Análisis de Varianza*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Sustancia	4	10.31	2.5772	9.98	0
Error	45	11.63	0.2584		
Total	49	21.93			

### Resumen del modelo

S: 0.508292

R-cuadrada: 47%.00%

R-cuadrada (ajustado): 42.29%

R-cuadrada (pred): 34.56%

*Tabla 9. Medias*

Sustancia	N	Media	Desv. Est.	IC de 95%
Ácido 2,4-Dinitrobenzoico	10	1.73	0.542	(1.406, 2.054)
Benzoato de sodio	10	1.635	0.403	(1.311, 1.959)
Bromuro de etidio	10	1.475	0.394	(1.151, 1.799)
Control	10	0.46	0.1879	(0.1363, 0.7837)
Fenol	10	1.33	0.803	(1.006, 1.654)

Desv.Est. agrupada = 0.508292

$p=0.000 < \alpha=0.05$  Se rechaza la hipótesis nula

Por lo menos una media es diferente

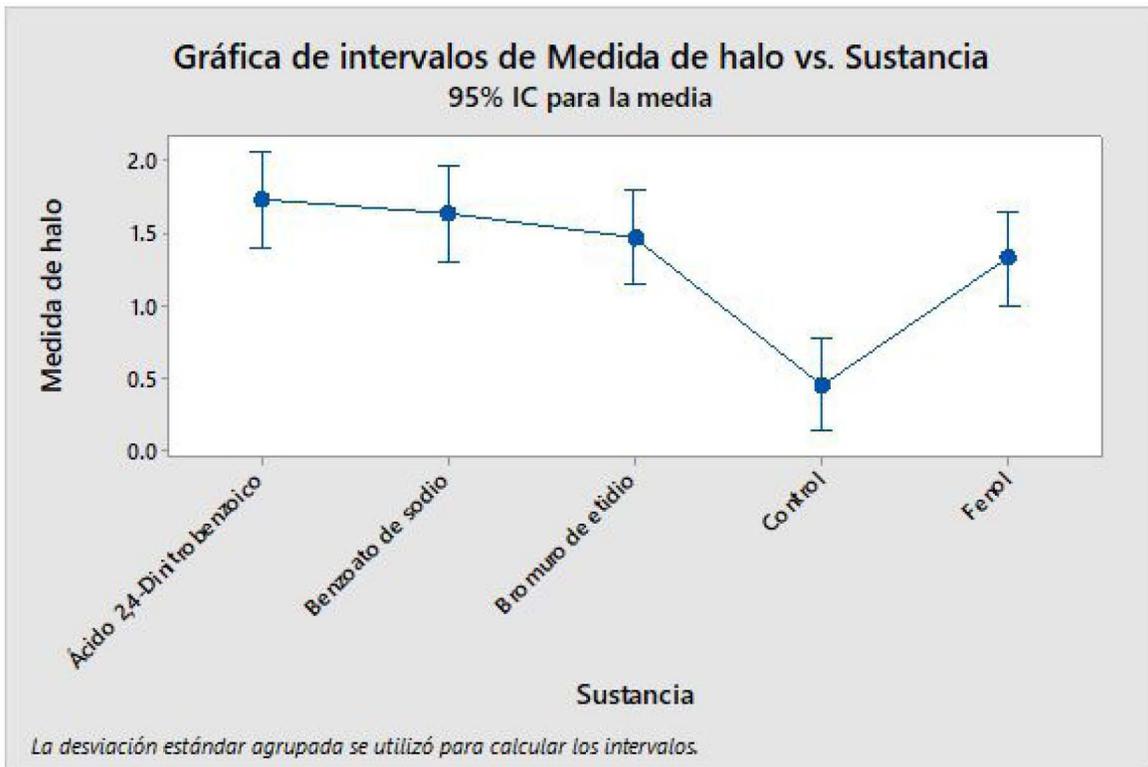


Gráfico 19. Desviaciones estándar

### Comparaciones múltiples de Dunnett con un control

Agrupar información utilizando el método de Dunnett y una confianza de 95%

Tabla 10. Comparaciones por medio del método de Dunnett.

