BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
INSTITUTO DE CIENCIAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS
POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

Antagonismo de *Sphingomonas* sp. DS-204 contra cepas *de Staphylococcus aureus*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)

CON OPCIÓN EN: MICROBIOLOGÍA MÉDICA

PRESENTA:

LIC. EST. Julia Elisa Martínez Lazalde.

DIRECTOR DE TÉSIS:

D.C. Jesús Muñoz Rojas.

PUEBLA, PUE. **Junio 2018**

BUAP

Puebla, Pue. a 01 de junio 2017.

A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
P R E S E N T E.

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría de la alumna **Julia Elisa Martínez Lazalde,** les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

"Antagonismo de *Sphingomonas* sp.DS-204 contra cepas de *Staphylococcus aureus*"

A nuestro juicio, la alumna **Julia Elisa Martínez Lazalde** puede proceder a la impresión de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

A t e n t a m e n t e.
"Pensar Bien Para Vivir Mejor"

D.C. Patricia Lozano Zarain — **D.C. Margarita Ma. de la Paz Arenas Hernández**

D.C. Yolanda Elizabeth Morales García — **D.C. Rocío Pérez y Terrón**

Posgrado en Ciencias Microbiológicas
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC11,
Ciudad Universitaria
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00 Ext. 2522
posgrado.microbiologia@correo.buap.mx

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

DE LA BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUNTÓNOMA DE PUEBLA

por permitirme ingresar y concluir el Posgrado.

Agradecimientos al apoyo brindado por Proyecto CONACYT (CUV/Becario 263990/220602) de apoyo al presente trabajo científico.

Esta tesis fue realizada con financiamiento CONACYT, VIEP, PRODEP y DITCo

AGRADECIMIENTOS
AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A Dios, a mis padres por su apoyo Julia Lazalde A., Manuel Martínez C., a mi hermano Oscar M. Martínez. Edahí el gran amor de mi vida, a mi cuñada Monica Acosta, a mis angelitos, a Sarami, Bono, Luke, Yoda, Yoshi, Lucky, Guantes y a toda mi familia y amigos.

Al ICUAP por su apoyo y a toda la planta de profesores que influyeron en mi educación como microbióloga: Dra. Eugenia Beatriz Baca, Dra. Ma. Patricia Sánchez Alonso, Dr. Lucio Miguel Castañeda, Dra. Rocío Rocha, Mtra. Alejandra Espinosa Texis, Dra. Rebeca Martínez Contreras, Dr. Candelario Vázquez Cruz, Dr. Eduardo Gómez Conde, Dr. José Zumaqueiro Ríos.

Agradecimientos especiales a mi asesor por su paciencia, apoyo y comprensión Dr. Jesús Muñoz Rojas, a mis asesoras de tesis Dra. Ma. De la Paz Arenas Hernández, Dra. Patricia Lozano Zaraín, Dra. Elizabeth Morales, Dra. Rocío Pérez y T.

Al Dr. Ygnacio Martínez Laguna, Dr. Luis Javier Martínez Morales, Dr. José Antonio Munive, Dr. Luis Ernesto Fuentes Ramírez, Dr. Ricardo Carreño López, Dra. Rocío Bustillos.

A mis compañeros, especialmente a mi única amiga dentro del posgrado la Dra. Lili Pliego, Dr. Osvaldo Rodríguez, Dalia Molina, Guadalupe Montenegro, a la secretaria Ma. de los Angeles Domínguez R.

Si omití a alguna persona mil disculpas de antemano.

Gracias a mí por no quitar el dedo del renglón pese a las adversidades y las múltiples recaidas en depresión y por lo que hoy hago realidad un sueño de superación académica que parecía imposible.

MUCHAS GRACIAS.

ÍNDICE

Página

ABREVIATURAS…….. XI

TABLAS……. XIV

IMÁGENES……. XVI

GRÁFICAS……. XVII

RESUMEN……. 1

INTRODUCCIÓN…….. 2

ANTECEDENTES……. 18

JUSTIFICACIÓN…….. 21

OBJETIVO GENERAL……. 22

OBJETIVOS PARTICULARES…….. 22

MATERIAL Y MÉTODOS……. 23

a) Aislamiento e identificación de cepas de *Staphylococcus aureus*. …….. 24

b) Determinación del fenotipo de resistencia a antibióticos de *Sphingomonas* sp. cepa DS-204…….. 25

c) Pruebas de antibiosis en medio gelificado entre cepas de *Sphingomonas* sp. cepa DS-204 vs cepas de *Staphylococcus aureus*; para determinar el espectro inhibitorio de la sustancia antagónica producida por *Sphingomonas* sp. cepa DS-204…. 28

d) Determinación de los perfiles de susceptibilidad de cepas de *Staphylococcus aureus* a distintos antibióticos…….. 29

e) Antagonismo bacteriano en medio líquido entre *Sphingomonas* sp. cepa DS-204 y *Staphylococcus aureus* para obtener curva de crecimiento bacteriano……. 31

