



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**TESIS**

***Aislamiento de microorganismos productores de sustancias antimicrobianas provenientes del compostaje***

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

**PRESENTA**

**Verónica Sánchez Álvarez**



**Ciudad Universitaria, CD.MX.**

**AÑO 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: JESÚS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE**

**VOCAL: EDUARDO BONILLA ESPINOSA**

**SECRETARIO: LUCIANO HERNÁNDEZ GÓMEZ**

**1<sup>er</sup> SUPLENTE: JOSÉ IGNACIO PÁRAMO RAMÍREZ**

**2<sup>o</sup> SUPLENTE: ALEIDA MINA CETINA**

**LUGAR DONDE SE REALIZÓ LA TESIS:**

**Laboratorio de Microbiología Molecular, Laboratorio Anexo 1-A, Edificio A.  
Facultad de Química, UNAM**

**ASESOR:**

Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre

---

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

M en C. Raquel Ortega Muñoz

---

**SUTENTANTE:**

Verónica Sánchez Álvarez

---

## **AGRADECIMIENTOS**

## RESUMEN

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) se ha convertido en uno de los principales problemas de salud pública del siglo XXI que amenaza la prevención y el tratamiento efectivo de una gama cada vez mayor de infecciones causadas por bacterias, parásitos, virus y hongos que ya no son susceptibles a los medicamentos comunes usados para tratarlos. El problema es especialmente urgente con respecto a la resistencia a los antibióticos en las bacterias. (Prestinaci, Pezzotti y Pantosti, 2015)

Algunas de las estrategias que se están explorando para combatir la resistencia incluyen: modificar antibióticos viejos en clases completamente nuevas, combinar antibióticos, suplementar antibióticos con adyuvantes, el desarrollo de anticuerpos contra factores de virulencia, probióticos, vacunas y la búsqueda de nuevos antibióticos en la naturaleza.

Alrededor del 75% de los antibióticos conocidos son producidos por actinomicetos y en su mayoría son producidos por un solo género, *Streptomyces*. Sin embargo, las bacterias no filamentosas también tienen el potencial de desempeñar un buen papel en la lucha contra RAM, como las especies de *Bacillus*, que pueden producir más de 60 antibióticos. (Martens *et al.*, 2017)

Los microorganismos que producen casi todos los antibióticos actualmente utilizados habitan el suelo. Un material de gran utilidad para el suelo, es la composta, una mezcla de residuos orgánicos descompuestos por microorganismos, que proporciona los nutrientes necesarios para el crecimiento de las plantas.

Durante la descomposición de los residuos orgánicos, los microorganismos podrían afectarse negativamente entre sí y producir sustancias antimicrobianas que les brinde una ventaja adaptativa frente a otros microorganismos.

En este estudio se aislaron bacterias de muestras ambientales de tierra y se determinó si eran capaces de producir sustancias antimicrobianas sin las condiciones del proceso de compostaje. Una vez obtenidos los cultivos puros, las

cepas se crecieron en matraces con caldo Luria del cual se eliminó las células y a partir del sobrenadante del medio de cultivo se precipitaron las proteínas.

Se realizó el aislamiento de bacterias provenientes de cuatro compostajes y se obtuvieron los sobrenadantes utilizando el mismo procedimiento. La producción de sustancias antimicrobianas en las muestras ambientales de tierra y del compostaje se determinó con el método de difusión en agar ante bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Los resultados mostraron que, de 94 aislados, 14 cepas del compostaje produjeron sobrenadantes que inhibieron el crecimiento de las cepas sensibles como *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Salmonella enterica* Typhi ATCC 19430. La inhibición de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 sólo ocurrió al crecer las cepas en caldo Luria con detergente.

Posteriormente, se comprobó la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes frente a cepas multirresistentes a antibióticos (Anexo I). Se seleccionaron aquellos sobrenadantes que produjeron mayor inhibición y se purificaron parcialmente.

Finalmente, se realizó un gel SDS-Page que reveló el peso molecular aproximado de los péptidos que posiblemente fueron los responsables de la actividad antimicrobiana.

# ÍNDICE

<b>1.Introducción.....</b>	<b>8</b>
Composta.....	8
Compostaje.....	8
Tipos de compostaje.....	9
Materiales utilizados para compostaje.....	9
Fases del compostaje.....	12
Microorganismos en el compostaje.....	13
Antimicrobianos.....	15
Antibióticos.....	15
Péptidos antimicrobianos.....	17
Bacteriocinas.....	18
Resistencia antimicrobiana.....	20
<b>2. Objetivo General.....</b>	<b>23</b>
Objetivos particulares.....	23
<b>3. Hipótesis.....</b>	<b>23</b>
<b>4. Metodología.....</b>	<b>25</b>
Elaboración de los compostajes y estudio microbiológico de las cepas obtenidas del proceso .....	25
Detección de actividad antimicrobiana en muestras ambientales de tierra y obtenidas del compostaje .....	28
Aislamiento y purificación de las cepas.....	28
Obtención de sobrenadante libre de células .....	28
Precipitación de proteínas en el sobrenadante.....	29
Evaluación de la actividad antimicrobiana.....	29
Características macroscópicas y microscópicas.....	30
Identificación y conservación de las cepas productoras de sustancias antimicrobianas.....	30
Eficiencia del detergente para liberar la sustancia antimicrobiana.....	30
Selección de cepas multirresistentes.....	31
Purificación parcial de los sobrenadantes crudos.....	31
Evaluación de la actividad antimicrobiana sobre cepas multirresistentes.....	32

Cuantificación de proteínas por el método de Lowry.....	32
Patrón proteico del sobrenadante de las cepas aisladas productoras de sustancias antimicrobianas.....	33
Determinación de la cantidad requerida de sustancia antimicrobiana para producir inhibición del crecimiento.....	33
<b>5. Resultados y Análisis.....</b>	<b>34</b>
Detección de actividad antimicrobiana de los sobrenadantes producidos por cepas aisladas de muestras ambientales de tierra.....	34
Seguimiento microbiano del compostaje.....	35
<b>6. Conclusiones.....</b>	<b>59</b>
<b>7. Bibliografía.....</b>	<b>60</b>
<b>Anexo I.....</b>	<b>67</b>
<b>Anexo II .....</b>	<b>68</b>
<b>Anexo III.....</b>	<b>70</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

### **Composta**

La composta es un material orgánico que se obtiene como producto de la acción microbiana controlada sobre residuos orgánicos, que por acción de los microorganismos durante un proceso llamado compostaje, da origen a un material de gran utilidad para el suelo. (Torres, 2000)

La composta representa una manera eficiente de reciclar nutrientes y estimular el crecimiento de las plantas, así como incorporar nutrientes a los suelos erosionados. (Cerrato *et al.*, 2007)

### **Compostaje**

Se trata de una técnica mediante la cual se crean las condiciones necesarias para promover la descomposición de la materia orgánica y asegurar la fertilidad del suelo. Esta técnica está basada en lo que ocurría en la naturaleza sin ayuda del ser humano donde la materia orgánica de las plantas y animales, se mezclan en el suelo, descomponiéndose y aportando sus nutrientes a la tierra. (Pérez, 2008)

Es posible interpretar el compostaje como el sumatorio de procesos metabólicos complejos realizados por parte de diferentes microorganismos que aprovechan el nitrógeno y el carbono presentes para producir su propia biomasa. (Román *et al.*, 2013)

La descomposición biológica de la materia es realizada por consorcios microbianos con distintos requerimientos fisiológicos y tolerancias, consistentes con el entorno continuamente cambiante a lo largo del proceso. (Antunes *et al.*, 2016) El producto obtenido es la composta, que contribuye a la mejora de las propiedades físicas, químicas y microbiológicas del suelo. (Sánchez *et al.*, 2017)

## **Tipos de compostaje**

El compostaje aerobio es un proceso exotérmico de degradación y estabilización biológica del material orgánico en presencia de oxígeno, mediante la acción combinada de una serie de poblaciones de microorganismos asociados a una sucesión de factores ambientales, se obtienen como principales productos del metabolismo biológico: dióxido de carbono, agua y calor. El proceso provoca la variación de temperatura del sistema.

Por otra parte, el compostaje anaerobio o biometanización, es la descomposición de la fracción orgánica en ausencia de oxígeno obteniendo como productos finales metano, dióxido de carbono y numerosos productos orgánicos de bajo peso molecular como ácidos y alcoholes. La materia orgánica actúa como nutriente de microorganismos anaerobios que la descomponen y dan como producto final biogás, compuesto por metano y anhídrido carbónico. El método anaerobio se lleva a cabo mediante digestores o fermentadores. (Salazar, 2014)

## **Materiales utilizados para el compostaje**

Para obtener una composta, como ya se indicó, se requiere del suministro de desechos orgánicos, que por su origen se clasifican como:

- Domésticos.

Esta categoría considera materiales residuales de comida (partes de fruta, verduras, cáscara de huevo, entre otros) y/o desechos de origen animal (carne, piel, sangre, huesos y otros).

- De jardín.

Incluye los restos de cultivo de huertas, flores muertas, tallos, pastos y hojarasca.

- Subproductos agrícolas.

Los más utilizados son los residuos de cosecha (por ejemplo: arroz, trigo, cebada, maíz, caña de azúcar, frijol, girasol, etc.) así como cascarillas y salvado obtenidos de la trilla o molienda.

- Desechos de ganado.

Los estiércoles y la orina de todo tipo de animales son excelentes para el compostaje ya que contienen un alto porcentaje de nutrimentos.

- Forestales.

Los restos de las podas de los árboles, hojas y ramas caídas son fuente importante de material para la elaboración de compostas. Estos desechos tienen grandes cantidades de celulosa y lignina que se descomponen parcialmente en el compostaje y continúan mineralizándose en el suelo después de aplicados.

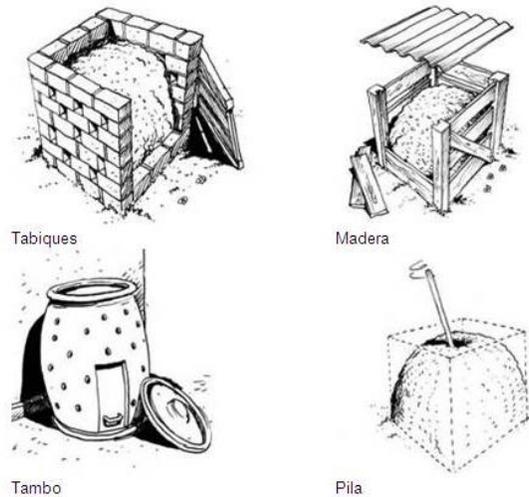
- Desechos urbanos y agroindustriales.

Se constituyen de la fracción biodegradable de la basura, como cartón, papel, residuos finos de comida y fibras naturales, y los residuos que proceden de la industrialización de productos tales como hortalizas, cacao, café, arroz, maíz, trigo, sorgo, maderas y semillas, entre otros.

- Materiales no biodegradables

Debe evitarse el uso de vidrios, metales, alambre, plásticos, caucho, cenizas frescas, fibras sintéticas o frutos con espinas, ya que pueden causar problemas a las personas encargadas de su manejo. (Torres, 2000)

Existen diversos sistemas de compostaje: en pilas, en cajas o composteras, abiertas o cerradas en los que se suministran los desechos orgánicos. (Román *et al.*, 2013)



**Imagen 1. Sistemas de compostaje**

Para mejorar la composición química y la estructura se pueden adicionar otros insumos durante el proceso de composteo, entre estos se encuentran:

- Activadores

Son sustancias que estimulan la descomposición del material orgánico, contienen gran cantidad de proteínas y aminoácidos. Los activadores o catalizadores como el excremento de vaca suministran una fuente de nutrición para acelerar la reproducción de microorganismos y por consiguiente la descomposición de la materia. (Salazar, 2014)

- Inoculantes.

Cultivos de bacterias o medios donde se encuentran microorganismos que promueven la descomposición, entre estos se pueden señalar a las bacterias del género *Azotobacter*. (Torres, 2000).

- Enriquecedores

Son fertilizantes comerciales incorporados al proceso, la calidad de los nutrientes de la composta mejora obteniendo un mejor producto final. (Salazar, 2014)

## **Fases del compostaje**

Al descomponer la materia orgánica inicial y utilizar los compuestos de carbono y nitrógeno los microorganismos liberan energía, que puede medirse a través de las variaciones de temperatura a lo largo del tiempo. Según la temperatura generada durante el proceso, se reconocen tres etapas principales en un compostaje: la fase mesófila, termófila y de enfriamiento, además de una etapa de maduración de duración variable. (Román *et al.*, 2013)

Las diferentes fases del compostaje se dividen según la temperatura, en:

1. Fase Mesófila. En esta primera fase, también llamada fase de inicio los compuestos ricos en energía como los azúcares, proteínas y lípidos presentes en las materias primas utilizadas para hacer la composta son fácilmente degradados por hongos, actinobacterias y bacterias, que crecen entre 15 °C y 35 °C, generalmente conocidos como descomponedores primarios, los cuales inducen un aumento de la temperatura. Esta fase tiene una duración corta entre 2 y 8 días. (Díaz, 2007 y Román *et al.*, 2013)

2. Fase Termófila o de Higienización. Cuando el material alcanza temperaturas mayores a los 45°C, los microorganismos que se desarrollan a temperaturas medias (microorganismos mesófilos) son reemplazados por aquellos que crecen a mayores temperaturas, en su mayoría bacterias (bacterias termófilas), que actúan facilitando la degradación de fuentes más complejas de carbono, como la celulosa y la lignina. Estos microorganismos actúan transformando el nitrógeno en amoníaco por lo que el pH del medio sube. En especial, a partir de los 60 °C aparecen las bacterias que producen esporas y actinobacterias, que son las encargadas de descomponer las ceras, hemicelulosas y otros compuestos de carbono complejos. Esta fase puede durar desde unos días hasta meses, según el material de inicio, las condiciones climáticas del lugar, pH y temperatura. El proceso puede durar entre una semana, en sistemas acelerados, y uno o dos meses en sistemas de fermentación lenta. (Pérez, 2008)

Esta fase también recibe el nombre de fase de higienización ya que el calor generado destruye bacterias y contaminantes de origen fecal como *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* Igualmente, es importante dado que las temperaturas por encima de los 55°C eliminan los quistes y huevos de helminto, esporas de hongos fitopatógenos y semillas de malezas que pueden encontrarse en el material de inicio, dando lugar a un producto higienizado. (Román *et al.*, 2013)

3. Fase de Enfriamiento o Mesófila II. Cuando la actividad de los organismos termófilos cesa debido al agotamiento de los sustratos, la temperatura comienza a disminuir. Los organismos mesófilos recolonizan el sustrato, ya sea originario de esporas, a través de la propagación de micro nichos o de inoculación externa. Esta fase de enfriamiento requiere de varias semanas. (Díaz, 2007 y Román *et al.*, 2013)

4. Fase de Maduración. Es un período que demora meses a temperatura ambiente, durante los cuales se producen reacciones secundarias de condensación y polimerización de compuestos carbonados para la formación de ácidos húmicos y fúlvicos. (Román *et al.*, 2013)

### **Microorganismos en el compostaje**

Una amplia diversidad de microorganismos conforma las poblaciones mixtas del proceso de compostaje. Las más importantes son bacterias, actinomicetos y hongos filamentosos. (Laich, 2011)

La presencia de los actinomicetos durante el proceso de compostaje es relevante, debido a su capacidad enzimática para hidrolizar sustancias orgánicas complejas como la celulosa y la pectina. (Tiquia, 2002)

Los hongos filamentosos constituyen un grupo muy amplio; pueden estar implicados durante el proceso de compostaje, participando en la degradación aeróbica de la materia orgánica debido a su alta capacidad lignocelulolítica; *Aspergillus fumigatus*, termófilo, ha sido encontrado frecuentemente en compostas. (Camacho *et al.*, 2008)

Las bacterias son las más numerosas en el proceso de compostaje, y constituyen entre el 80% y el 90% de los microorganismos existente en el compostaje. Se trata de un grupo de gran diversidad metabólica, que utilizan un amplio rango de enzimas que degradan químicamente una gran variedad de compuestos orgánicos. (Laich, 2011)

De acuerdo a la temperatura, los microorganismos psicrófilos, mesófilos y termófilos pueden funcionar mejor dentro de intervalos de temperatura específicos. Los psicrófilos son los primeros en hacer aparición a temperaturas debajo de 0 °C, pero son muy activos alrededor de 10 °C y 15 °C, por lo que generan calor suficiente para crear condiciones óptimas para los mesófilos.