Sustancia	N	Media	Agrupación
Control (control)	10	0.460	A
Ácido 2,4-Dinitrobenzoico	10	1.730	
Benzoato de sodio	10	1.635	
Bromuro de etidio	10	1.475	
Fenol	10	1.330	

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.

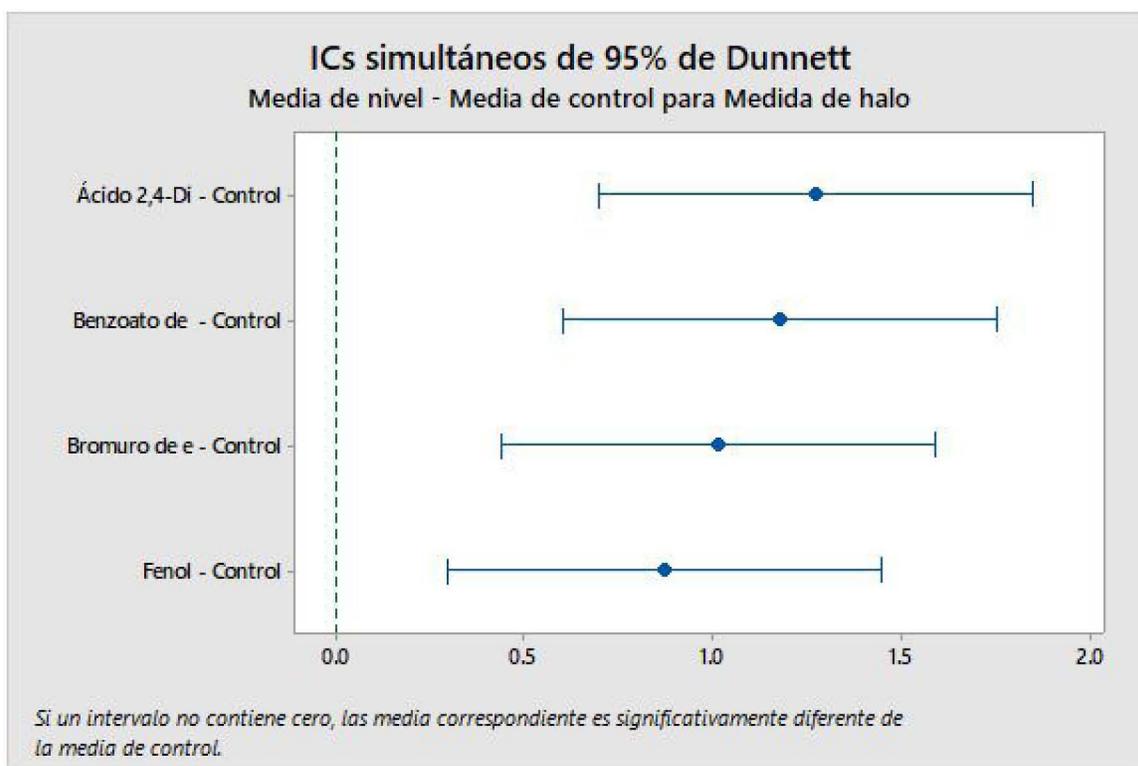


Gráfico 20. Prueba de Dunnett

# IX. Discusión de resultados

## Cinética de pH

Durante la fermentación de 150 mL (Gráfico 1) se observó que no hay cambios significativos en los tratamientos con fenol y benzoato de sodio con respecto al control. En cambio, en el tratamiento con Ácido 2,4-Dinitrobenzoico se observó un cambio de pH más pronunciado. Lo contrario sucedió con el bromuro de etidio, donde la producción de ácidos es más reducida con respecto a los demás tratamientos. En cambio, la fermentación de 75 mL (Gráfico 2) muestra que todos los tratamientos tienen una diferencia notable con el control, sin embargo, la producción de ácidos es similar en todos los tratamientos.