1. Búsqueda de medios de cultivo para el crecimiento de la cepa *Sphingomonas* DS-204 y el no crecimiento de la cepa estafilocócica seleccionada, otro medio de cultivo para el crecimiento de la cepa estafilocócica y el no crecimiento de la cepa *Sphingomonas* DS-204 y otro medio de cultivo para el crecimiento de una mezcla de ambas cepas bacterianas……..……... 31
2. Experimento de antagonismo en medio líquido…….. 32

f) Mutagénesis……..……. 34

1. Selección de cepas bacterianas para establecer el experimento de mutagénesis……... 34
2. Transferencia por Conjugación…….. 36

RESULTADOS…….. 40

a) Determinación del perfil de susceptibilidad antibiótica de *Sphingomonas* sp. DS-204…….. 40

b) Rango de antagonismo en medio gelificado de *Sphingomonas* sp. DS-204 vs cepas de *Staphylococcus aureus*…….. 43

c) Perfil de susceptibilidad de 130 cepas estafilocócicas seleccionadas al azar…… 46

d) Antagonismo en medio líquido entre *Sphingomonas* sp. DS-204 y *Staphylococcus aureus*…… 51

1. Selección de medios de cultivo para el crecimiento de *Sphingomonas* sp. DS-204 y *Staphylococcus aureus*…….. 51
2. Experimento de antagonismo en medio líquido…….. 52

e) Mutagénesis…… 55

DISCUSIÓN…….. 57

CONCLUSIONES…… 61

PERSPECTIVAS…… 62

BIBLIOGRAFÍA…… 63

ANEXOS…… 75

ÍNDICE DE ANEXOS

Página

ANEXO 1. Caracterización bioquímica de los aislados presuntivos de *S. aureus*……. 75

a) Prueba de Tinción de Gram……. 75

b) Prueba bioquímica de Catalasa para identificar *Staphylococcus aureus*…….. 76

c) Prueba bioquímica de Coagulasa para identificar *Staphylococcus aureus*……. 76

d) Prueba bioquímica de Desoxirribonucleasa (DNAsa) para identificar *Staphylococcus aureus*…….. 77

e) Crioalmacen de cepas de *Staphylococcus aureus* (conservación en glicerol)…….. 78

ANEXO 2. Halos de inhibición generados por la cepa *Sphingomonas* sp. DS-204 contra 280 cepas de *Staphylococcus aureus* (Resultados)…….. 80

ANEXO 3. Organización de genes involucrados en la biosíntesis de Cloranfenicol (Cm) (Imagen 5) y Klebicina (Imágen 6)……. 87

ANEXO 4. Extracción de ADN genómico y plasmídico……. 89

a) Extracción de ADN Genómico y resultados…….. 89

b) Extracción de ADN Plasmídico y resultados……. 90

ANEXO 5. Estructura química de algunos antibióticos……. 92

ANEXO 6. XI Encuentro “Participación de la Mujer en la Ciencia”. Modalidad Poster, MS-0100/14. Medicina y Ciencias de la Salud. S2-MCS16…….. 95

ABREVIATURAS

α, β, γ y δ-HCH	Alfa, beta, gamma, omega- Hexaclorociclohexano.
_	Negativo (No presentó halo de inhibición).
ABS, Abs	Absorbancia
Afqn	Azafluoroquinolona*
Ag	Aminoglucósido*
AK	Amikacina
AM	Ampicilina
AmC	Amoxicilina con ácido clavulánico
Ben	Benomilo
C	Centígrados
CAZ	Ceftazidima
CB	Carbenicilina
CEC	Cefaclor
CF	Cefalotina
Cfl	Cefalosporina*
CFP	Cefoperazone
CLCI	Clinical and Laboratory Standards Institute
Cm	Cloranfenicol
Cm	Centímetros
CRO	Ceftriaxona
CTT	Cefotetan
CTX	Cefotaxima
CXM	Cefuroxima
D.O.	Densidad óptica
Da	Dalton
DC	Dicloxacilina
DNAsa	Desoxirribonucleasa
E	Eritromicina