Los microorganismos mesófilos que crecen entre 15 °C y 45 °C, presentan su desarrollo óptimo entre los 20 °C y 40 °C, entre ellos se encuentran los géneros: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Thiobacillus*, *Enterobacter*, *Streptomyces*, levaduras, mohos y bacterias celulolíticas. A mayores temperaturas, la población inicial es desplazada por miembros de género *Bacillus* y actinomicetos. En la Tabla 1, se muestran los géneros identificados durante el proceso. (Bueno, 2007; Haug, 1993; y Moreno, 2008)

En las condiciones propias del compostaje, los microorganismos podrían afectarse negativamente entre sí a través de la competencia por nutrientes, oxígeno o espacio, mediante la excreción de productos metabólicos inhibidores.

**Tabla 1. Principales géneros de microorganismos identificados en muestras ambientales obtenidas durante el proceso de compostaje de residuos sólidos**

<b>Bacterias</b>	<b>Hongos</b>	<b>Actinomicetos</b>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Acremonium</i>	<i>Actinomyces</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Nocardia</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Thermoactinomyces</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Thermomonospora</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Cladosporium</i>	
<i>Salmonella</i>	<i>Fusarium</i>	
<i>Serratia</i>	<i>Geotrichum</i>	
<i>Shigella</i>	<i>Mucor</i>	
<i>Staphylococcus</i>	<i>Penicillium</i>	
<i>Streptococcus</i>	<i>Rhizopus</i>	
<i>Yersinia</i>	<i>Stachybotrys</i>	

## **Antimicrobianos**

Los antimicrobianos se refieren a un grupo de agentes que comparten el objetivo común de reducir la posibilidad de infección y sepsis. La idea del uso de químicos para aliviar enfermedades, particularmente enfermedades infecciosas, se remonta al Antiguo Egipto, Babilonia, el Lejano Oriente y los Incas. Estos primeros ejemplos de remedios incluyen la aplicación de hongos en cortadas y heridas abiertas, comer rábanos, porros, ajos y cebollas que ahora se sabe que son antibacterianos. (Kong *et al.*, 2010)

El primer agente antimicrobiano, el Salvarsán, fue sintetizado por Ehrlich en 1910 para tratar la sífilis y en 1935, Domagk desarrolló las sulfonamidas. Ambos compuestos sintéticos presentaron un amplio rango de limitaciones en términos de seguridad y eficacia. (Dehghan Esmatabadi *et al.*, 2017)

Desde entonces, se han incorporado a la práctica clínica decenas de familias de antimicrobianos, con actividad frente a bacterias, hongos, parásitos y virus. (Calvo y Martínez-Martínez, 2009)

## **Antibióticos**

Los antibióticos son sustancias antimicrobianas que constituyen un grupo heterogéneo de sustancias con diferente comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, ejercen una acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo, tienen elevada potencia biológica actuando a bajas concentraciones y la toxicidad es selectiva, con una mínima toxicidad para las células de nuestro organismo. (Pérez y Mota, 2006)

En 1928, Fleming descubrió que los hongos del género *Penicillium*, producían sustancias que podrían inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en el medio de cultivo. El compuesto se llamó penicilina y entró en uso clínico en la década de 1940. En la misma década se descubrió la estreptomina, un

antibiótico aminoglucósido y, posteriormente el cloramfenicol, las tetraciclinas, los macrólidos y glicopéptidos, por ejemplo, la vancomicina, a partir de microorganismos aislados del suelo. (Dehghan Esmatabadi *et al.*, 2017)

Estos descubrimientos fueron revolucionarios e impulsaron la época dorada de los antibióticos (Tabla 2).

Podemos clasificar a los antibióticos según su mecanismo de acción. Algunos actúan sobre la membrana citoplásmica, otros intervienen en la síntesis de la pared celular, otros a nivel de la síntesis de proteínas, unos más sobre la replicación celular, otros a nivel de la síntesis de transcripción y traducción de ADN, así como otros actúan como antagonistas metabólicos. (Romero, 2007)

**Tabla 2. Clasificación química de los antibióticos descubiertos en la época dorada (Modificado de Brown y Wright, 2016)**

<b>Clasificación química</b>	<b>Mecanismo de acción</b>	<b>Modo de acción</b>	<b>Ejemplos</b>
Sulfonamidas* 1935	Síntesis del folato	Bacteriostático	Sulfanilamida
Beta-lactámicos 1928	Síntesis de pared celular	Bactericida	Penicilina, Cefalosporinas y Cabapenems.
Aminoglucósidos 1943	Síntesis de proteínas	Bactericida	Espectinomicina, Kanamicina y Neomicina.
Tetraciclinas 1944	Síntesis de proteínas	Bacteriostático	Tetraciclina y Doxiciclina.
Cloranfenicoles 1947	Síntesis de proteínas	Bacteriostático	Cloranfenicol
Macrólidos 1952	Síntesis de proteínas	Bacteriostático	Eritromicina y Claritromicina
Glucopéptidos 1953	Síntesis de pared celular	Bactericida	Vancomicina y Teicoplanina
Oxazolidinonas* 1956	Síntesis de proteínas	Bacteriostático	Linezolid
Ansamidas 1957	Síntesis ARN	Bactericida	Rifamicina
Quinolonas 1962	Síntesis ADN	Bactericida	Ciprofloxacina
Estreptograminas 1963	Síntesis de proteínas	Bactericida	Pristinamicina

\*Síntesis química

En este contexto es importante conocer la aplicación de los términos bacteriostático y bactericida que indican la acción de determinados agentes químicos.

- Bacteriostático.

Este término significa que detiene el metabolismo bacteriano o sea que inhibe o impide el crecimiento de las bacterias, pero estas permanecen viables; es decir, si quitamos el bacteriostático, lo diluimos o neutralizamos, las bacterias volverán a desarrollarse. Algunos antibióticos tienen este efecto; por lo tanto, actúan inhibiendo a las bacterias, dándole oportunidad al sistema de defensa del hospedero para que las elimine. (Hernández-Chavarría, 2002)

- Bactericida.

Se entiende por bactericida aquel que destruye los microorganismos dentro de un huésped. (Romero, 2007) En general, son bactericidas los antimicrobianos que actúan inhibiendo la síntesis de la pared, alterando la membrana citoplásmica o interfiriendo con algunos aspectos del metabolismo del ADN. (Calvo y Martínez-Martínez, 2009)

### **Péptidos antimicrobianos**

Los péptidos antimicrobianos son otro tipo de sustancias antimicrobianas, constituyen una parte importante de la respuesta inmune innata de la mayoría de los organismos vivos contra patógenos potenciales, exhiben una actividad antimicrobiana directa, una función mediadora y representa la defensa inicial del sistema del huésped. (Kang, *et al.* 2017)

El descubrimiento de los péptidos antimicrobianos comenzó en 1939 cuando Dubos, extrajo un agente antimicrobiano de una cepa de *Bacillus* proveniente del suelo. Posteriormente, se demostró que el sobrenadante protegía a los ratones de la infección por neumococos y al fraccionarlo se identificó como Gramicidina. (Bahar y Ren, 2013)

Debido a la limitada cantidad de antibióticos disponibles, las similitudes en su espectro de actividad, así como en el modo de acción, la investigación clínica y no clínica ahora está invirtiendo en la identificación de terapias antiinfecciosas nuevas y no convencionales. Curiosamente, los péptidos antimicrobianos (PAM) han captado rápidamente la atención como nuevos agentes terapéuticos emergentes. (Mahlapuu *et al.*, 2016)

Los péptidos antimicrobianos son moléculas de bajo peso constituidas por 10-100 aminoácidos, especialmente residuos de arginina, lo que hace que en su mayoría estén cargados positivamente. (González *et al.*, 2017)

Las características mencionadas son esenciales para la actividad de los péptidos antimicrobianos, los cuales tienen una carga neta positiva que permite la atracción electrostática hacia la carga negativa de las membranas y la formación de poros, siendo relativamente inactivos contra la carga neutra de las membranas celulares de mamíferos. (Kang *et al.*, 2017)

Muchos de estos péptidos tienen un amplio espectro de acción en contra de bacterias, hongos, parásitos y virus envueltos, haciéndolos candidatos para una nueva clase de antimicrobiano, así como un complemento de la terapia con los antibióticos convencionales, pues tienen sinergismo con estos. (Castañeda *et al.*, 2009 y González *et al.*, 2017)

### **Bacteriocinas**

Las bacterias también producen una amplia variedad de PAM para limitar el crecimiento de otros microorganismos, y a diferencia de otros antimicrobianos estos no son producidos por acción enzimática como la penicilina. (Mahlapuu *et al.*, 2016)

Las bacteriocinas son péptidos biológicamente activos producidos por bacterias que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de otros miembros de la misma especie productora o miembros de distintos géneros bacterianos y se ha

observado que algunas de estas moléculas poseen mayor actividad que los péptidos antimicrobianos producidos por los eucariontes. (López *et al.*, 2008)

Estos péptidos presentan una serie de propiedades bioquímicas comunes, como lo son la sensibilidad a la acción de enzimas proteolíticas, ya que todas las bacteriocinas se inactivan por una o más enzimas proteolíticas, incluyendo aquellas de origen pancreático (tripsina y  $\alpha$  quimotripsina), y algunas de origen gástrico (pepsina); su termorresistencia, es una característica que parece estar relacionada con su estructura molecular, normalmente compuesta por péptidos pequeños que no presentan estructura terciaria. No obstante, otras bacteriocinas, en su mayor parte producidas por lactobacilos, son termolábiles; las mismas poseen un mayor peso molecular y probablemente una estructura molecular más compleja. Por último, estos péptidos son generalmente estables a pH ácido o neutro y son activos en un amplio rango de pH entre 3.0 y 9.0 e inclusive se ha descrito tolerancia a valores de pH extremos, entre 1.0 y 2.0 y entre 11.0 y 12.0. (Tonarelli y Simonetta, 2014)

Las bacteriocinas tienen un potente efecto antagónico contra patógenos clínicos importantes y se usan ampliamente como agentes antimicrobianos potenciales como conservadores de alimentos. (Ashokkumar *et al.*, 2011)

Entre las bacteriocinas más representativas, se encuentra la nisina, un péptido de 34 aminoácidos y de bajo peso molecular (inferior a 5 kDa) producido por *Lactococcus lactis*. Es utilizada como conservador de alimentos y la única reconocida por la FDA con la categoría GRAS (*Generally Recognized As Safe*). No requiere de un receptor unido a la membrana ya que reconoce la composición fosfolipídica de la célula. (Dolz, 2008)

El potencial antimicrobiano de las bacteriocinas es utilizado en la agricultura, terapias y la conservación de alimentos. En la actualidad, se ha comercializado una película de plástico con base de soya que contiene nisina y ácido láurico para controlar el crecimiento de las esporas de *Listeria*. (Ahmad *et al.*, 2017)

Uno de los enfoques más prometedores en el control de la mastitis es el uso de péptidos antimicrobianos. Wipe Out® es un medicamento profiláctico que incorpora la nisina en una toallita húmeda para la preparación de la ubre de la vaca antes del ordeño y Mast Out® es una suspensión con nisina para el tratamiento de la mastitis en vacas que ha sido presentado recientemente para su aprobación por la FDA. (Dorit *et al*, 2016 y Ahmad *et al.*, 2017)

Estos péptidos poseen mecanismos de acción diferentes a los antibióticos convencionales con espectros de acción reducidos o amplios, lo cual ofrece la posibilidad de utilizarlos en la inhibición del crecimiento de bacterias patógenas de humanos y animales, incluyendo aquellas bacterias resistentes a los antibióticos convencionales. (López *et al.*, 2008)

### **Resistencia antimicrobiana**

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) ha surgido como uno de los principales problemas de salud pública del siglo XXI que amenaza la prevención y el tratamiento efectivo de una gama cada vez mayor de infecciones causadas por bacterias, parásitos, virus y hongos que ya no son susceptibles a los medicamentos comunes usados para tratarlos. El problema de la RAM es especialmente urgente en relación con la resistencia a los antibióticos en las bacterias. (Prestinaci, Pezzotti y Pantosti, 2015)

La resistencia adquirida es el resultado de la alteración de la fisiología y la estructura de las células a causa de cambios en la composición genética habitual de un microorganismo. Los mecanismos de resistencia adquirida están codificados en forma genética, los métodos de adquisición son básicamente los mismos que permiten el intercambio de genes. Por lo tanto, puede adquirirse por:

- Mutaciones genéticas exitosas.

- Adquisición de genes de otros microorganismos por medio de mecanismos de transferencia genética: conjugación, transformación y transducción. (Forbes *et al.*, 2009)

El uso excesivo de antibióticos impulsa claramente la evolución de la resistencia. En muchos países, los antibióticos no están regulados y están disponibles sin receta médica. Esta falta de regulación da como resultado, antibióticos de fácil acceso, abundantes y baratos. La capacidad de comprar dichos productos en línea también los hizo accesibles en países donde los antibióticos están regulados.

La resistencia se ve reforzada por el uso de antibióticos para promover el crecimiento animal y prevenir enfermedades en fábricas y granjas saturadas. Alrededor de 30 antibióticos diferentes se han utilizado en alimentos y agua para animales. En la actualidad, más del 50% de los antibióticos fabricados se utilizan para evitar enfermedades en animales para consumo humano y promover el crecimiento animal. (Martens *et al.*, 2017)

Las nuevas estrategias que se están explorando para combatir la resistencia incluyen: modificar antibióticos viejos en clases completamente nuevas, combinar antibióticos, suplementar antibióticos con adyuvantes y buscar nuevos antibióticos en la naturaleza. (Martens *et al.*, 2017)

El desarrollo de nuevos antibióticos por parte de la industria farmacéutica, había sido una estrategia eficaz para combatir bacterias resistentes en el pasado. En los últimos años, de las 18 compañías farmacéuticas más grandes, 15 abandonaron el campo de la investigación en nuevos antibióticos. (Ventola, 2015)

Las razones aducidas por la industria para explicar su desinterés en el desarrollo de nuevos antibióticos son de naturaleza estrictamente económica, y la principal entre ellas es la baja rentabilidad de la inversión en este campo. (Moncayo, 2014)

El desarrollo de antibióticos ya no se considera una inversión económicamente acertada para la industria farmacéutica. Debido a que los antibióticos se usan

durante períodos relativamente cortos, no son tan rentables como los medicamentos para tratar enfermedades crónicas, como la diabetes, los trastornos psiquiátricos, asma, o reflujo gastroesofágico. (Martens *et al.*, 2017)

## **2. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la producción de sustancias antimicrobianas en cepas presentes durante el proceso de compostaje.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