En el caso de las actinobacterias, los reportes indican que durante las fermentaciones, éste tipo de microorganismos llevan a cabo la producción de algunos ácidos en cantidades pequeñas como el ácido succínico, fórmico y acético, sin embargo, los predominantes son el ácido oxálico, cítrico y glucónico (Prieto, 2015). Las condiciones para favorecer la producción de cada uno son diferentes, sin embargo, en el caso de las ácidos cítricos, es necesaria una alta concentración de carbohidratos, baja concentración de manganeso, alta cantidad de oxígeno disuelto, agitación constante, y pH ácido (Goldberg, 2006).

Estos datos sugieren que el cambio de volumen de fermentación es un factor que contribuye de manera importante en la optimización de la producción de ácidos orgánicos, ya que los resultados obtenidos indican

que un menor volumen favorece la agitación y, por lo tanto, existe mayor disponibilidad de oxígeno en el medio donde se desarrollan las actinobacterias. En cuanto a los tratamientos con cada sustancia, no existe una evidencia clara que las sustancias tengan influencia en el cambio de pH.

## **Cinética de consumo de carbohidratos**

El consumo de carbohidratos es similar en todos los tratamientos y no se observa un cambio aparente después de adicionar al medio de cultivo las sustancias con las que se llevan a cabo los tratamientos (Gráfico 3 y 4), sin embargo, es posible percibir nuevamente el efecto de la disminución del volumen de fermentación en el gráfico 4, respaldando el hecho de que una mejor oxigenación mejora algunos procesos metabólicos en la fermentación que se llevó a cabo.

## **Rendimiento de biomasa**

El rendimiento de biomasa en la fermentación de 150 mililitros nos indica que el fenol y el benzoato de sodio tienen un crecimiento menos acelerado con respecto al control y los tratamientos con bromuro de etidio y el ácido 2,4-dinitrobenzoico (Gráfico 5). El efecto observado con la sal sódica se debe principalmente a que éste compuesto interfiere con la permeabilidad de las membranas celulares y que es causante de un efecto competitivo con las coenzimas que intervienen en la actividad de los sistemas enzimáticos de las células microbianas (Bello, 2000). En

cambio, el fenol ataca directamente los lípidos de la membrana y además interfiere la acción de sus enzimas (Enrile, 2009).

Por el contrario, el experimento de 75 mililitros (Gráfico 6) demostró una mejoría del uso de sustrato con respecto al control en todos los tratamientos exceptuando el bromuro de etidio, el cual es un agente intercalante que puede posicionarse entre dos pares de bases adyacentes del DNA e interferir con la transcripción y replicación de la molécula (Herraez, 2012).

## **Uso eficiente del sustrato**

Durante esta medición fue posible detectar que todos los tratamientos demostraron una menor eficiencia de uso del sustrato en la fermentación de 150 mL (Gráfico 7). El compuesto con el cual esto se presentó con menor intensidad fue el ácido 2,4-dinitrobenzoico. Por otra parte, las fermentaciones cuyo volumen fue de 75 mililitros (Gráfico 8) optimizaron el uso de sustrato con respecto al control exceptuando al bromuro de etidio, donde no hubo diferencia significativa con respecto a su experimento homólogo en la fermentación de 150 mL.

## **Cinética de biomasa**

En el primer experimento para medir las cinéticas de crecimiento en la fermentación de 150 mL (Gráfico 9) se observó un aumento más pronunciado de la cepa con el tratamiento donde se utilizó el ácido 2,4-dinitrobenzoico con respecto al control y los demás tratamientos; probablemente esto se debe a que es el compuesto que presenta menor toxicidad para las células de todas las sustancias utilizadas, clasificado únicamente como irritante (NCBI, 2004).

Mientras tanto, el experimento de 75 mL (Gráfico 10) nos indica que no existen diferencias significativas en el crecimiento cuando se comparan los los tratamientos, sin embargo, no hay similitud con respecto al control. Esto se debe a que existe una optimización en la agitación; este proceso ayuda a mantener una cantidad constante de oxígeno disuelto, evita la sedimentación de las células, y logra la distribución uniforme de nutrientes en el medio, lo cual, favorece la reproducción bacteriana (Liao, 2018).