E. coli	*Escherichia coli*
ENX	Enoxacina
FEP	Cefepime
Fnc	Fenicoles*
Fqn	Fluoroquinolona*
GE	Gentamicina
Gp	Glucopéptido*
H	Horas
I	Intermedio
ISSSTEP	Instituto de Seguridad y Servicio Social para los Trabajadores del Estado de Puebla
Ivf	Inhibidor de la vía folato*
Km	Kanamicina
LAB	Bacterias ácido-lácticas
LB	Luria Bertani
LEV	Levofloxacina
Mc	Macrólido*
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
min	Minutos
Ml	Mililitros
Mm	Milímetros
MM9CitratoKm	Medio mínimo 9-Citrato kanamicina
MM9CitratoSm	Medio mínimo 9-Citrato Estreptomicina
MZ	Mezlocilin
NET	Netilmicina
NF, nf	Nitrofurantoina
nM	Nanómetros
Ø	Diámetro
OFX	Ofloxacina

OX	Oxacilina
P, PE	Penicilina
pRK-600	Plásmido RK-600
pUTKm	Plásmido UT-Kanamicina
Qn	Quinolona*
R	Resistente
rpm	Revoluciones por minuto
S	Sensible
S. aureus	*Staphylococcus aureus*
S.O.S.	Sistema de reparación
s/f	Sin fecha*
SAM	Sulbactam
Sfd	Sulfonamida*
Sm	Estreptomicina
sp.	Se refiere a una especie en particular
Spp	Se refiere a varias especies
SXT	Sulfametoxasol/Trimetoprim
T	Tiempo
TE	Tetraciclina
TIM	Trimetoprim
Tt	Tetraciclina*
TZP	Tazobactam
VA	Vancomicina
β-L	Betalactámico*
Λpir	Lambda pir
Micro µl	Microlitros

NOTA: Las abreviaturas usadas con asterisco al final (*) fueron usadas por el autor y no tienen referencia bibliográfica.

ÍNDICE TABLAS

Número tabla	Título de tabla	Página
Tabla 1	Algunos productos metabólicos de las bacterias que ejercen acción antagónica……	4
Tabla 2	Cepas bacterianas……	24
Tabla 3	Características de los multidiscos usados en este estudio……	26
Tabla 4	Criterio interpretativo de Resistencia-Susceptibilidad...	28
Tabla 5	Contenido antibiótico (µl) presente en los Multidiscos.	30
Tabla 6	Cepas utilizadas para la mutagénesis……	35
Tabla 7	Medios de selección para la transposición……	35
Tabla 8	Perfil de susceptibilidad antibiótica de *Sphingomonas* sp. DS-204……	41
Tabla 9	Familias de antibióticos presentes en los multidiscos usados en el presente trabajo……	42
Tabla 10	Resultados de antagonismo producido por cepas de *Sphingomonas* sp. DS-204 frente a cepas de *S. aureus*……	44
Tabla 11	Diámetros de halos de inhibición de cepas de *S. aureus* en experimento de antibiosis frente a *Sphingomonas* sp. DS-204……	45
Tabla 12	Perfiles de resistencia antibiótica de 130 cepas de *S. aureus* y los halos de inhibición producidos por *Sphingomonas* sp. DS-204……	49

Tabla 13 Porcentajes de Resistencia/Susceptibilidad-Multirresistencia a diferentes antibióticos de 130 cepas estafilocócicas y sus diferentes diámetros inhibitorios frente a la cepa *Sphingomonas* sp. DS-204…….. 51

Tabla 14 Medios de cultivo seleccionados para experimento de antagonismo en medio líquido…….... 52

Tabla 15 Experimento de antagonismo en medio líquido……. 54

ÍNDICE DE IMÁGENES

Número	Título de imagen	Página
Imagen 1	Mutagénesis triparental……..	37
Imagen 2	Antagonismo de *Sphingomonas* sp. DS-204 contra *Staphylococcus aureus* sp. cepa 99-1/118-14…….....	44
Imagen 3	Antagonismo bacteriano entre *Sphingomonas* sp DS-204 y distintas cepas de *Staphylococcus aureus*……	46
Imagen 4	Cepas *E. coli* RK-600 y *E. coli cc*118λpir NO antagonizadas por *Sphingomonas* sp. DS-204…….....	56
Imagen 5	*Streptomyces venezuelae* y su función sugerida……	87
Imagen 6	Organización de genes clonados para síntesis de Klebicina……	88
Imagen 7	Extracción de ADN genómico de *Sphingomonas* sp. DS-204 y cepas mutantes……	90
Imagen 8	Extracción de ADN plasmídico de las cepas utilizadas para mutagénesis triparental y cuatro mutantes de la cepa *Sphingomonas* sp. DS-204……..	91

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Número	Título de gráfica	Página
Gráfica 1	Porcentajes de los resultados en las pruebas de resistencia antibiótica de 130 cepas estafilocócicas (R-Resistencia)……	47
Gráfica 2	Porcentajes de los resultados en las pruebas de susceptibilidad antibiótica de 130 cepas estafilocócicas (S-Susceptibilidad)……	47
Gráfica 3	Curva de crecimiento bacteriano-antibiosis……	54