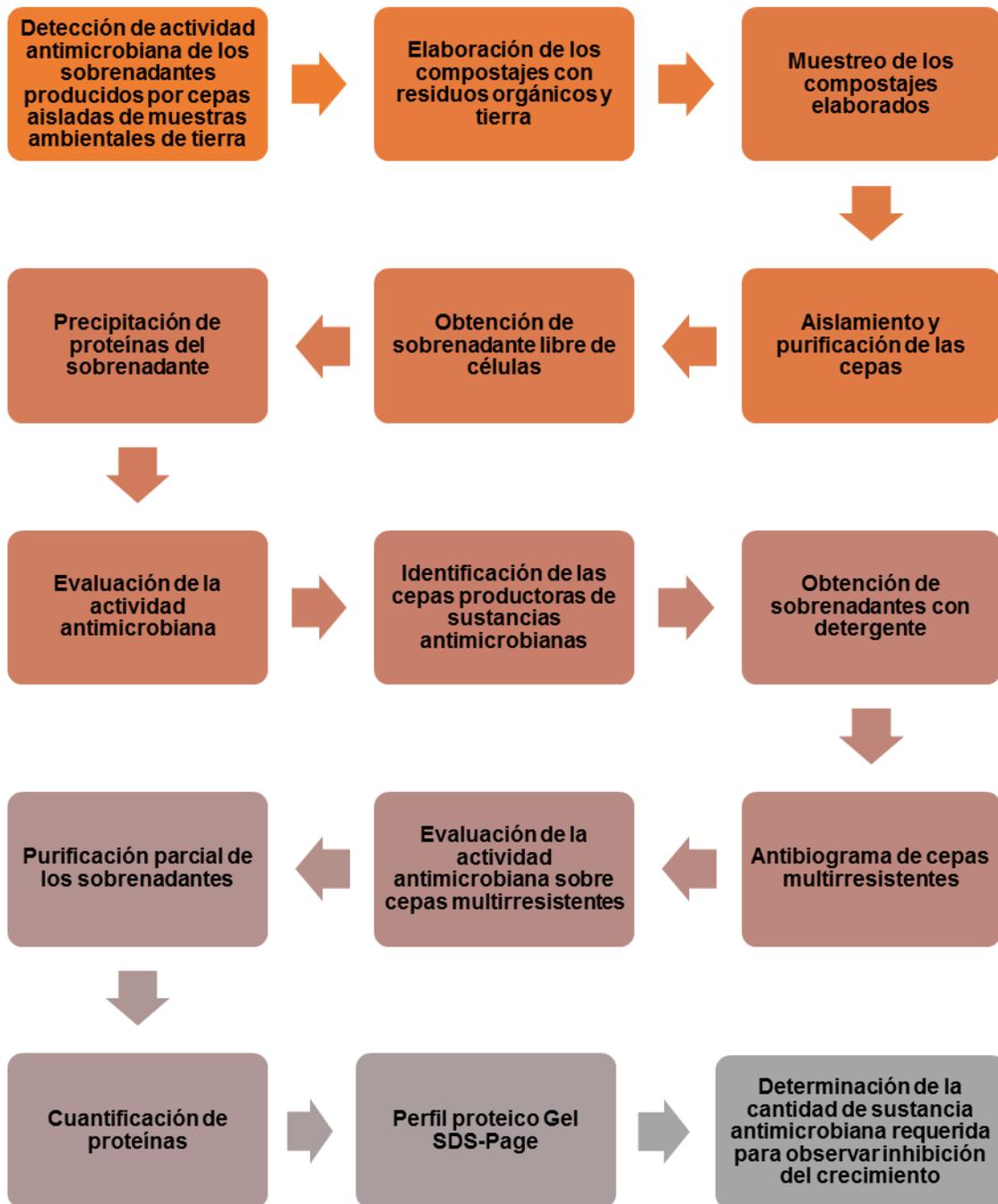
- Aislamiento de cepas presentes en el proceso de compostaje.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes producidos por las cepas aisladas de los compostajes sobre cepas indicadoras.
- Identificación de las cepas aisladas que demuestren tener actividad.
- Purificación parcial de los sobrenadantes con actividad antimicrobiana y su evaluación en cepas multirresistentes.
- Determinar si los sobrenadantes obtenidos tienen sustancias antimicrobianas de naturaleza proteica.

## **3. HIPÓTESIS**

Si existen microorganismos que durante el compostaje se afectan entre sí, entonces habrá bacterias productoras de sustancias antimicrobianas capaces de inhibir el crecimiento de las bacterias indicadoras y multirresistentes.

## 4. METODOLOGÍA

Diagrama de flujo



## METODOLOGÍA

### **Elaboración de los compostajes y estudio microbiológico de las cepas obtenidas del proceso.**

Para el composteo casero se utilizó un bote de plástico en disposición vertical con tapa no hermética, se realizaron orificios alrededor y en la base del contenedor con una broca de 3/16" (para permitir el flujo de aire), además de una abertura lateral para los muestreos. De acuerdo a *Cogger et. al* 1999, el sistema de bote ayuda a impedir la entrada de insectos y animales indeseados, en este se colocan los componentes (suelo, estiércol, residuos y agua) y se tapa el contenedor en espera de que se realice la descomposición de los residuos. En total se prepararon 4 compostajes, en ninguno se agregó estiércol y la composición de cada uno de los compostajes se describe detalladamente a continuación.

Para la elaboración de los compostajes se utilizó una de las muchas formas de preparar la mezcla a compostar. La distribución de los materiales orgánicos se realizó en capas, intercambiando el material rico en carbono (hojas secas) y el rico en nitrógeno (material verde) con el fin de conseguir una adecuada relación entre el carbono y el nitrógeno, temperatura y humedad. (Román *et al.*, 2013)

Se aplicaron capas de tierra de no más de una pulgada para asegurar la inoculación de microorganismos involucrados en la descomposición y reducir la lixiviación de nutrientes minerales, como el potasio, liberados durante la descomposición. Esos microorganismos que ya están en el suelo y en los materiales orgánicos son muy eficientes en la descomposición de los desechos por lo que no es necesario agregar un inóculo comercial. (Wayne *et al*, 2015)

En el **compostaje I** se agregó dentro del bote una capa delgada de 100 g de tierra de invernadero (que fue estudiada previamente y en la que no se detectaron cepas productoras de sustancias antimicrobianas), 50 g hojas secas en el fondo del contenedor, seguido de una capa gruesa (10 cm de alto) de residuos orgánicos compuestos por las cáscaras de papa, zanahoria, hojas de elote, apio, alfalfa,

hierbabuena y cáscara de chícharos. Las capas se humedecieron con un volumen total de 250 mL de agua en rocío y se continuó poniendo capas alternas. (Arredondo, 2014 y Wayne *et al*, 2015)

Para el **compostaje II**, se utilizó otro contenedor se agregó la capa delgada de tierra y en seguida la capa gruesa de residuos orgánicos de hojas secas de árbol de guayaba y de níspero, restos de nopal, cáscaras de papa, manzana y jícama. De la misma forma se humedeció cada sección mientras se estratificaban las capas.

En el tercer compostaje, se agregó la tierra, y los residuos orgánicos de hojas y flores secas, cáscara de zanahoria, chayote y jícama, de la misma manera que en los anteriores y se denominó **compostaje III**.

El **compostaje IV** se preparó agregando tierra y residuos de cebolla, hojas secas, papa y cáscara de huevo. En la tabla 3 se resumen los residuos orgánicos que se utilizaron para el proceso de compostaje.

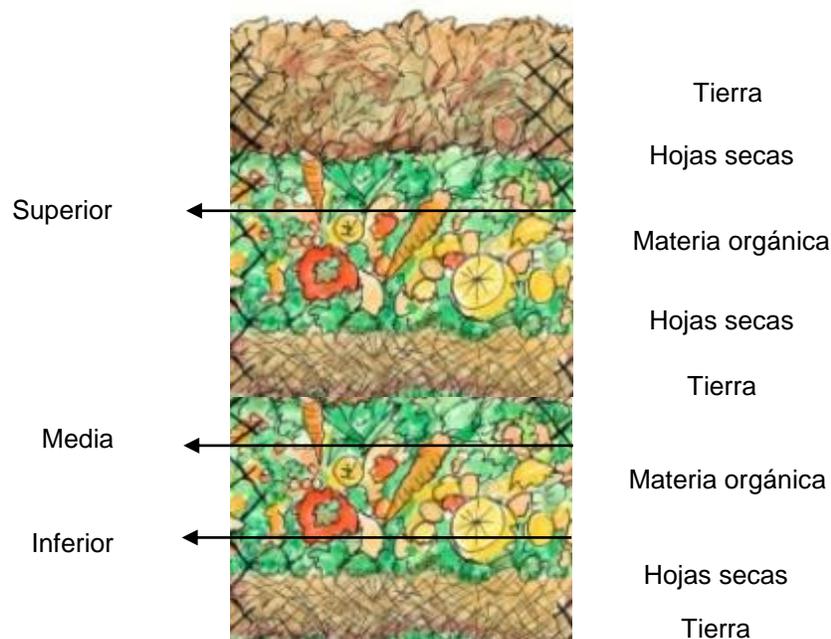
Los diferentes compostajes se mantuvieron en el laboratorio en una zona sombreada, a una temperatura alrededor de 25-28 °C y se colocaron en posición vertical sobre pequeños bloques de madera evitando tapar los orificios de la base del contenedor y así permitir la circulación del aire en el fondo.

**Tabla 3. Residuos orgánicos utilizado en los compostajes elaborados en el laboratorio**

<b>Compostaje</b>	<b>Materia orgánica</b>
<b>I</b>	Hojas secas, cáscaras de papa, zanahoria, hojas de elote, apio, alfalfa, hierbabuena y cáscara de chícharos.
<b>II</b>	Hojas secas de árbol de guayaba y de níspero, cáscaras de papa, manzana y jícama, restos de nopal.
<b>III</b>	Hojas y flores secas, cáscara de zanahoria, chayote y jícama.
<b>IV</b>	Hojas secas, cebolla, cáscara de huevo y papa

Después de la elaboración de cada compostaje, se dejó reposar durante 30 días tratando de mantener la temperatura y humedad. A partir del día 48 se realizó el primer muestreo que consistió en tomar muestras a lo largo de cada una de las tres zonas de los compostajes. En la Imagen 2 se muestra la distribución de los materiales y las 3 zonas que corresponden a la parte superior, media e inferior.

Después del primer muestreo se realizó un segundo el día 55, y se continuó muestreando a 62, 76, 90 y 104 días de la misma forma que se describió anteriormente. A partir de estos se realizaron los estudios microbiológicos de las diferentes muestras obtenidas del compostaje y de cada una se trataron 1 g en 3 mL de solución salina estéril.



**Imagen 2. Distribución de los materiales y zonas que constituyen cada muestreo: superior, media e inferior (Modificado de <http://www.keywordbasket.com>)**

## **Detección de actividad antimicrobiana en muestras ambientales de tierra y obtenidas del compostaje.**

Se recolectaron diferentes muestras de tierra provenientes del invernadero del Jardín Botánico, UNAM. Los muestreos se realizaron de la superficie del suelo y se trasladaron hasta el laboratorio en bolsas de plástico herméticas.

El estudio microbiológico de la tierra de invernadero inició al agregar 1 g de tierra en 9 mL de solución salina estéril; mientras que, las muestras provenientes del compostaje se agregó la misma cantidad en 3 mL de solución salina estéril. Se mezcló por inversión hasta disolver los agregados y una vez que la muestra sedimentó, se tomó una asada del sobrenadante y se inoculó en placas de agar nutritivo, que se incubaron durante 24 h a 37°C.

Después de la incubación, se apreció a simple vista la morfología de los diferentes grupos microbianos que se desarrollaron, se tomaron aleatoriamente algunas de las colonias. Posteriormente, se inocularon en 3 mL de caldo Luria incubándose 24 h a 37°C.

## **Aislamiento y purificación de las cepas**

La tinción de Gram permitió clasificar a las bacterias y seleccionar el medio de cultivo. Las muestras con bacilos Gram negativos se sembraron en agar MacConkey y las cepas Gram positivas en agar sal-manitol, en ambos casos las placas se incubaron a 37°C durante 24 h. Las muestras con microorganismos Gram negativos y positivos se sembraron en ambos medios. A través de pases sucesivos se obtuvieron cultivos puros y se describieron las características macroscópicas y microscópicas de las colonias aisladas.

## **Obtención de sobrenadante libre de células**

Las cepas aisladas y puras se resembraron inoculando 150 µL de cada una en 3 mL de caldo Luria y se incubaron a 37°C para obtener un cultivo joven de 24 h.

Se inoculó 200  $\mu$ L del cultivo joven en matraces Erlenmeyer con 30 mL de caldo Luria, se incubaron con agitación constante de 80 rpm a una temperatura de 37 °C.

Al pasar 6 días de incubación, se tomaron alícuotas de 7 mL y se centrifugaron a 12 000 rpm por 5 min para descartar las células. El sobrenadante libre de células se transfirió a un tubo cónico cuidando no remover el botón celular.

### **Precipitación de proteínas en el sobrenadante**

Para la clarificación del sobrenadante se agregó acetona en una proporción (1:1), se mezcló por inversión con el sobrenadante crudo hasta observar el líquido homogéneo y se almacenaron en congelación a -18°C durante la noche. Después, se centrifugaron a 6 000 rpm en una centrifuga clínica, se descartó el sobrenadante y el botón fue resuspendido en buffer de fosfatos pH 7.

### **Evaluación de la actividad antimicrobiana**

Se activaron en 3 mL de caldo Luria las siguientes cepas indicadoras: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 53916, *Salmonella enterica* Typhi ATCC 19430 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Tras 24 h de incubación a 37°C se obtuvieron cultivos con una densidad celular de  $1 \times 10^8$  células por mililitro.

Empleando el método de difusión en agar en disco Kirby-Bauer se determinó si los sobrenadantes obtenidos contenían sustancias antimicrobianas. A partir de los cultivos jóvenes de las cepas indicadoras, con ayuda de un aplicador de algodón estéril se sembró masivamente una densidad celular de  $1 \times 10^6$  células por mililitro en placas de agar Müller-Hinton. Seguidamente, se colocaron discos de papel filtro estériles impregnados con los sobrenadantes, se presionaron para asegurar contacto con la superficie del agar y las placas se invirtieron para incubarse a 37°C.

La lectura de las placas se realizó 24 h después, tomando en cuenta el área donde se observó inhibición y se midió el diámetro de los halos en milímetros formados por la difusión de los sobrenadantes.

### **Características macroscópicas y microscópicas**

La observación macroscópica de las colonias se realizó en agar MacConkey y agar sal-manitol, se sembraron por cuadrante radial y se incubaron a 37 °C. Al concluir la incubación, se describió: tamaño, color y borde.

La tinción de Gram permitió confirmar la pureza de los cultivos, identificar la morfología de las cepas como células individuales al observar su forma, agrupación y afinidad por los colorantes.

### **Identificación y conservación de las cepas productoras de sustancias antimicrobianas.**

La identificación de las cepas Gram negativas se realizó a través del sistema de pruebas bioquímicas API 20E, Biomérieux. Las cepas Gram positivas se identificaron a través de pruebas bioquímicas tradicionales.

Para la conservación de las cepas, se centrifugó 7 mL del medio de cultivo a 12000 rpm y el botón se resuspendió en 1 mL de medio de cultivo Luria con glicerol al 25% y se almacenaron en congelación. Al reactivar las cepas, se evaluó una vez más la actividad antimicrobiana utilizando la metodología de Kirby-Bauer.

### **Eficiencia del detergente para liberar la sustancia antimicrobiana**

A partir de los cultivos jóvenes de 24 h se inoculó 200 µL de cada cepa productora de sustancias antimicrobianas en matraces Erlenmeyer con 20 mL de caldo Luria y se incubaron con agitación constante de 80 rpm a una temperatura de 37 °C.

Transcurridos 4 días se agregó digitonina al 1% y 24 h después se tomó una alícuota de 7 mL del medio de crecimiento, se centrifugaron a 12000 rpm por 5 min para descartar las células. Los sobrenadantes se concentraron con acetona en una proporción (1:1) para evaluar la actividad antimicrobiana.

## **Selección de cepas multirresistentes**

Se utilizaron 5 cepas multiresistentes provenientes de pie diabético. Estas cepas pertenecen al cepario del laboratorio y ya habían sido aisladas y caracterizadas previamente.

Para su activación se tomaron 150  $\mu$ L de inóculo de cada cepa, se resembraron en caldo Luria con antibiótico y se incubaron 24 h a 37 °C. Se realizaron resiembras sucesivas a lo largo de una semana y la resistencia antimicrobiana de las cepas se corroboró a través de un antibiograma, Anexo I.

Las tres cepas Gram positivas fueron resistentes a 9 y 10 antibióticos de un total de 14 antibióticos utilizados que fueron: amikacina, amoxicilina, bacitracina, cefazolina, cefepima, cefotaxima, cefprozilo, cefuroxima, clindamicina, eritromicina, estreptomina, gatifloxacina, penicilina y tetracilina.

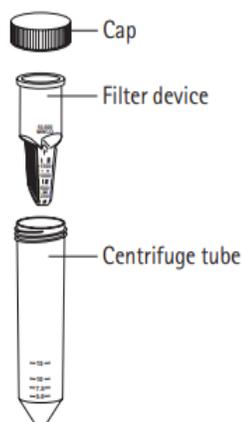
La resistencia de las cepas Gram negativas se comprobó utilizando 17 antibióticos diferentes de los cuales las cepas mostraron resistencia a 6 y 13. Los antibióticos utilizados fueron: bacitracina, ácido osolínico, amikacina, amoxicilina, cefazolina, cefepima, cefotaxima, cefprozilo, ceftazidima, cefuroxima, eritromicina, estreptomina, gatifloxacina, gentamicina, ofloxacina, penicilina y tetraciclina.