## **Pruebas de antibiosis**

Se llevó a cabo un análisis para identificar valores atípicos y fue posible determinar que en las pruebas de antibiosis del experimento de 150 y 75 mL no se encontraron valores anómalos, (Gráfico 15 y 18) por lo cual, se prosiguió con las siguientes pruebas estadísticas.

Al realizar la prueba ANOVA, en el caso de ambas fermentaciones se determinó que por lo menos había un tratamiento que tiene una diferencia significativa con respecto a los demás. La gráfica de intervalos de confianza nos muestra estas diferencias, indicando que los tratamientos con los compuestos aromáticos tienen halos más grandes en comparación con el control. Para el experimento de 150 mL (Gráfico 16) se observó que los halos fueron más grandes en el caso del Ácido 2,4-Dinitrobenzoico, Benzoato de sodio y Bromuro de etidio. Mientras que en el caso de la fermentación con volumen de 75 mL (Gráfico 19) la diferencia fue visible en el caso de las cuatro sustancias.

Por consiguiente, fue necesario utilizar la prueba *post hoc* de Dunnett con el fin de comparar los tratamientos con el control e identificar cuáles de ellos son los que tienen medias diferentes. La medición nos indicó que la diferencia más grande se encuentra en el bromuro de

etidio (Gráfico 17) y con el ácido 2,4-dinitrobenzoico (Gráfico 20) en el caso de la fermentación de 150 y 75 mL respectivamente.

El benzoato de sodio mantuvo un efecto significativo en ambas fermentaciones y debido a que es un compuesto con baja toxicidad para el organismo humano, es adecuado para llevar a cabo la optimización de la producción de la cepa en los dos sistemas probados.

Por último, aunque las diferencias con el fenol si fueron significativas en el experimento con menor volumen, en ambos casos, el análisis confirmó que es la que produce menor cambio con respecto al control, por lo cual, no es la sustancia recomendable para lograr los objetivos propuestos en el trabajo experimental.

En cuanto al efecto en los hongos, los resultados indican que hay un efecto más pronunciado del sobrenadante sobre las especies *Cladosporium* sp. *Chrysonilia* sp. y *Alternaria* sp., mientras que en la fermentación de 150 mL, los hongos que mostraron mayor sensibilidad fueron *Aspergillus niger*, *Chrysonilia* sp. y *Alternaria* sp. En la figura 8 es posible observar algunos resultados de las pruebas de antibiosis llevadas a cabo con el sobrenadante de la última fermentación en la cual se comparan los efectos de los diferentes compuestos probados.

## **X. Conclusiones**

Según los resultados encontrados en la investigación, la producción de las cepas de actinobacterias si fue optimizada cuando se llevaron a cabo tratamientos de exposición ante diferentes compuestos aromáticos, siendo los más efectivos el bromuro de etidio y el ácido 2,4-dinitrobenzoico en el sistema semi-anaeróbico y aeróbico respectivamente, sin embargo, los demás compuestos (benzoato de

sodio y fenol) también mostraron efectos significativos. Es posible que el efecto observado esté relacionado con el hecho que bajo estrés ambiental aumenta la expresión de los transportadores ATP-Binding Cassette.

También es importante puntualizar que *Aspergillus niger*, *Chrysonilia* sp., *Cladosporium* sp. y *Alternaria* sp. fueron los hongos que demostraron mayor susceptibilidad ante los metabolitos secundarios producidos por la cepa de actinobacterias.

El estudio de las variaciones fisicoquímicas nos indicaron que no existen cambios drásticos al aplicar las sustancias durante las cinéticas, sin embargo, en las determinaciones finales se puede observar que algunas sustancias afectan en mayor o menor medida el crecimiento, probablemente debido a que la toxicidad de muchas de ellas logran afectar la homeostasis de las células. Las más tóxicas para la cepa estudiada fueron el bromuro de etidio y el benzoato de sodio, puesto que afectan los sistemas de transcripción y la membrana plasmática.

También fue posible determinar que un sistema aeróbico mejora la producción de antibióticos en el caso de la cepa estudiada, por lo cual, es recomendable llevar a cabo fermentaciones con volúmenes pequeños con el fin de que mediante la agitación aumente la cantidad de oxígeno disuelto en el medio.