## **Purificación parcial de los sobrenadantes crudos**

Se inocularon las cepas productoras de sustancias antimicrobianas del compostaje II, III y IV para la obtención de los sobrenadantes. A partir de estos cultivos se obtuvieron los sobrenadantes crudos y se centrifugaron a 12000 rpm para retirar las células.

La purificación parcial de los sobrenadantes sin concentrar se realizó agregando 5 veces un volumen de 4 ml en el dispositivo de filtrado Amicon® Ultra-15 10K Centrifugal Filter Devices con un poro de 3 y 10 kDa (Imagen 3). El dispositivo se centrifugó a 6000 rpm hasta reducir el volumen a 250  $\mu$ L, este volumen retenido por el poro constituyó la fracción de soluto concentrada con un tamaño de partícula mayor a 10 kDa. La fracción que atravesó el filtro tenía un peso

molecular inferior y se depositaba en el tubo de centrifuga, más tarde esta fracción se agregó nuevamente en un dispositivo de filtrado con un tamaño de poro de 3 kDa. Las tres fracciones obtenidas se evaluaron en las cepas multirresistentes y se almacenaron en refrigeración a 4°C.



**Imagen 3. Dispositivo de filtrado (EMD Millipore Corporation. (2014) Billerica, MA, U.S.A.)**

### **Evaluación de la actividad antimicrobiana sobre cepas multirresistentes**

Se utilizó la metodología explicada para la evaluación de la actividad antimicrobiana en cepas indicadoras. Los sobrenadantes se evaluaron en dos variantes: crudos y las fracciones del sobrenadante semi-purificadas obtenidas de los filtros de 3 y 10 kDa sobre las cepas multirresistentes.

### **Cuantificación de proteínas por el método de Lowry**

La cuantificación de proteínas en los sobrenadantes crudos se realizó con el método de Lowry. Se realizó una curva estándar con BSA para obtener la concentración de proteínas en los sobrenadantes crudos, los reactivos y cantidades utilizados se muestra en el Anexo II.

### **Patrón proteico del sobrenadante de las cepas aisladas productoras de sustancias antimicrobianas**

Se realizaron geles de poliacrilamida de 1 mm de grosor, compuestos por un gel separador al 12% de una mezcla de acrilamida y bis-acrilamida y un gel concentrador al 4% de acrilamida/bis-acrilamida.

Para la preparación de la muestra se tomaron 20  $\mu\text{L}$  de cada sobrenadante y se agregaron en microtubos con 10  $\mu\text{L}$  de buffer de carga (12.5% de amortiguador de gel, 1% SDS, 15% glicerol, 0.5% azul de bromofenol, 10 mM de DTT y 0.1% de betamercaptoetanol), se calentaron durante 5 mín a 95 °C previamente a la carga en el gel.

La electroforesis se realizó en cámaras Mini-PROTEAN® Tetra Cell Systems, Bio Rad con los siguientes amortiguadores de corrida: para el cátodo (Tris 0.1 M, Tricina 0.1 M y SDS 0.1% pH 8.25) y amortiguador de ánodo (Tris-HCl 0.2 M pH 8.93); las muestras se corrieron a 120 V durante 1.5 h

El gel fue teñido con una solución al 0.2% del colorante azul de Coomassie R250 Research Organics con 47% de etanol y 10% de ácido acético, durante toda la noche. La solución teñidora se decantó, se lavó con agua destilada y se vertió solución desteñidora con 50% metanol y 7.5% de ácido acético hasta obtener el contraste deseado. Para su análisis se midió la distancia recorrida por las bandas, se aproximó el peso molecular y el gel fue escaneado. Ver Anexo III

### **Determinación de la cantidad requerida de sustancia antimicrobiana para producir inhibición del crecimiento de las cepas multirresistentes**

Una vez más se empleó el método descrito de difusión en agar en disco Kirby-Bauer; se modificó la incubación a temperatura ambiente y se monitoreó el crecimiento a partir de las 16 h. En esta prueba se inocularon las cepas multirresistentes y se colocaron 8 discos de papel, en los que se impregnaron volúmenes de 10  $\mu\text{L}$ , 20  $\mu\text{L}$ , 30  $\mu\text{L}$ , 40  $\mu\text{L}$ , 50  $\mu\text{L}$ , 60  $\mu\text{L}$ , 70  $\mu\text{L}$  y 80  $\mu\text{L}$  de las fracciones que demostraron tener actividad.

## 5. RESULTADOS Y ANÁLISIS

### Detección de actividad antimicrobiana de los sobrenadantes producidos por cepas aisladas de muestras ambientales de tierra

El desarrollo experimental comenzó con el aislamiento de cepas presentes en las muestras de tierra A, B, C y D (provenientes del invernadero del Jardín Botánico UNAM) para determinar si eran capaces de producir sustancias antimicrobianas sin las condiciones propias del proceso de compostaje.

A simple vista se apreció la morfología colonial en agar nutritivo de los diferentes microorganismos y se eligieron aleatoriamente algunas colonias.

Durante la observación microscópica se observaron en la tierra A, B y C bacilos cortos Gram negativos; mientras que en la tierra D había bacilos largos y cortos Gram negativos (Imagen 4). Seguidamente, las cepas se purificaron e inocularon en medio Luria para la obtención de los sobrenadantes crudos.

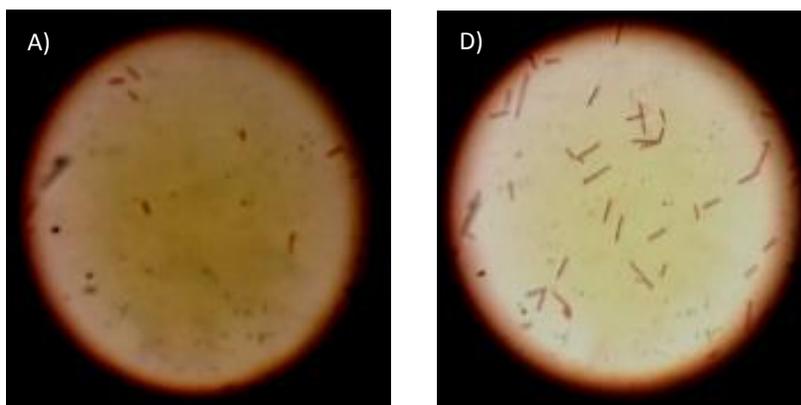


Imagen 4. Observación microscópica de muestras de tierra A y D. Aumento x1000

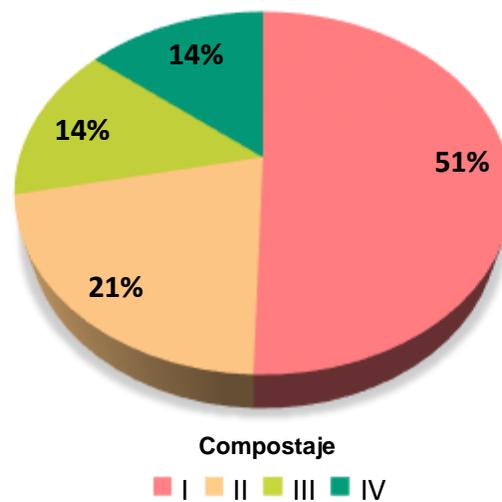
Al evaluar la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes crudos sobre microorganismos Gram positivos y Gram negativos, ninguno mostró dicha actividad contra las cepas indicadoras: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 53916, *Salmonella enterica* Typhi ATCC 19430 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Los compostajes se elaboraron con la tierra A y D con la finalidad de aumentar la diversidad microbiológica y al mismo tiempo la competencia ya que su microbioma mostró menor similitud que el de las cepas de tierra B y C.

### Seguimiento microbiano del compostaje

En total se aislaron y purificaron 94 cepas provenientes de 4 compostajes diferentes. La mayoría de los aislados que demostraron actividad antimicrobiana fueron cepas Gram negativas.

Se encontró que 14 cepas aisladas de los compostajes inhibieron el crecimiento de las cepas indicadoras. El 51% de las cepas con actividad antimicrobiana pertenecieron al compostaje I, el 21% corresponde al compostaje II y el 14% a los compostajes III y IV respectivamente. (Gráfica 1)



Gráfica 1. Porcentaje de bacterias aisladas de cada compostaje

### Observación macroscópica

En un compostaje se distinguen tres etapas principales con base en los aumentos de temperatura que se presentan a lo largo del proceso, si bien en este trabajo no

se determinó la eficiencia del proceso es posible hacer una aproximación de estas fases a partir de los días muestreados.

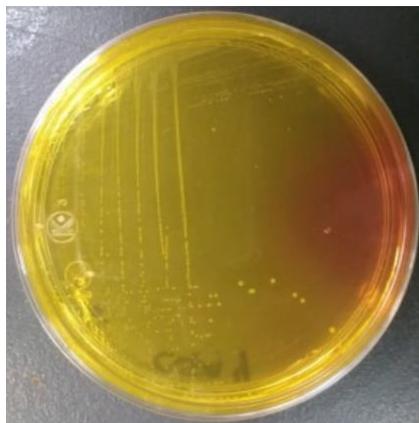
La fase mesófila, tiene una duración corta (entre 2 y 8 días) que corresponde al período de aclimatación de los microorganismos a su nuevo medio y el inicio de la multiplicación y colonización de los residuos. (Pérez, 2008 y Román *et al.*, 2013)

De acuerdo con las condiciones experimentales y metodología utilizada en el presente estudio sólo se aislaron bacterias mesófilas que podrían provenir de esta fase ya que predominan bacterias como las que pertenecen a las familias *Pseudomonaceae*, *Erythrobacteraceae*, *Comamonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Streptomycetaceae*, y *Caulobacteraceae* entre otras, las cuales crecen entre 15°C y 35°C. (Sánchez *et al.*, 2017)

Dependiendo del material inicial, la fase termófila puede durar una semana en sistemas acelerados y hasta un mes o dos en sistemas de fermentación lenta. (Pérez, 2008) El inicio de los muestreos se realizó a 48 días que corresponderían a esta fase.

A 48 y 55 días de iniciado el proceso, se obtuvieron la mayor cantidad de colonias en los medios de cultivo.

El desarrollo en agar MSA fue escaso y, en ocasiones, fue necesario incubar las placas varios días para permitir el crecimiento de las colonias. (Imagen 5)

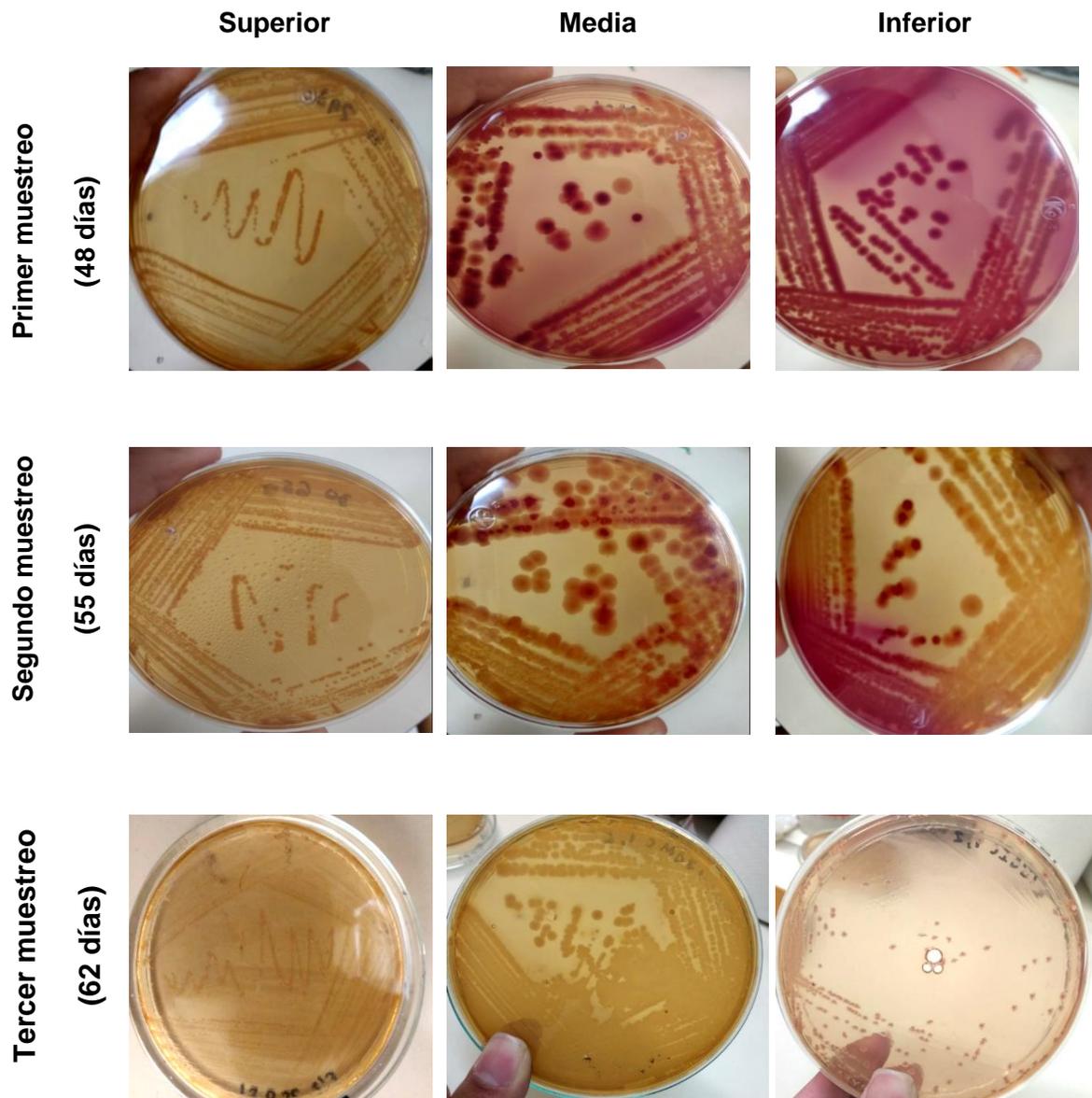


**Imagen 5. Aislamiento de microorganismos Gram positivos.**

Después de incubar las placas de agar MacConkey se observó la morfología de las colonias que se aislaron. A los 48 días se obtuvo que de la parte superior se aislaron cepas lactosa negativas; de la parte media, cepas lactosa negativas y positivas; y de la parte inferior, cepas lactosa positivas (Imagen 6). Algunas de estas cepas demostraron actividad antimicrobiana frente a las cepas indicadoras, sin embargo, los diámetros de inhibición en este muestreo fueron menores en comparación con el siguiente en el día 55.

A 55 días del proceso, se detectó la mayor actividad antimicrobiana y se observó un mayor número de cepas incoloras en el medio de cultivo (Imagen 6). Desde entonces se observó una disminución gradual de las cepas aisladas en los medios selectivos y diferenciales utilizados. En el pico de calentamiento, las poblaciones bacterianas mesófilas disminuyen de  $10^7$  a  $10^5$  (ufc  $g^{-1}$ ) desde la fase termófila hasta la fase de enfriamiento y maduración. (Chandna *et al.*, 2013)

En el tercer muestreo (62 días) se observó que probablemente ocurrió una sucesión microbiana, no se observan cepas lactosa positivas y ya no se detectaron cepas productoras de sustancias antimicrobianas. Es posible que en esta transición el incremento de la temperatura provocará que los microorganismos mesófilos llegaran a ser menos competitivos y fueran reemplazados por microorganismos termófilos. Este reemplazo de microorganismos generalmente se asocia a las condiciones generadas por la población anterior (Imagen 6). Las características mencionadas también se manifestaron en los compostajes II, III y IV.



**Imagen 6. Morfología macroscópica de los cultivos obtenidos en medio MacConkey durante el compostaje**

En el último muestreo (104 días) se obtuvieron el menor número de colonias, lo que posiblemente corresponde a la maduración; ésta se caracteriza por un aumento en la proporción de hongos y disminución del número de bacterias. (Román *et al.*, 2003) A lo largo del proceso no se detectaron problemas como la aparición de moscas, hormigas o malos olores. Las características fisicoquímicas

y microbiológicas del producto final, así como la eficiencia del proceso van más allá del alcance de este proyecto.

Una vez obtenidas las cepas puras de los diferentes compostajes, se evaluaron los sobrenadantes sobre las cepas indicadoras. La morfología de las que demostraron efecto antimicrobiano se describe a continuación en la Tabla 5:

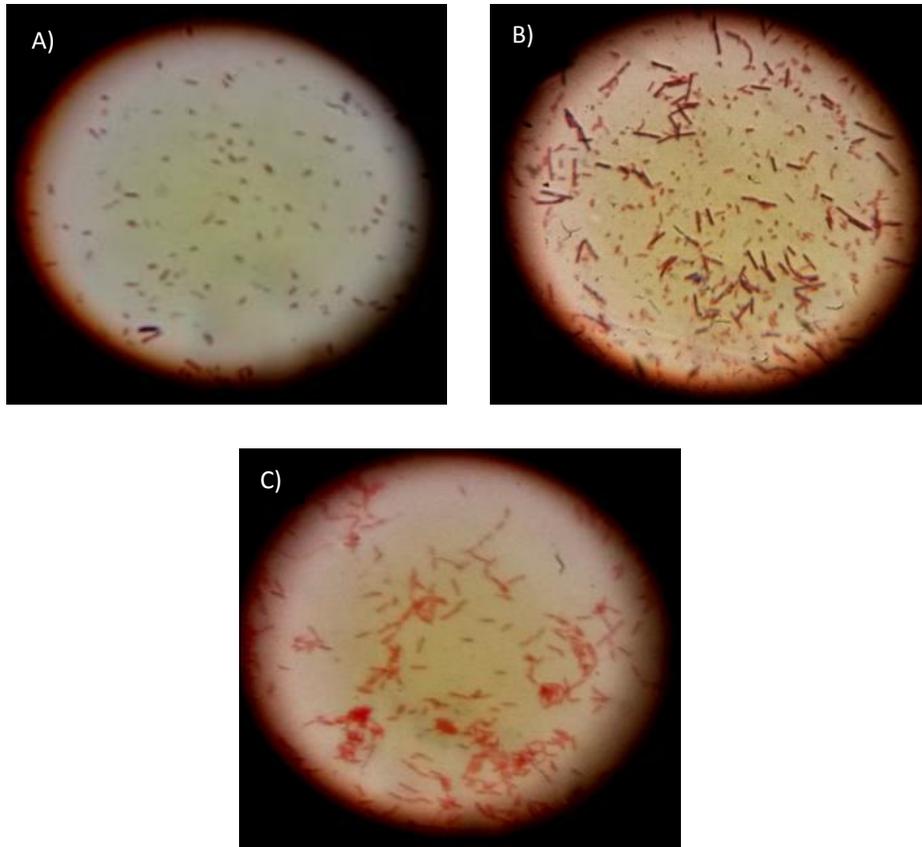
**Tabla 5. Descripción de la morfología colonial de las cepas aisladas en los diferentes compostajes.**

<b>Compostaje</b>	<b>Cepa</b>	<b>Medio</b>	<b>Descripción</b>
<b>I</b>	4	Agar sal-manitol	Colonias puntiformes, circulares, blancas, borde entero
	8	MacConkey	Colonias pequeñas, circulares, incoloras de borde entero
	12	MacConkey	Colonias medianas, circulares, incoloras de borde entero
	13	MacConkey	Colonias grandes, circulares, mucosas, rosas de borde entero
	14	MacConkey	Colonias pequeñas, circulares, incoloras de borde entero
	15	MacConkey	Colonias pequeñas, circulares, rosas de borde entero
	16	MacConkey	Colonias pequeñas, circulares, incoloras de borde entero
<b>II</b>	M/S	MacConkey	Colonias pequeñas, circulares, incoloras de borde entero
	M/M	MacConkey	Colonias medianas, mucosas, rosas, circulares de borde entero
	M/I	MacConkey	Colonias pequeñas, circulares, incoloras de borde entero
<b>III</b>	EIR	MacConkey	Colonias grandes, mucosas, rosas, circulares de borde entero
	EII	MacConkey	Colonias pequeñas, circulares, incoloras de borde entero
<b>IV</b>	#3	MacConkey	Colonias pequeñas, circulares, incoloras de borde entero
	#5	MacConkey	Colonias medianas, rosas, circulares de borde entero

### **Observación microscópica**

Al elaborar el compostaje I con la tierra de invernadero y desechos orgánicos, la composición microbiológica cambió en comparación con las muestras con sólo tierra obtenidas del jardín botánico (Imagen 4 y 7). A través de la tinción de Gram, se observó que las morfologías presentes durante el proceso corresponden a bacilos Gram negativos, cocos y bacilos Gram positivos. En la parte media se encontraba la mayor diversidad de cepas (Imagen 7).

Las cepas que mostraron actividad antimicrobiana pertenecieron a esta comunidad microbiana y sus características se describen en la Tabla 6.



**Imagen 7. Observación microscópica del compostaje I (48 días) parte A) superior, B) media, C) inferior. Aumento x1000**

En los compostajes II, III y IV ocurrió una sucesión de poblaciones similar y también se observaron algunas cepas Gram positivas y en su mayoría bacilos Gram negativos con distintos tamaños: cortos, largos, algunos curvos y otros esporulados. Las cepas cuyo sobrenadante demostró inhibición en las cepas indicadoras también se describen en la Tabla 6.

A lo largo del proceso se siguió modificando el microbioma. En general, a partir del tercer muestreo (62 días) en todas las zonas de los compostajes se observó la ausencia de cocos Gram positivos, y un predominio de bacilos Gram negativos y Gram positivos, lo que posiblemente se debe al espectro de actividad *in vitro* que demostraron las sustancias antimicrobianas producidas por los microorganismos aislados.

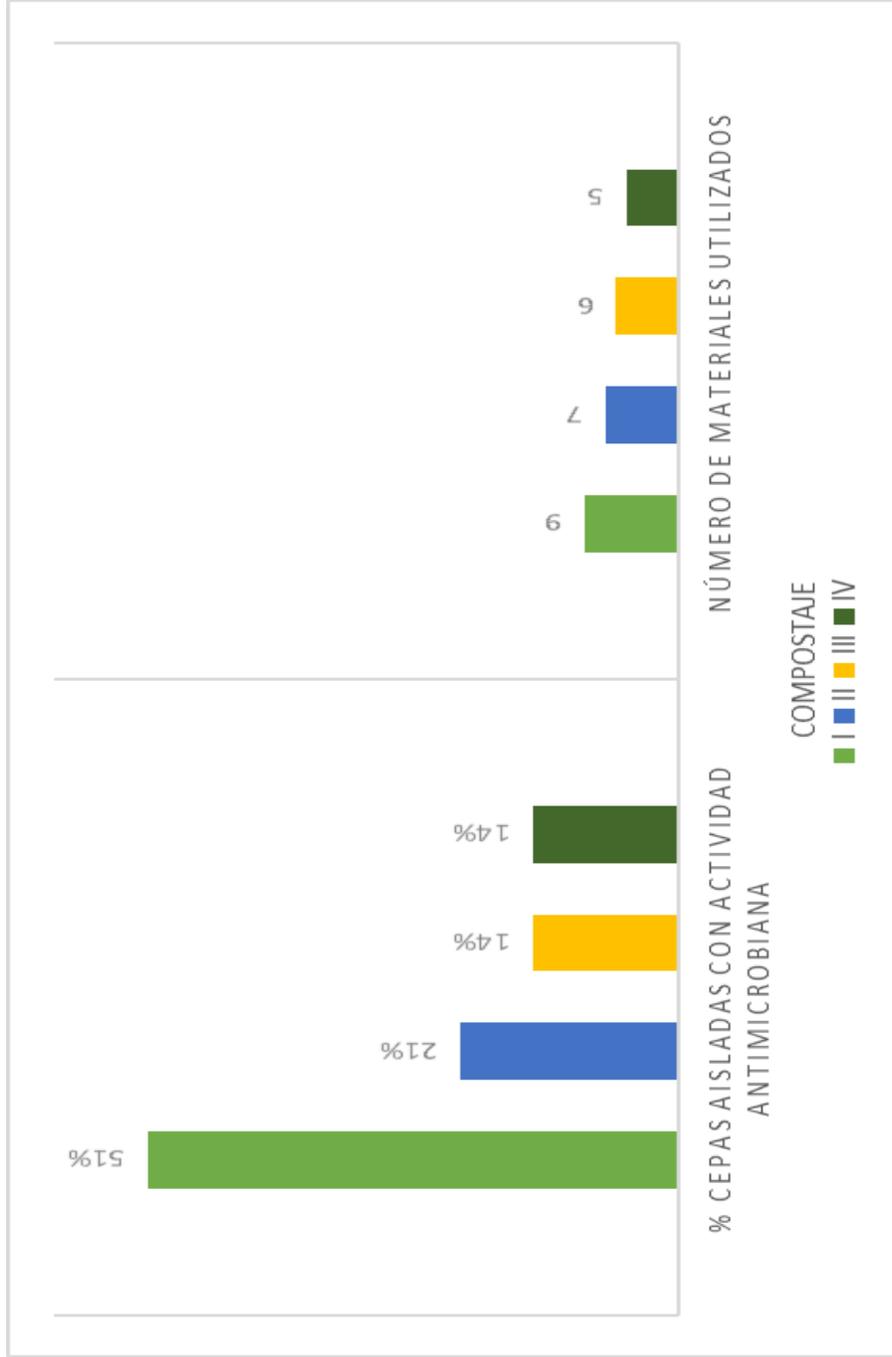
**Tabla 6. Características microscópicas de las cepas con actividad antimicrobiana**

<b>Compostaje</b>	<b>Cepa</b>	<b>Descripción</b>
<b>I</b>	4	Cocos, pequeños, morados sin agrupación
	8	Bacilos, cortos, rojos, sin agrupación
	12	Bacilos, cortos, rojos, sin agrupación
	13	Bacilos, cortos, rojos, sin agrupación
	14	Bacilos, cortos, rojos, sin agrupación
	15	Bacilos, cortos, rojos, sin agrupación
	16	Bacilos, cortos, rojos, sin agrupación
<b>II</b>	M/S	Bacilos, cortos, rojos, sin agrupación
	M/M	Bacilos, cortos, rojos, sin agrupación
	M/I	Bacilos, cortos, rojos, sin agrupación
<b>III</b>	EIR	Bacilos, cortos, rojos, sin agrupación
	EII	Bacilos, cortos, rojos, sin agrupación
<b>IV</b>	#3	Bacilos, cortos, rojos, sin agrupación
	#5	Bacilos, cortos, rojos, sin agrupación

### **Actividad antimicrobiana durante el compostaje**

Debido a los diferentes tipos de residuos utilizados para la elaboración de los compostajes es de esperarse variación en la actividad antimicrobiana entre cada uno.

En la gráfica 2 se muestra que se aíslan mayor número de cepas con actividad antimicrobiana al agregar más materiales al compostaje. Asimismo, se presentaron diferencias en la inhibición: en el compostaje I y II fue bactericida y bacteriostática, mientras en los compostajes III y IV sólo de tipo bacteriostática. (Tabla 7)



**Gráfica 2. Relación de cepas aisladas que presentaron actividad antimicrobiana y materiales utilizados en los compostajes.**

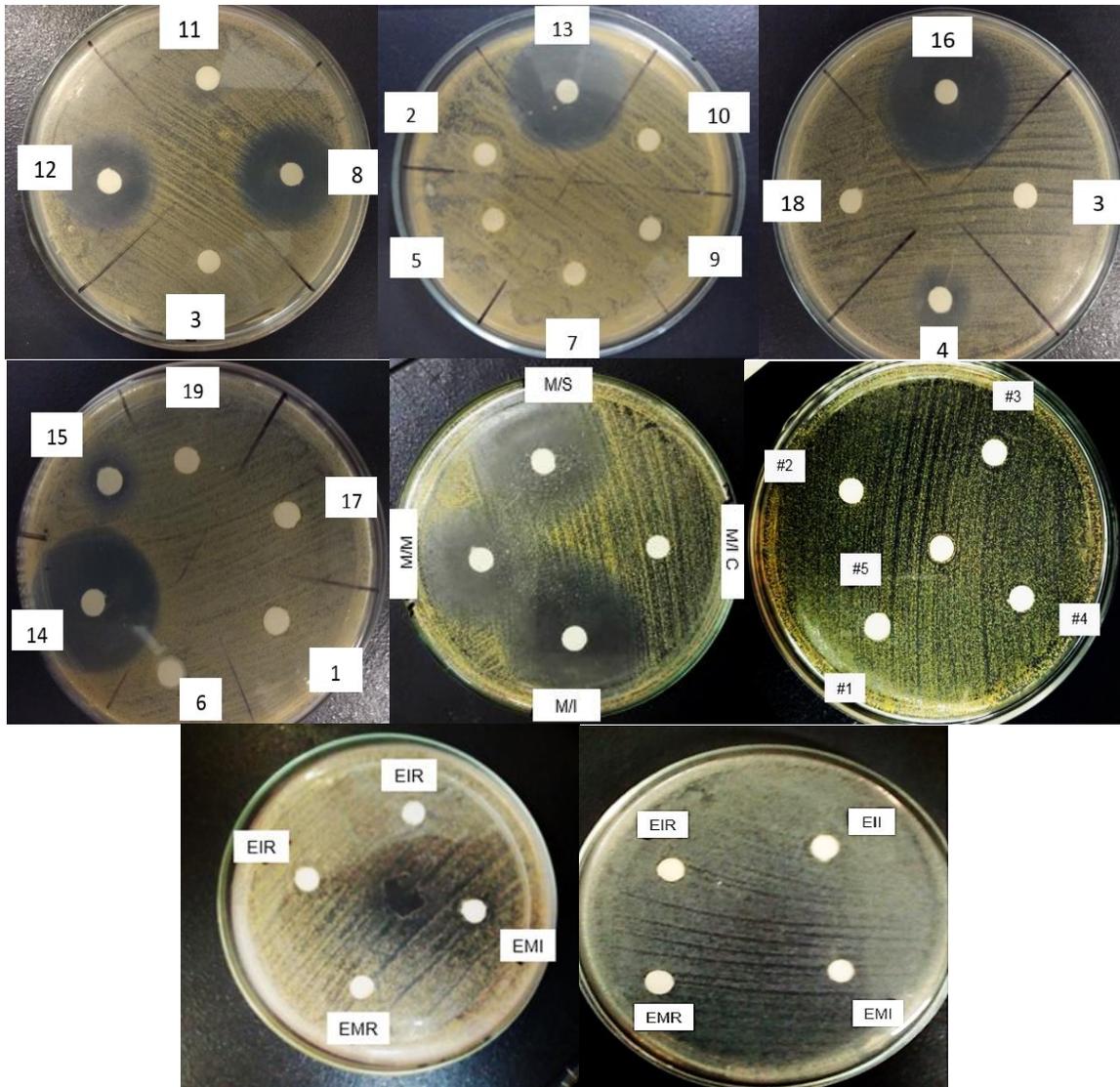
Inicialmente, se evaluó la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes libres de células y estos no mostraron ninguna inhibición. Los resultados podrían relacionarse con la baja concentración de las sustancias en el medio de crecimiento.