Para investigaciones futuras, es recomendable llevar a cabo estudios para identificar la cepa estudiada por medio de técnicas de biología molecular, además, es posible llevar a cabo estudios de genómica, transcriptómica y proteómica de los transportadores ABC presentes en las actinobacterias para corroborar que efectivamente, las sustancias logran aumentar su expresión. Además, es posible dilucidar la identidad

química de los compuestos activos mediante técnicas cromatográficas o a través de de espectrometría de masas o espectroscopía infrarroja.

## **XI. Bibliografía**

### Referencias

1. Ash, M. (2004). Handbook of Preservatives. United States of America: Synapse Information Resources, p. 524
2. Ausina, V. & Moreno, S. (2006). Tratado SEIMC de enfermedades Infecciosas y microbiología clínica. España: Médica Panamericana.
3. Bello, J. (2000). Ciencia bromatológica: principios generales de los alimentos. España: Diaz de Santos p. 486
4. Coates, R. (2012). Antibiotic resistance. London: Springer. pp.1-5
5. Del Sorbo, G., Shoonbeek, H. & De Waard, M. (2000). Fungal Transporters Involved in Efflux of Natural Toxic Compounds and Fungicides. *Fungal Genetics and Biology*, 30, pp. 1-15.
6. Enrile, F. & Fuentemayor, V. (2009). Manual de higiene bucal. España: Médica Panamericana p. 108
7. Garcés, E., Orozco, M., Bautista, G. & Valencia, E. (2001). *Fusarium oxysporum* the fungus that one should know. *Acta biológica colombiana*, 6, pp. 7-22.
8. Goldberg, I., Rokem, S. & Pines, O. (2006). Organic acids: old metabolites, new themes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81, pp. 1601-1611.
9. Hancock, R. (1997). The Role of Fundamental Research and Biotechnology in Finding Solutions to the Global Problem of Antibiotic Resistance. *Biotechnology and Antibiotic Resistance*, 24, pp. 148-150.

10. Herráez, A. (2012). *Biología molecular e ingeniería química*. España: Elsevier p. 141.
11. Johnsson, A., Christensson, J., Strand, C., Litman, T. & Eriksen, J. (2005). Gene Expression Profiling in Chemoresistant Variants of Three Cell Lines of Different Origin. *Anticancer research*, 25, pp. 2661-2668.
12. Kapil, A. (2005, February). The challenge of antibiotic resistance: Need to contemplate. *Indian J Med Res*, 121, pp. 83-91.
13. Liao, Q., Chang, J., Herrmann, C. & Xia, a.. (2018). *Bioreactors for Microbial Biomass and Energy Conversion*. Singapore: Springer p. 133.
14. Lorenzo, P., Moreno, A., Leza, J., Lizasoain I., Moro, M. & Portolés, A. (2008). Velázquez. *Farmacología Básica y Clínica*. Madrid: Panamericana. pp. 957-972.
15. Mendelson, M. (2015, May). Practical solutions to the antibiotic resistance crisis. *South African Medical Journal*, pp. 105, 414.
16. Méndez, C. & Salas, J. (1998). ABC transporters in antibiotic-producing actinomycetes. *Federation of European Microbiological Societies, Microbiology letters*, 158, pp. 1-8.
17. Méndez, C. & Salas, J. (2000). The role of ABC transporters in antibiotic-producing organism: Drug secretion and resistance mechanisms. *Research in microbiology*, 152, pp. 341-350.
18. Nathan, C. & Cars, O. (2004, november 6). Antibiotic Resistance. *The New England Journal of Medicine*, pp. 371;19, 1761-1763
19. Patil, U. & Muskan, K. (2009). *Essentials of Biotechnology*. India: IK International Publishing House p. 393