En seguida, se precipitaron las proteínas de los sobrenadantes y fueron evaluados en las 4 cepas indicadoras. A continuación, en la Tabla 7, se resumen los resultados obtenidos:

**Tabla 7. Inhibición de las cepas indicadoras obtenida con los sobrenadantes crudos producidos por cepas aisladas del compostaje**

Compostaje	Cepa		Microorganismo indicador			
	Productora		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E.coli</i> ATCC 53916	<i>S. enterica</i> Typhi ATCC 19430	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
I	4	10 mm bacteriostático	-	-	-	-
	8	26 mm bactericida	-	-	-	-
	12	23 mm bactericida	-	-	-	-
	13	32 mm bactericida	-	-	-	-
	14	37 mm bactericida	-	-	-	-
	15	15 mm bacteriostático	-	-	-	-
	16	40 mm bactericida	-	-	-	-
II	M/S	25 mm bactericida	-	-	-	-
	M/M	18 mm bactericida	-	-	-	-
	M/I	28 mm bactericida	-	-	-	-
III	EIR	9 mm bacteriostático	-	-	-	-
	EII	-	-	7 mm bacteriostático	-	-
IV	#3	8 mm bacteriostático	-	-	-	-
	#5	7 mm bacteriostático	-	-	-	-

La difusión de los sobrenadantes mostró dos tipos de inhibición como se muestra en la Imagen 8. Los sobrenadantes provenientes de las cepas 4, 15, #3, #5, EII y EIR presentaron crecimiento dentro de la zona de inhibición. A ésta se le denominó bacteriostática, ya que evita el crecimiento de los microorganismos sensibles de la cepa indicadora, pero no inhibe por completo el desarrollo de todas las células. Por otra parte, se obtuvo inhibición bactericida en donde se observó una zona clara de inhibición. (Imagen 8)



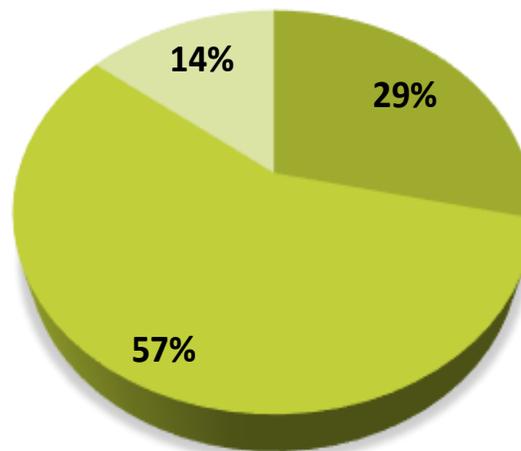
**Imagen 8. Actividad antimicrobiana de los sobrenadantes crudos sobre la cepa indicadora *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y el sobrenadante EII en *Salmonella enterica* Typhi 19430**

Es importante mencionar que la zona de muestreo es un factor que influyó en la capacidad de las cepas de producir sustancias antimicrobianas.

A través de la tinción de Gram se observó que en la parte media había una mayor cantidad de bacterias en comparación con la parte superior e inferior; por lo tanto, el 57% de los microorganismos de interés provienen de esta zona como se representa en la gráfica 3, en seguida la parte superior con el 29% y por último 14% de la parte inferior.

En los compostajes existen zonas en las que los factores son distintos. Por ejemplo, los sobrenadantes del compostaje III fueron producidos por bacterias aisladas de la parte inferior; sin embargo, el efecto antimicrobiano actuó sobre dos microorganismos distintos: *Salmonella enterica* Typhi y *Staphylococcus aureus*.

A pesar de ellos, fue posible aislar bacterias del compostaje I y II con resultados similares sobre el crecimiento del *S. aureus*. La actividad antimicrobiana de los sobrenadantes producidos por las cepas #3 y #5, de la parte media y superior de del compostaje IV, mostraron inhibición bacteriostática sobre la misma cepa indicadora.



**Gráfica 3. Porcentaje de las cepas productoras de sustancias antimicrobianas por zona de muestreo**

### **Eficiencia del detergente para liberar la sustancia antimicrobiana de la membrana de las células**

Al reactivar las cepas y corroborar su actividad antimicrobiana se observó pérdida de la actividad. Por ello, se sembraron las cepas puras una vez más en caldo Luria y se adicionó 1% de digitonina con la finalidad de liberar la sustancia antimicrobiana de la membrana.

Los sobrenadantes se evaluaron nuevamente y se observó una disminución del diámetro de inhibición sobre el crecimiento de *S. aureus* ATCC 25923 (Tabla 8).

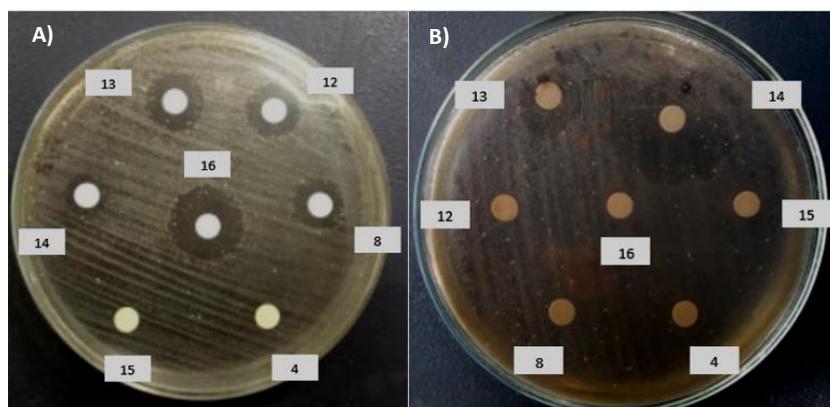
Los sobrenadantes 4 y 15 que habían ocasionado una actividad de tipo bacteriostática perdieron completamente su actividad (Imagen 9).

Por otra parte, con la adición del detergente, se observó que las cepas 13 y 14 presentaron una inhibición bacteriostática en *P. aeruginosa* posiblemente por la presencia de una sustancia antimicrobiana que estaba presente en la membrana de las cepas productoras (Imagen 9).

**Tabla 8. Eficiencia del detergente para liberar la sustancia antimicrobiana.**

Cepas Productoras	Cepas indicadoras			
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E.coli</i> ATCC 53916	<i>S. enterica</i> Typhi ATCC 19430	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
4	-	-	-	-
8	12 mm	-	-	-
12	13 mm	-	-	-
13	15 mm	-	-	15 mm
14	10 mm	-	-	36 mm
15	-	-	-	-
16	20 mm	-	-	-

Considerando que las cepas provienen originalmente de un ambiente de estrés, competitivo y continuamente cambiante, muy distinto al medio en el que se encuentran en aislamiento en el laboratorio, después de algunos meses presentaron pérdida total de la actividad, incluso en presencia del detergente. Por lo tanto, la producción de estas sustancias antimicrobianas podría ser inducida por la presencia de otro microorganismo, estrés por temperatura, pH o algún otro factor relacionado con el compostaje.



**Imagen 9. Eficiencia del detergente. A) Disminución de la actividad de los sobrenadantes en el desarrollo de *S. aureus* B) Inhibición del crecimiento de *P. aeruginosa* ATCC 27853**

## Identificación de las cepas productoras de sustancias antimicrobianas

La cepa 4 fue clasificada mediante la tinción de Gram como cocos Gram positivos, por lo que su identificación se realizó utilizando la prueba de la catalasa para diferenciar entre el género de los estreptococos que no la producen y el género de los estafilococos, microorganismos capaces de convertir el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. (Hobden *et al.*, 2010) Esta prueba resultó positiva.

El género *Staphylococcus* tiene por lo menos 40 especies. Sin embargo, es posible clasificarlos en dos grupos con base en la producción de la coagulasa que se demuestra mediante la incubación de la cepa en plasma produciendo un coágulo de fibrina en unas cuantas horas. (Ray *et al.*, 2011)

Finalmente, mediante esta prueba y algunas otras más se determinó que la cepa 4 pertenece al género *Staphylococcus* y al grupo de Estafilococos coagulasa negativos ECN. (Tabla 9)

**Tabla 9. Identificación de la cepa número 4**

<b>Prueba bioquímica</b>	<b>Resultado</b>
<b>Catalasa</b>	+
<b>Manitol</b>	+
<b>Oxidasa</b>	-
<b>Coagulasa</b>	-
<b>DNAsa</b>	-
<b>Hemólisis</b>	+

En las cepas productoras restantes se observaron bacilos Gram negativos, se utilizó el sistema API 20E, Biomérieux y tras 24 h de incubación a 37°C se realizó la lectura de los resultados. (Tablas 10 y 11)

Tabla 10. Lectura de las pruebas bioquímicas realizadas de las cepas del compostaje I con el sistema API 20E, BioMérieux

Prueba bioquímica	Cepa productora					
	8	12	13	14	15	16
ONPG	+	+	+	+	+	+
ADH	+	-	-	-	+	+
LCD	+	+	+	+	+	+
ODC	-	-	-	+	+	+
CIT	+	+	+	+	+	+
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	+	+
URE	+	+	-	+	+	-
TDA	-	-	-	-	-	-
IND	-	-	-	-	+	-
VP	-	-	-	+	-	-
GEL	+	-	-	+	-	-
GLU	+	+	+	-	-	+
MAN	-	-	-	-	-	+
INO	+	+	+	-	+	-
SOR	+	+	+	+	-	+
RHA	+	+	+	+	+	+
SAC	-	-	+	-	+	-
MEL	+	+	-	-	-	+
AMY	+	+	+	-	+	-
ARA	-	-	-	+	-	+
OX	-	+	-	-	+	-

Tabla 11. Lectura de las pruebas bioquímicas realizadas en el compostaje I, II y III con el sistema API 20E, BioMérieux

Prueba bioquímica	Cepa productora						
	M/S	M/M	M/I	#3	#5	EIR	EII
ONPG	-	+	-	+	+	+	+
ADH	+	+	+	+	+	-	+
LCD	-	-	-	+	-	+	+
ODC	-	+	-	+	-	-	+
CIT	+	+	+	+	+	+	+
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	+
URE	+	-	-	-	-	+	-
TDA	-	-	+	-	-	-	-
IND	-	-	-	-	+	+	-
VP	-	-	-	-	+	-	-
GEL	-	-	-	-	+	-	-
GLU	-	+	-	+	+	+	+
MAN	-	-	-	+	+	+	+
INO	-	-	-	-	-	+	-
SOR	-	+	-	+	+	+	+
RHA	-	+	-	+	-	+	+
SAC	-	+	-	+	+	+	-
MEL	-	+	-	+	-	+	+
AMY	-	+	-	+	-	+	-
ARA	-	-	-	-	+	+	+
OX	+	-	+	-	+	-	-

En algunos casos (\*) no fue posible tipificarlos por lo que se requirió una búsqueda bibliográfica (Tabla 12). La dificultad para la tipificación ya se ha reportado durante la caracterización de microorganismos aislados de muestras ambientales debido a que los sistemas de identificación están diseñados para grupos taxonómicos aislados frecuentemente de muestras clínicas y por ello es posible que no se encuentren cepas provenientes de un ecosistema. (Galván *et al.*, 2017)

**Tabla 12. Identificación de microorganismos productores de sustancias antimicrobianas aisladas durante el proceso del compostaje**

Compostaje	Cepa productora	Microorganismo identificado	Porcentaje de identificación
	4	<i>Staphylococcus sp.</i>	-----
	8	<i>Serratia liquefaciens</i>	100%
	12	<i>Janthinobacterium lividum*</i>	-----
I	13	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. Ozaenae	97.50%
	14	<i>Stenotrophomonas maltophilia*</i>	-----
	15	<i>Pasteurella aerogenes*</i>	-----
	16	<i>Salmonella choleraesuis</i> spp. Arizonae	99.70%
	M/S	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	93.80%
II	M/M	<i>Enterobacter cloacae</i>	100%
	M/I	<i>Pseudomonas aeruginosa*</i>	-----
III	#3	<i>Salmonella choleraesuis</i> ssp Arizonae	68.90%
	#5	<i>Aeromonas hydrophila</i>	66.80%
IV	EIR	<i>Klebsiella pneumoniae*</i>	-----
	EII	<i>Serratia liquefaciens</i>	100%

Otros estudios de identificación de cepas aisladas en compostas elaboradas con materiales con este tipo de residuos a través de la amplificación de ARNr 16S han reportado que algunas cepas fueron designadas como pertenecientes a “otros genotipos desagrupados”. (Vaz-Moreira *et al.*, 2007)

Algunos de los microorganismos identificados, como *Serratia liquefaciens* y *Salmonella choleraesuis* ssp *Arizonae*, estuvieron presentes en más de un compostaje. No obstante, el tipo de acción antimicrobiana de los sobrenadantes producidos de *Serratia liquefaciens* sobre el *S. aureus* ATCC 25923 varió de bactericida a bacteriostático; mientras que el de *Salmonella choleraesuis* ssp *Arizonae* del compostaje III cambió su espectro de acción al inhibir el crecimiento de una bacteria Gram negativa.

### **Resultados de actividad antimicrobiana sobre cepas multirresistentes aisladas de úlceras de pies diabéticos**

Debido a la pérdida de actividad que presentaron las cepas del compostaje I se utilizaron las bacterias de los compostajes I, II y III de aislamiento más reciente. Se seleccionaron los 5 sobrenadantes que ocasionaron mayor inhibición sobre las cepas indicadoras y se evaluaron en tres cepas multirresistentes de cocos Gram positivos y dos de bacilos Gram negativos.

Se probaron los sobrenadantes crudos y las fracciones obtenidas de la semi-purificación, los resultados se encuentran en la Tabla 13.

En general, se observó que el tamaño de los halos de inhibición en cepas multirresistentes fue mucho menor que en las cepas indicadoras y también hubo variaciones entre las cepas multirresistentes. Los sobrenadantes solo inhibieron bacteriostáticamente el crecimiento de cepas multirresistentes Gram positivas.

Los sobrenadantes crudos ocasionaron mayor inhibición que las fracciones semi-purificadas, lo que podría explicarse a través del sinergismo entre el péptido y una sustancia de mayor peso molecular.

**Tabla 13. Resultados de la semi-purificación de los sobrenadantes obtenidos de bacterias aisladas del compostaje con posible actividad antimicrobiana en bacterias multirresistentes.**

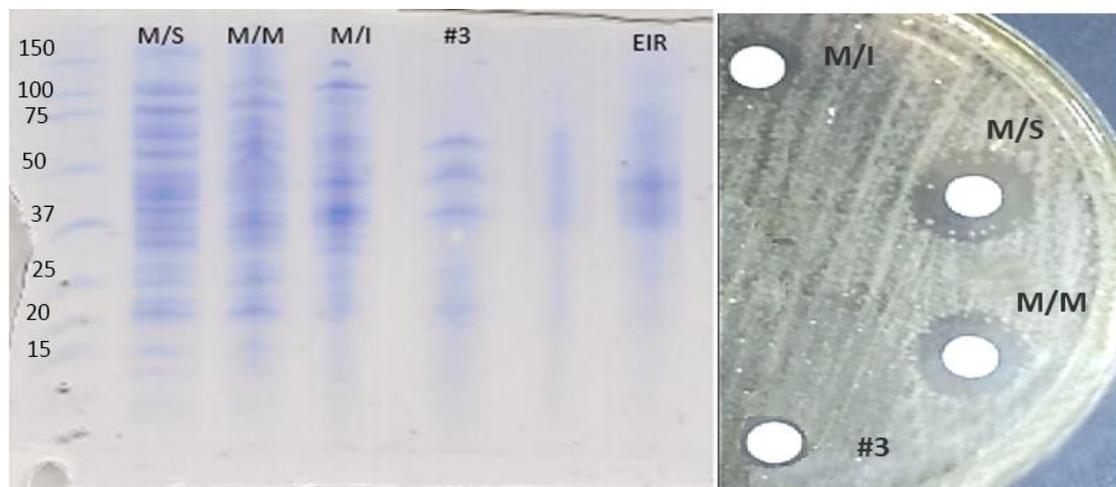
Cepa productora	Cepa Multirresistente	Sobrenadante crudo	PM>10 kDa	PM>3 kDa	PM<3 kDa
<b>M/S</b>	<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-	-
	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-
	<i>Staphylococcus sp. c1</i>	12 mm	-	-	8 mm
	<i>Staphylococcus sp. c2</i>	8 mm	-	-	6 mm
	<i>Enterococcus sp.</i>	-	-	-	-
<b>M/M</b>	<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-	-
	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-
	<i>Staphylococcus sp. c1</i>	8 mm	-	-	7 mm
	<i>Staphylococcus sp. c2</i>	11 mm	-	-	8 mm
	<i>Enterococcus sp.</i>	7 mm	-	-	6 mm
<b>M/I</b>	<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-	-
	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-
	<i>Staphylococcus sp. c1</i>	11 mm	-	-	7 mm
	<i>Staphylococcus sp. c2</i>	6 mm	-	-	+
	<i>Enterococcus sp.</i>	-	-	-	-
<b>#3</b>	<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-	-
	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-
	<i>Staphylococcus sp. c1</i>	6 mm	-	-	+
	<i>Staphylococcus sp. c2</i>	6 mm	-	-	+
	<i>Enterococcus sp.</i>	-	-	-	-
<b>EIR</b>	<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-	-
	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-
	<i>Staphylococcus sp. c1</i>	6 mm	-	-	+
	<i>Staphylococcus sp. c2</i>	+	-	-	+
	<i>Enterococcus sp.</i>	-	-	-	-

**+ inhibición ligera**

### Perfil electroforético de las sustancias antimicrobianas

Se elaboraron geles SDS-Page de los sobrenadantes crudos con actividad sobre cepas multirresistentes. En el gel, se observaron sustancias proteicas entre 150 kDa y 15 kDa, peso molecular que coincide con lo descrito para péptidos antimicrobianos ya que estas moléculas están constituidas por 10-100 aminoácidos. (González *et al.*, 2017)

Todos estos sobrenadantes demostraron ser activos al ser evaluados en cepas indicadoras y multirresistentes. A partir de 25 kDa las bandas de pesos moleculares inferiores no se definen. (Imagen 10)

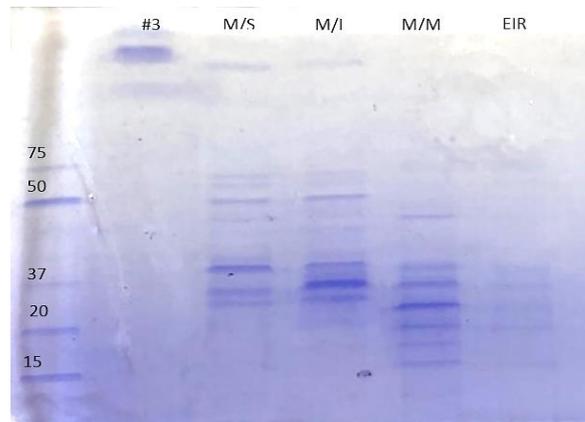


**Imagen 10. Perfil electroforético de los sobrenadantes crudos y resultados de la inhibición en el crecimiento de la cepa multirresistente *Staphylococcus spp. c1***

Para la purificación parcial se utilizó un filtro de 10 kDa, a partir de este se obtuvieron dos fracciones: la fracción concentrada con proteínas mayores a 10 kDa y otra con proteínas de menor peso molecular.