20. Paulsen, I. (2003). Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution. *Current Opinion in Microbiology*, 6, pp. 446-451.
21. Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. (2004). *Microbiología*. España: Mc Graw Hill. pp.579-590
22. Prieto, G., Prada, L., Cuervo, C. & Franco, M. (2015). Evaluation of organic acid production by *Streptomyces* spp. and solubilization of three phosphorus sources by strain T3A. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17, pp. 111-121.
23. Quiroga, V. (1976). *Manual Práctico Para El Análisis de Experimentos de Campo*. Costa Rica: IICA, p. 76.
24. Raherison, S., Gonzalez, P., Renaudin, H., Charron, A., Bébéar, C. & Bébéar, M. (2002). Evidence of Active Efflux in Resistance to Ciprofloxacin and to Ethidium Bromide by *Mycoplasma hominis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46, pp. 672-679.
25. Ramos, J., Duque, E., Gallegos, M., Godoy, P., Ramos, M., Rojas, A., Teran, W., & Segura, A. (2002). Mechanism of solvent tolerance in Gram-negative bacteria. *Annual Review of microbiology*, 56, pp. 743-768.
26. Rivas, L. & López, M. (1993). *Parasitología molecular*. España: Consejo Superior de Investigaciones científicas. p. 399
27. Sabins, R. (2010). *Handbook of Biological Dyes and Stains: Synthesis and Industrial Applications*. United States of America: John Wiley & Sons, p. 183
28. Saier, M. & Paulsen, I. (2001). Phylogeny of multidrug transporters. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 12, pp 205-213.

29. Serrano, R. (2003). Introducción al análisis de datos experimentales: tratamiento de datos en bioensayos. España: Publicacions de la Universitat Jaume I, pp. 69-82.
30. Teijón, J., Garrido, A. & Blanco, D. (2006). Fundamentos de bioquímica metabólica. Madrid: Tébar, p. 13.
31. Torres, L. (2001). Tratado de cuidados críticos y emergencias . España: Arán. p. 1358
32. Watkinson S., Boddy L. & Money N. (2016). The fungi. United States of America: Elsevier.
33. Wright, J., Muench, S., Goldman, A. & Baker, A. (2018). Substrate polyspecificity and conformational relevance in ABC transporters: new insights from structural studies. Biochemical Society Transactions, 46, pp. 1475-1484.

#### Consultas electrónicas

34. National Center for Biotechnology Information. (2004). PubChem Database. Fecha de consulta: Junio 06, 2019. U.S. National Library of Medicine. Sitio web: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phenol>
35. National Institute of Health. (2005). ChemIDplus. Fecha de consulta: Junio 06, 2019. U.S. National Library of Medicine. Sitio web: <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/sid/0000610300>

## **XII. Anexos o apéndices**

### **1. Cepas utilizadas para las pruebas de antibiosis.**

Las especies de hongos que fueron utilizadas para las pruebas de antibiosis fueron proporcionadas por el cepario de la Facultad de química y fueron las siguientes:

- *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus oryzae* y *Mucor indicus*: Son considerados hongos mucorales, pueden infectar por inhalación (llegan a vasos sanguíneos y se diseminan por el sistema nervioso central) ingestión (invaden los vasos sanguíneos de las paredes intestinales) o inoculación percutánea (Poco frecuente, se asocia con invasión vascular, trombosis y producción de infartos). En pacientes diabéticos produce mucormicosis rinocerebral que puede derivar en problemas neurológicos y síntomas como descargas sanguinolentas y fétidas, salida de pus del ojo, edema periorbital, inflamación facial, dolor, cefalea y fiebre. En la variación pulmonar hay lesión en bronquios. fiebre, tos, esputo, hemoptisis y disnea. Cuando invaden el aparato gastrointestinal se presenta dolor abdominal intenso, fiebre y diarrea negra o sanguinolenta.
- *Alternaria spp*: Es un hongo patógeno de vegetales que se encuentra principalmente en el suelo y plantas en descomposición. Es uno de los principales agentes que causan infecciones en trigo, sorgo y cebada. Produce toxinas que pueden causar leucocitosis, leucopenia, hemorragia y edema.
- *Fusarium oxysporum*: Es un hongo cosmopolita capaz de parasitar más de 100 especies de plantas. Únicamente pueden actuar como

patógenos en pacientes inmunosuprimidos, quienes desarrollan infecciones en piel que se manifiestan como máculas o pápulas y produciendo queratitis, endoftalmitis y artritis. Puede causar enfermedades en piel, meninges, sangre, cerebro, esófago, recto y paladar.