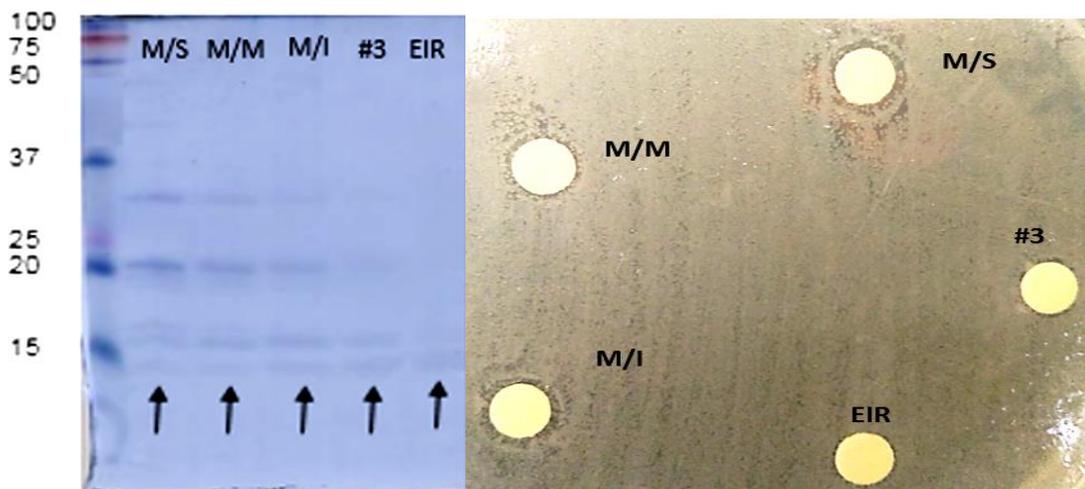
En el siguiente gel se cargaron las muestras correspondientes a las fracciones semi-purificadas con proteínas mayores a un peso molecular de 10 kDa. En la Imagen 11 se puede notar que las bandas están más definidas, aunque las proteínas de bajo peso molecular alrededor de 15 kDa no se observan claramente. Los sobrenadantes producidos por las cepas M/S y M/I presentaron un perfil muy similar.

Esta fracción no presentó actividad. A pesar de ello, no se puede descartar que alguna de estas proteínas participe en la inhibición.



**Imagen 11. Perfil electroforético de la fracción semi-purificada de 10 kDa**

Por otra parte, la fracción que atravesó el filtro de 10 kDa se agregó nuevamente en un dispositivo de filtrado con un tamaño de poro de 3 kDa. Las dos fracciones obtenidas se evaluaron y sólo la fracción con proteínas menores a 3 kDa provocó la inhibición el crecimiento de las bacterias multirresistentes, por ello se realizó el perfil electroforético de esta fracción (Imagen 12). En este perfil las proteínas se encuentran desnaturalizadas y se pueden notar bandas con un peso molecular aproximado de 31.95 kDa, 19.8 kDa, 14.8 kDa y 12.9 kDa.



**Imagen 12. Perfil electroforético de la fracción semi-purificada con peso molecular de 3 kDa y resultados de la inhibición en el crecimiento de la cepa multirresistente *Staphylococcus spp. c1***

Los péptidos que inhibieron a las cepas multirresistentes correspondieron a la fracción con un peso molecular menor a 3 kDa. Es posible que en el gel no se detectaran estos péptidos o dado que la retención de la membrana del dispositivo de filtrado depende del tamaño y la forma del soluto. Podría ser que las proteínas nativas de esta fracción, con sus respectivos plegamientos, atravesaran el filtro y, de esta forma, las proteínas con un peso molecular alrededor de 12.9 kDa sean responsables de la actividad antimicrobiana.

Los sobrenadantes de las cepas M/S y M/I fueron producidos por cepas que se identificaron como *P. aeruginosa*. En estudios similares se ha reportado la presencia de bacteriocinas con un peso molecular de 10 kDa aproximadamente, producidos por *Pseudomonas aeruginosa* con actividad antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina por lo que podría tratarse de un péptido similar. (Arumugam *et al.*, 2018)

Adicionalmente, los sobrenadantes de las bacterias M/M, #3 e EIR producidos por enterobacterias también podrían tener algunos péptidos antimicrobianos con bajos pesos moleculares.

Mediante la técnica de difusión en disco se estimó la cantidad mínima que se requería para observar inhibición de las fracciones con peso molecular menor a 3 kDa y se cuantificó la concentración de proteínas en estos sobrenadantes. (Tablas 14 y 15)

La concentración de proteínas totales cuantificada fue del orden de  $\mu\text{g/ml}$ , lo que coincide con lo reportado para los péptidos antimicrobianos producidos por bacterias pues son activos en concentraciones extremadamente bajas (menores de  $10 \mu\text{g/mL}$ ). (Beristain-Bauza *et al.*, 2012)

**Tabla 14. Concentración de proteínas totales en los sobrenadantes crudos de la fracción con peso molecular menor a 3 KDa**

<b>Sobrenadante</b>	<b>Concentración µg/mL</b>
<b>M/S</b>	152.18
<b>M/M</b>	107.57
<b>M/I</b>	126.2
<b>#3</b>	136.64
<b>EIR</b>	102.43

A partir del volumen mínimo donde se observó inhibición y la concentración de proteínas totales, se calculó que para evitar el desarrollo de la cepa multirresistente *Staphylococcus sp. c1* se requirieron 10.6 µg y 8.8 µg de proteínas en los sobrenadantes producidos por las cepas M/S y M/I respectivamente.

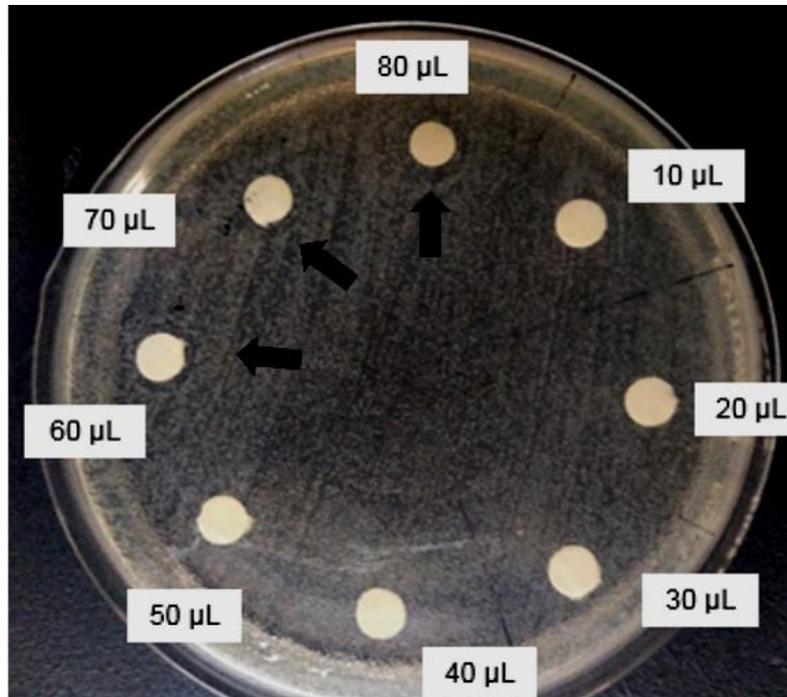
Estas podrían ser cepas muy parecidas o incluso la misma ya que muestran un espectro de acción parecido y ambas se identificaron como *P. aeruginosa*. Los sobrenadantes #3 y EIR requirieron una mayor cantidad 9.5 µg y 8.1 µg; mientras que el sobrenadante M/M tan sólo requirió 5.3 µg y mostró mayor inhibición.

En la cepa *Staphylococcus sp. c2* los sobrenadantes con mayor inhibición en su desarrollo fueron M/S, M/M y M/I e inhibieron con 4.5 µg, 2.1 µg y 5.0 µg de proteínas totales. Por otra parte, los sobrenadantes #3 y EIR una vez más requirieron una mayor cantidad de proteínas para mostrar efecto.

El sobrenadante M/M fue el único con efecto antimicrobiano en *Enterococcus sp.* multirresistente (Imagen 13).

Tabla 15. Inhibición de las fracciones con PM <3kDa sobre cepas multirresistentes.

Cepa productora	Cantidad de sobrenadante crudo (µg)	Cepa multirresistente		
		<i>Staphylococcus sp.</i> Cepa 1	<i>Staphylococcus sp.</i> Cepa 2	<i>Enterococcus sp.</i>
M/S	1.5	-	-	-
	3.0	-	-	-
	4.5	-	8 mm	-
	6.0	-	12 mm	-
	7.6	-	12 mm	-
	9.1	-	13 mm	-
	10.6	9 mm	14 mm	-
	12.1	11 mm	14 mm	-
M/M	1.0	-	-	-
	2.1	-	6 mm	-
	3.2	-	9 mm	-
	4.3	-	9 mm	-
	5.3	7 mm	12 mm	-
	6.4	8 mm	12 mm	8 mm
	7.5	9 mm	15 mm	9 mm
	8.6	10 mm	16 mm	10 mm
M/I	1.6	-	-	-
	2.5	-	-	-
	3.7	-	-	-
	5.0	-	6 mm	-
	6.3	-	8 mm	-
	7.5	-	10 mm	-
	8.8	8 mm	13 mm	-
	10	9 mm	15 mm	-
#3	1.36	-	-	-
	2.7	-	-	-
	4.0	-	-	-
	5.5	-	-	-
	6.8	-	-	-
	8.2	-	-	-
	9.5	8 mm	7mm	-
	10.9	9 mm	8 mm	-
EIR	1.0	-	-	-
	2.0	-	-	-
	3.0	-	-	-
	4.0	-	-	-
	5.1	-	-	-
	6.1	-	-	-
	7.1	-	-	-
	8.1	8 mm	7 mm	-



**Imagen 13. Inhibición bactericida a partir de 60 µL ocasionada por la difusión del sobrenadante producido por la cepa M/M en la cepa multirresistente *Enterococcus sp***

Finamente, los sobrenadantes producidos por las cepas aisladas del compostaje en su mayoría mostraron un espectro de acción contra bacterias Gram positivas. El mecanismo asociado que podría explicar la inhibición es mediante la formación de poros en la membrana que ocasionan la salida de moléculas importantes y la muerte de los microorganismos. De esta manera, el efecto inhibitorio de las bacteriocinas en bacterias Gram negativas es menor posiblemente por la presencia de la membrana externa conformada por lipopolisacáridos que actúa como una barrera de permeabilidad efectiva. (López *et al.*, 2008)

De acuerdo con los resultados anteriores, se demostró la producción de sustancias antimicrobianas de cepas aisladas a partir del compostaje.

Debido a las condiciones de estrés y competencia, el espectro de acción, la cantidad de proteína que se cuantificó en los sobrenadantes, su visualización en geles de poliacrilamida y su incremento en la actividad antimicrobiana en

presencia de un detergente, es posible que los sobrenadantes contengan sustancias proteicas o peptídicas responsables de la inhibición del crecimiento de las cepas evaluadas.

## 6. CONCLUSIONES

- Se aislaron y purificaron 94 cepas provenientes de 4 compostajes diferentes de las que se seleccionaron e identificaron 14 cepas cuyos sobrenadantes concentrados generaron efectos bactericidas y bacteriostáticos en *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Salmonella enterica* Typhi ATCC 19430.
- Se observó que al agregar detergente se liberan al medio de crecimiento las sustancias antimicrobianas. La inhibición de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 sólo ocurrió al crecer las cepas en caldo Luria con detergente.
- Eventualmente, tras permanecer en aislamiento en el laboratorio y aún en presencia del detergente, hubo pérdida total de actividad.
- Los sobrenadantes concentrados producidos por las cepas aisladas de los compostajes II, III y IV que ocasionaron mayor inhibición del crecimiento sobre cepas indicadoras actuaron como agentes bacteriostáticos en el crecimiento de cepas multirresistentes Gram positivas.
- Se semi-purificaron los sobrenadantes crudos y se observó que las fracciones de bajo peso molecular inhibieron el crecimiento de cepas multirresistentes. Sin embargo, estas fracciones requirieron un mayor volumen de sobrenadante para producir inhibición, lo que quizás se atribuye a la sinergia con una proteína de mayor peso molecular.
- La naturaleza química de las sustancias antimicrobianas en los sobrenadantes en su mayoría podría ser peptídica.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Ahmad, V., Khan, M., Jamal, Q., Alzohairy, M., Al Karaawi, M. and Siddiqui, M. (2017). Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 49(1), pp.1-11.

Antunes, L., Martins, L., Pereira, R., Thomas, A., Barbosa, D., Lemos, L., Silva, G., Moura, L., Epamino, G., Digiampietri, L., Lombardi, K., Ramos, P., Quaggio, R., de Oliveira, J., Pascon, R., Cruz, J., da Silva, A. and Setubal, J. (2016). Microbial community structure and dynamics in thermophilic composting viewed through metagenomics and metatranscriptomics. *Scientific Reports*, 6(1).

Arumugam, T., Dhanam, S., Rameshkumar, N., Krishnan, M., & Kayalvizhi, N. (2018). Inhibition of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* by Bacteriocin Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*.

Ashokkumar S, R. Sree Krishna, V. Pavithra, V. Hemalatha y Priya Ingalea. (2011). Production and antibacterial activity of bacteriocin by *Lactobacillus paracasei* isolated from donkey milk. *New Liberty Group*, 1: 109-115.

Bahar, A. and Ren, D. (2013). Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals*, 6(12), pp.1543-1575.

Becerra, G., Plascencia, A., Luévanos, A., Domínguez, M. y Hernández, I. (2009). Mecanismo de resistencia a antimicrobianos en bacterias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 29(2), pp.70-76.

Beristain-Bauza, S., Palou, E. y López-Malo, A. (2012). Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6(2), pp.64-78.

Blair, J., Webber, M., Baylay, A., Ogbolu, D. and Piddock, L. (2014). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), pp.42-51.

Boulter, J., Trevors, J. and Boland, G. (2002). Microbial studies of compost: bacterial identification, and their potential for turfgrass pathogen suppression. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(7), pp.661-671.

Brown, E. y Wright, G. (2016). Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature*, 529(7586), pp.336-343.

Bueno, M. (2007). Como hacer un buen compost. Ediciones la Fertilidad de la Tierra. Navarra pp. 30-32

Camacho, A., Martínez, L., Ramírez, H., Valenzuela, R. y Valdés, M. (2008). Potencial de algunos microorganismos en el compostaje de residuos sólidos. *Terra Latinoamericana*, 32, pp.291-300.

Moreno, J. (2008). Compostaje. Mundi Prensa Libros S.A. pp. 101-140

Chandna, P., Nain, L., Singh, S. and Kuhad, R. (2013). Assessment of bacterial diversity during composting of agricultural byproducts. *BMC Microbiology*, 13(1), p.99.

Calvo, J. y Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), pp.44-52.

Cogger, C., Sullivan D., Kropf, J. (1999). Sustainable gardening. The Oregon – Washington master gardener handbook. Washington State University. pág 495

Dehghan Esmatabadi, M., Bozorgmehr, A., Hajjari, S., Sadat Sombolestani, A., Malekshahi, Z. y Sadeghizadeh, M. (2017). Review of new insights into antimicrobial agents. *Cellular and Molecular Biology*, 63(2), p.40.

Díaz, L., De Bertoldi, M. y Bidlingmaier, W. (2007). Compost science and technology. Boston, MA: Elsevier.

Dolz M. (2008). Bacteriocinas de probióticos. Nuevos enfoques bioterapéuticos: PINHE. *Nutrición clínica y dieta hospitalaria*, 28(3):20-37.

Dorit, R., Roy, S. and Riley, M. (2016). *The Bacteriocins: Current Knowledge and Future Prospects*. Caister Academic Press. Norfolk, UK, pp.127-29.

Forbes, B., Sahm, D., Weissfeld, A. and Trevino, E. (2009). *Diagnóstico microbiológico*. 12th ed. Argentina: Medica Panamericana, p.180.

Galván, V. y García, A. (2017). Determinación de bacteriocinas en muestras de consorcios microbianos nativos de ecosistemas de manglar en el departamento del Atlántico, como fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. *Biociencias*, 12(1), pp.37-51.

González, M., Galán, J., Morales, F. y Otero, A. (2017). Péptidos antimicrobianos: potencialidades terapéuticas. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 69(2), pp.2 - 10.

Haug, R.T. (1993). *Practical Handbook of Compost Engineering*. Lewis publishers. pp. 672- 700

Hernández-Chavarría, F. (2002). *Fundamentos de epidemiología*. San José, Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a Distancia, pág.383.

Hobden, J., Miller, S., Mitchell, T., Sakanari, J., Mietzner, T., Carroll, K., Morse, S., McKerrow, J. y Detrick, B. (2010). Jawetz, Melnick & Adelberg. *Microbiología médica*. 25 ed. México: Mc Graw Hill, pág.187;340.

Hoffman, L., Miller, S., D'Argenio, D. and Bader, M. (2007). Microbial Recognition of Antibiotics: Ecological, Physiological, and Therapeutic Implications. *Microbe Magazine*, 2(4), pp.175-182.

Huot, E., Barrena-Gonzalez, C. and Petitdemange, H. (1996). Tween 80 effect on bacteriocin synthesis by *Lactococcus lactis subsp. cremoris* J46. *Letters in Applied Microbiology*, 22(4), pp.307-310.

Kaur, S. and Kaur, S. (2015). Bacteriocins as Potential Anticancer Agents. *Frontiers in Pharmacology*, 6.

Kang, H., Kim, C., Seo, C. and Park, Y. (2017). The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. *Journal of Microbiology*, 55(1), pp.1-12.

Keren, T., Yarmus, M., Halevy, G. and Shapira, R. (2004). Immunodetection of the Bacteriocin Lacticin RM: Analysis of the Influence of Temperature and Tween 80 on Its Expression and Activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4), pp.2098-2104.

Kong, K. F., Schneper, L., & Mathee, K. (2010). Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS*: 2010;118(1):1–36.

Laich, F. (2011). El papel de los microorganismos en el proceso de compostaje. *Fertilidad y Calidad del Suelo*, pág.2.

López M., J. y Ochoa Z., A. y Santoyo P., G. y Anaya L., J. y Medina M., E. y Martínez T., M. y Loeza L., P. (2008). Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, [en línea] 39(3), pp.49-57. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=579111110007>

Martens, E. and Demain, A. (2017). The antibiotic resistance crisis, with a focus on the United States. *The Journal of Antibiotics*, 70(5), pp.520-526.

Milena, S., Suarez, H. and Zapata, S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista chilena de nutrición*, 36(1), pp.64-71.

Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L., & Björn, C. (2016). Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 6, 194.

Moreno, J. (2008). Compostaje. Mundi Prensa Libros S.A. pp. 101-140

Negróni, M. (2009). Microbiología estomatológica. 2a ed. Buenos Aires: Panamericana, p.129.

Neklyudov, A., Fedotov, G. and Ivankin, A. (2008). Intensification of composting processes by aerobic microorganisms: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44(1), pp.6-18.

Pérez, A., (2008). Manual del compostaje. Madrid: Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (Gobierno de España) pp: 11-24 [en línea] Disponible en: [http://www.resol.com.br/cartilhas/manual\\_de\\_compostaje.pdf](http://www.resol.com.br/cartilhas/manual_de_compostaje.pdf)

Pérez-Cano, H. y Robles-Contreras, A. (2013). Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Revista Médica MD*, 4(3), pp.186-191.

Pírez, M. y Mota, M. (2006). Temas de Bacteriología y Virología Médica. Montevideo 2 ed. (Uruguay): Universidad de la República, Departamento de Bacteriología y Virología, Oficina del libro FEFMUR, pág. 631.

Prestinaci, F., Pezzotti, P. and Pantosti, A. (2015). Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathogens and Global Health*, 109(7), pp.309-318.

Ray, C., Ryan, K. y Sherris, J. (2011). Sherris microbiología médica. 5a Ed. New York: McGraw-Hill, pág.332; 316

Román, P., Martínez, M. and Pantoja, A. (2013). Manual de compostaje del agricultor. Santiago de Chile: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). pp: 23-24 [en línea] Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/019/i3388s/i3388s.pdf> el 04/09/208

Romero Cabello, R. (2007). Microbiología y parasitología humana. 3a ed. México, D.F.: Editorial Médica Panamericana, pp.49-56.

Rondón, A. y Milián, G. y Arteaga, F. y Bocourt, R. y Ranilla, M. y Riaño, J. y Samaniego, L. y Rodríguez, Z. y Pérez, M. y Rodríguez, M. (2012). Identificación y actividad antimicrobiana de cepas de *Lactobacillus* de origen avícola. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, pp.403-409.

Ryckeboer, J., Mergaert, J., Coosemans, J., Deprins, K. and Swings, J. (2003). Microbiological aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin. *Journal of Applied Microbiology*, 94(1), pp.127-137

Salazar, T. (2014). Actividad microbiana en el proceso de compostaje aerobio de residuos sólidos orgánicos. *Revista de Investigación Universitaria*, 3(2), pp.74-84.

Sánchez, Ó., Ospina, D. and Montoya, S. (2017). Compost supplementation with nutrients and microorganisms in composting process. *Waste Management*, 69, pp.136-153.

Tiquia, S. M. 2002. Evolution of extracellular enzyme activities during manure composting. *J. Appl. Microbiol.* 92: 764-775

Torres, L. (2000). Elaboración de composta. Secretaria de Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación. Subsecretaria de Desarrollo Rural. Dirección General de Apoyos para el Desarrollo Rural. pp: 02-03 [en línea] Disponible en: [http://red.ilce.edu.mx/sitios/proyectos/recup\\_nuestroamb\\_oto16/pdf/elaboracion\\_d\\_e\\_composta\\_sagarpa.pdf](http://red.ilce.edu.mx/sitios/proyectos/recup_nuestroamb_oto16/pdf/elaboracion_d_e_composta_sagarpa.pdf)

Tonarelli, G. y Simonetta, A. (2014). Péptidos antimicrobianos de organismos procariotas y eucariotas como agentes terapéuticos y conservantes de alimentos. *FABICIB*, 17, pp.137-177.

Van der Wurff, A.W.G., Fuchs, J.G., Raviv, M., Termorshuizen, A.J. (2016). Handbook for Composting and Compost Use in Organic Horticulture. *BioGreenhouse COST*, pág 46.

Vaz-Moreira, I., Silva, M., Manaia, C. and Nunes, O. (2007). Diversity of Bacterial Isolates from Commercial and Homemade Composts. *Microbial Ecology*, 55(4), pp.714-722.

Ventola, C. L. (2015). The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *Pharmacy and Therapeutics*, 40(4), pp. 277–283.

Wayne J. McLaurin and Gary L. Wade. (2015). Composting and Mulching. *UGA Extension*. 816 pp. 4-5.

## ANEXO I

### Antibiograma de las cepas multirresistentes

**Tabla 16. Multirresistencia de las cepas Gram (+)**

Antibiótico	<i>Staphylococcus sp.</i> Cepa 1	<i>Staphylococcus sp.</i> Cepa 2	<i>Enterococcus sp.</i>
Amikacina	Sensible	Resistente	Sensible
Amoxicilina	Sensible	Sensible	Resistente
Bacitracina	Resistente	Resistente	Resistente
Cefazolina	Resistente	Resistente	Sensible
Cefepima	Sensible	Resistente	Resistente
Cefotaxima	Sensible	Sensible	Sensible
Cefprozil	Resistente	Resistente	Resistente
Cefuroxima	Resistente	Sensible	Resistente
Clindamicina	Resistente	Resistente	Resistente
Eritromicina	Resistente	Resistente	Resistente
Estreptomina	Resistente	Resistente	Resistente
Gatifloxacina	Sensible	Sensible	Sensible
Penicilina	Resistente	Resistente	Resistente
Tetraciclina	Resistente	Resistente	Resistente

**Tabla 17. Multirresistencia de las cepas Gram (-)**

Antibiótico	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Escherichia coli</i>
Bacitracina	Sensible	Resistente
Ác. Oxolínico	Resistente	Sensible
Amikacina	Sensible	Sensible
Amoxicilina	Sensible	Resistente
Cefazolina	Resistente	Resistente
Cefepima	Resistente	Sensible
Cefotaxima	Sensible	Sensible
Cefprozil	Resistente	Resistente
Ceftazidima	Resistente	Sensible
Cefuroxima	Sensible	Sensible
Eritromicina	Resistente	Resistente
Estreptomina	Resistente	Sensible
Gatifloxacina	Sensible	Sensible
Gentamicina	Resistente	Sensible
Ofloxacina	Sensible	Sensible
Penicilina	Resistente	Resistente
Tetraciclina	Resistente	Sensible

## ANEXO II

### Cuantificación de proteínas

Reactivo A:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2%, NaOH 0,1 M

Reactivo B:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 1%

Reactivo C: tartrato sódico-potásico al 2%

Reactivo ABC: Se prepara, mezclando los reactivos en volúmenes: A, B y C, en proporciones 100:1:1

Reactivo Folin-Ciocalteu: reactivo comercial diluido con agua destilada en proporción (1:1)

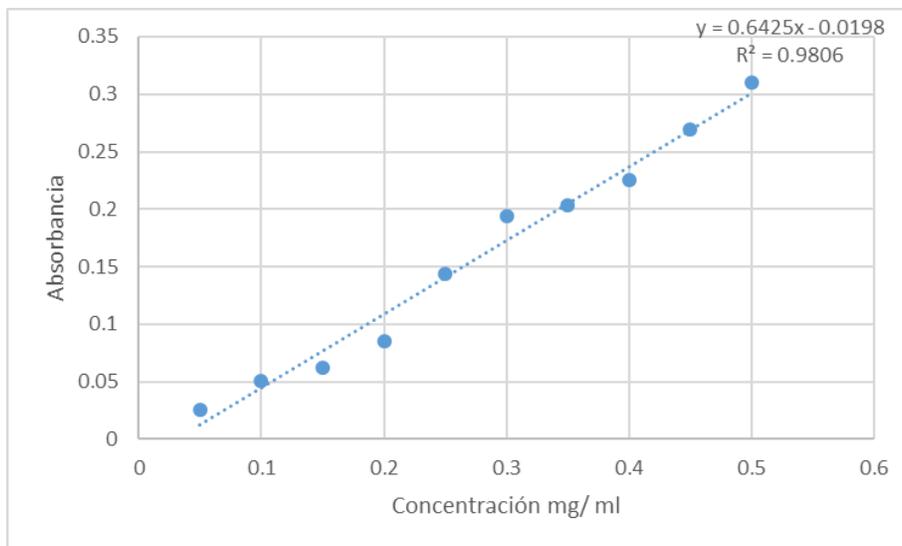
Solución patrón de albúmina de suero bovino (BSA) (1 mg/mL)

Para determinar la concentración de proteínas en los sobrenadantes, primero se realizó una curva patrón con los volúmenes de solución de albúmina de suero bovino, agua y Folin-Ciocalteu como se indica en la Tabla 18.

**Tabla 18. Curva patrón de BSA**

Tubo	Volumen BSA $\mu\text{l}$	Agua $\mu\text{l}$	Reactivos mezcla A:B:C $\mu\text{l}$	Reactivo de Folin- Ciocalteu $\mu\text{l}$	Absorbancia 660 nm
Blanco	0	100	800	100	0
1	5	95	800	100	0.026
2	10	95	800	100	0.051
3	15	95	800	100	0.062
4	20	95	800	100	0.085
5	25	95	800	100	0.144
6	30	95	800	100	0.194
7	35	95	800	100	0.203
8	40	95	800	100	0.225
9	45	95	800	100	0.269
10	50	95	800	100	0.310

A partir de la concentración de albúmina sérica bovina agregada en cada tubo y la absorbancia se construyó una curva de calibración y se calculó la concentración de los sobrenadantes, Tabla 19.



**Gráfica 4. Curva de calibración de BSA**

**Tabla 19. Concentración de proteínas totales en los sobrenadantes crudos de la fracción con peso molecular menor a 3 kDa**

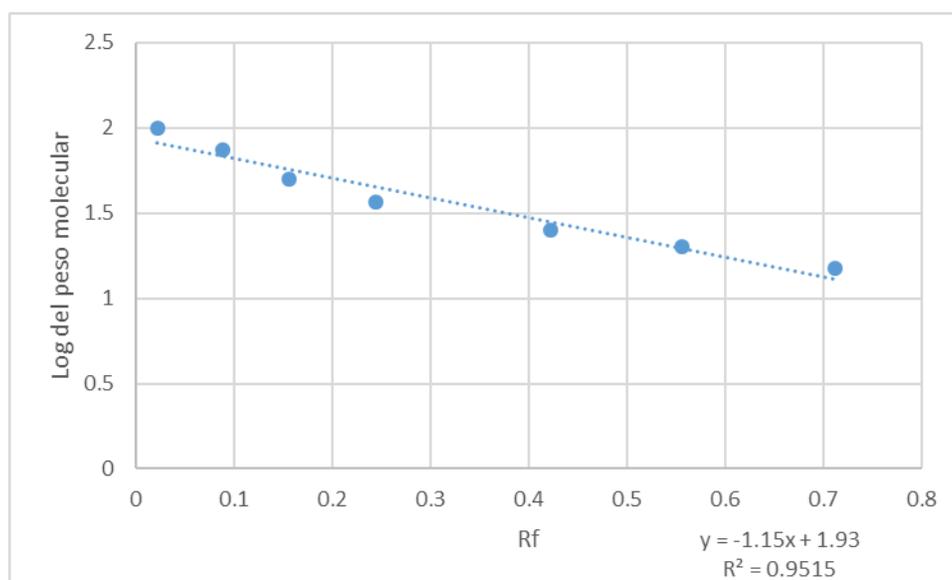
<b>Sobrenadante</b>	<b>Absorbancia 660 nm</b>	<b>Concentración µg/mL</b>
<b>M/S</b>	0.329	152.18
<b>M/M</b>	0.197	107.57
<b>M/I</b>	0.226	126.2
<b>#3</b>	0.242	136.64
<b>EIR</b>	0.189	102.43

## ANEXO III

### Perfil proteico

Para la aproximación del peso molecular de las bandas presentes en los sobrenadantes, se realizó una curva de calibración utilizando las distancias recorridas por las proteínas del marcador de peso molecular y sus respectivos pesos moleculares.

Luego, se calculo el Rf de las proteínas en los sobrenadantes y a través de la ecuación lineal se obtuvo el peso molecular.



**Gráfica 5. Relación lineal de la distancia de migración de un patrón de proteínas de peso molecular conocido.**