- *Cladosporium sp.*: La especie *C. hormodendrum* puede originar una micosis subcutánea debido a la inoculación de heridas, en donde posteriormente hay aparición de una mácula eritematosa. que evoluciona a pápula o pústula de color violáceo y cubierta de escamas. En el caso de la infección linfática se produce una modulación verrucosa que drena material hemopurulento, encostramiento y descamación
- *Candida albicans*: Es un hongo oportunista que posee adhesinas importantes para la colonización y la persistencia. El tejido infectado se identifica por un proceso inflamatorio agudo con presencia de polimorfonucleares y microabscesos. En las infecciones mucocutáneas se reconocen granulomas. Se puede presentar en tres tipos; la tegumentaria (más frecuente y que incluye a la candidiasis oral, vulvovaginal, intertriginosa, oniquia, cutánea, mucosa y granuloma), la visceral y la septicémica.
- *Sporothrix schenckii*: Es un hongo dimórfico que cuando se instala en la piel produce una lesión inicial que se disemina a tejidos contiguos o aborda los vasos linfáticos. En el sitio de inoculación hay formación de un chancro que se disemina por todo el sistema por medio de nódulos subcutáneos ulcerados. La infección también puede presentarse como esporotricosis interna parecida a la tuberculosis, incluyendo la formación de cavernas, neumonía crónica, decrecimiento de los ganglios, derrame pleural y zonas de necrosis caseosa.

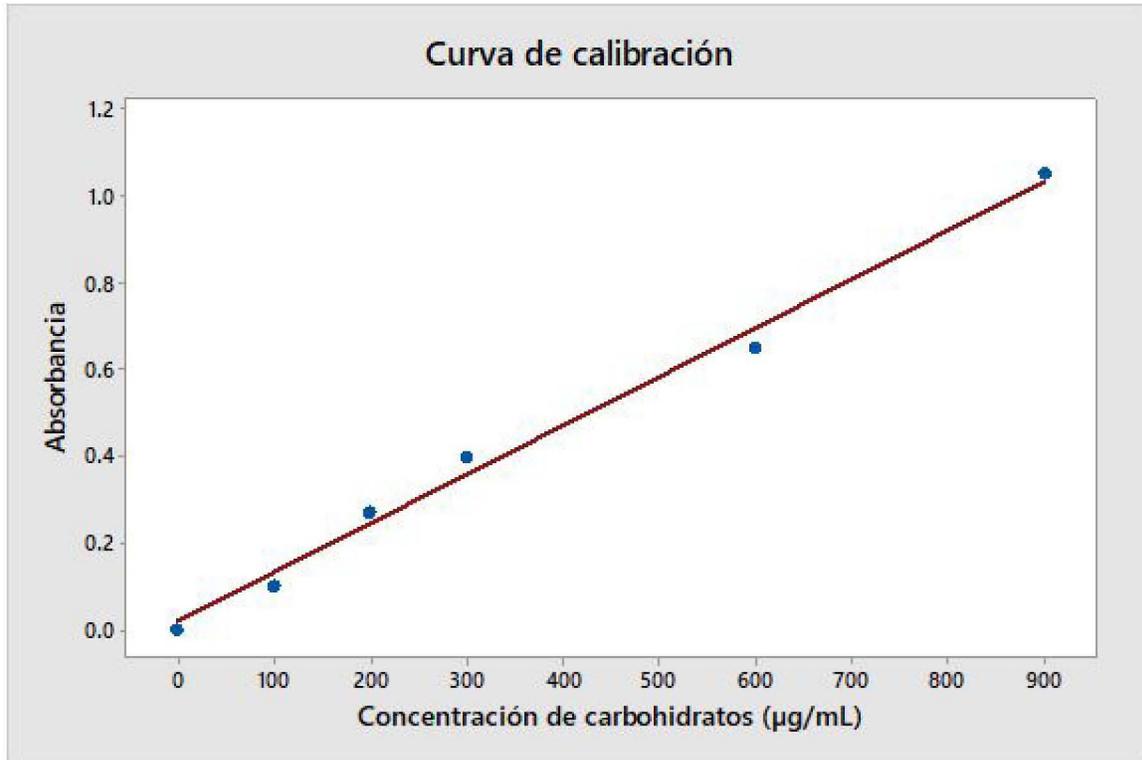
- *Scedosporium apiospermum*: Hongo micelar cosmopolita que se puede aislar de forma común en el suelo, estiércol y aguas contaminadas. Actúan como patógenos oportunistas causantes de enfermedades graves y de difícil tratamiento debido a contaminación de heridas. Puede producir endocarditis de la válvula protésica. Las manifestaciones clínicas incluyen micetomas eumicóticos, lesiones de piel, artritis, queratomicosis, osteomielitis, sinusitis, neumonía y endoftalmitis.

## 2. Curva de calibración para la cuantificación de carbohidratos.

Tabla 11. Concentraciones de carbohidratos para la preparación de la curva de calibración

Sustancia ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbancia
0	0.00
100	0.10
200	0.27
300	0.40
600	0.65
900	1.05

Después de llevar a cabo la medición de las absorbancias se construyó la curva y se realizó el ajuste a una recta para llevar a cabo los cálculos de la concentración de carbohidratos de las muestras problema.



Gráfica 21. Curva de calibración de carbohidratos

### 3. Ecuaciones

Ec. (1)  $\text{Cambio de pH} = \text{pH de muestra} - \text{pH inicial}$

Ec. (2)  $\text{Absorbancia} = 0.0011(\text{Concentración de carbohidratos}) + 0.0214; R = 0.9894$

Ec. (3)  $\text{Concentración de carbohidratos} = (\text{Absorbancia} - 0.0214)/0.0011$

Ec. (4)  $Yx/s = ((\text{Biomasa final})/(\text{glucosa utilizada})) * 100$

Ec. (5)  $EUS = ((S_i - S_f)/S_i) * 100$

## 4. Composición del medio de fermentación

Sustancia	Concentración porcentual
Glucosa .....	4.0000%
Sulfato de amonio.....	0.2500%
Extracto de levadura .....	1.0000%
Fosfato monobásico de potasio .....	0.3000%
Fosfato dibásico de potasio .....	0.3000%
Sulfato de magnesio.....	0.0010%
Cloruro de hierro.....	0.0001%

## 5. Información sobre los análisis estadísticos

### 5.1 Análisis de Grubs.

Debido a que la mayoría de las pruebas estadísticas son paramétricas es necesario asegurar que los datos utilizados tienen distribución normal. La existencia de valores anómalos puede invalidar cualquier suposición, por lo cual, es necesario eliminar estos datos.

En el caso de muestras con  $n > 10$  la prueba más adecuada es la R de Grubs; para calcularlo se utiliza la siguiente fórmula:

$$R_{exp} = (X_{sospechoso} - X_{promedio})/s$$

Si  $R_{exp} > R_{tab}$  entonces ese valor debe eliminarse, ya sea utilizando una prueba estadística o por descarte directo en caso de que el valor sea provocado por un error salvaje (Serrano 2003).

## **5.2 Análisis de varianza**

Este análisis desarrollado por R. A. Fisher es útil para comprobar si dos o más medias muestrales se obtuvieron de poblaciones con la misma medida paramétrica respecto a una variable. Para aplicarla, los datos deben ser independientes, la distribución debe ser normal y las varianzas deben ser homogéneas.

En el caso del experimento a probar, se utilizó un análisis de varianza de una vía, lo que quiere decir que se controla un solo factor y se evalúan las medias para conocer si hay alguna diferencia significativa.

## **5.3 Prueba de Dunnett**

Después de probar por medio de la prueba ANOVA que por lo menos un grupo posee diferencias con otro, es necesario conocer cuál de las medias es diferente. La prueba de Dunnett sirve para comparar cada tratamiento con respecto a un testigo, por esto es que fue elegida con el fin de conocer cuáles tratamientos muestran diferencias (Quiroga, 1976).