RESUMEN

Sphingomonas sp. es una bacteria Gram negativa degradadora de lindano, es una cepa altamente competitiva debido a que inhibe bacterias patógenas y no patógenas; ya que produce una sustancia inhibitoria eficaz contra 120 cepas de 18 géneros bacterianos diferentes (Aguilera-Mendez, 2009). En el presente trabajo se realizaron experimentos de antagonismo de la cepa *Sphingomonas* sp. DS-204 contra cepas de *Staphylococcus aureus*, aisladas previamente de pacientes con infecciones en las vías respiratorias altas.

Las cepas estafilocócicas fueron caracterizadas bioquímicamente (coagulasa, catalasa y DNAsa positivas); algunas cepas fueron aisladas de pacientes del área de quemados del hospital universitario de la BUAP (Arenas-Hernández, 1986).

Se realizaron experimentos de inhibición simultánea con las cepas *Sphingomonas* sp. DS-204 y las cepas estafilocócicas.

Se midieron los halos inhibitorios y se observó que algunas de las cepas estafilocócicas fueron inhibidas por la cepa *Sphingomonas* sp. DS-204.

Destacando que estas cepas tienen potencial inhibitorio contra cepas estafilocócias multirresistentes a antibióticos de amplio espectro, lo que concede a este trabajo el inicio de la búsqueda de los genes involucrados en la biosíntesis de una nueva sustancia inhibitoria.

INTRODUCCIÓN

"El antagonismo microbiano es una relación deletérea o negativa, es la inhibición, deterioro o muerte de un microorganismo por acción de otro" (Pérez y Terrón, *et al.,* 2014).

Existe una amplia diversidad de bacterias en los distintos hábitats que sostienen la vida del planeta (Kerr, 1997; Pace, 1992). Sin embargo, sólo hemos sido capaces de aislar alrededor del 1% de éstas, dependiendo del ambiente explorado (Hugenholtz *et al*., 1996; Hughes *et al.*, 2001). Las bacterias poseen un enorme potencial agrobiotecnológico, algunas de ellas desempeñan funciones que resultan beneficiosas para las actividades humanas (Elein *et al.*, 2005). Por ejemplo, existe una gran diversidad de bacterias biodegradadoras de compuestos xenobióticos (Ramos *et al.*, 2005; Nápoles *et al*., s/f). Entre ellas podemos citar a miembros de los géneros *Alcaligenes, Arthrobacter, Bacillus, Nocardia y Pseudomonas* (Leahy *et al*., 1990; Suárez *et al*., 2002). Otro grupo de bacterias son benéficas debido a que son estimuladoras del crecimiento de plantas (Barreto *et al.*, 2007). Dentro de este grupo podemos encontrar bacterias tales como *Azospirillum brasilense*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Burkholderia unamae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus licheniformis*; bacterias del género *Enterobacter*, entre otras (Lucy *et al.*, 2004). Un tercer grupo de bacterias beneficiosas son aquellas que producen compuestos importantes para la industria entre las que destacan *Lactobacillus bulgaricus, Streptococcus thermophilus, Gluconobacter suboxidans, Corynebacterium glutamicum,*

Clostridium acetobutylicum, Xanthomonas campestris, Pseudomonas denitrificans, Propionibacterium, Streptomyces, Bacillus brevis, Bacillus thuringiensis, Bacillus popilliae, Escherichia coli (Broadbent, *et al.*, 2004). Sin embargo, otras bacterias podrían resultar patógenas para plantas o humanos (Leifert *et al.*, 1993).

"Las bacterias sostienen una competencia intensa por los nutrientes en sus respectivos hábitats y varias son las estrategias que ellas han empleado para mantener esta competencia" (Riley *et al*., 2002). Por ejemplo, algunas cambian el pH del entorno y evitan que otras bacterias se puedan adaptar bajo esas condiciones (Frioni, 1999; Lowe *et al.*, 1993). Otras crecen aceleradamente como las bacterias del género *Mycobacterium* de crecimiento rápido o *Escherichia coli*; otras han desarrollado mecanismos de quimiotaxis para llegar hasta los sitios donde están las fuentes de carbono disponibles (Munoz, *et al*., 1998). Es posible que el mecanismo más activo que las bacterias han desarrollado a lo largo de su evolución es la competencia mediante el uso de sustancias antimicrobianas (Riley *et al*., 2002).

Las sustancias antimicrobianas que producen las bacterias son muy diversas (Muñoz-Rojas *et al.*, 2004). Algunos ejemplos se incluyen en la Tabla 1.

Sustancias	**Tipo de bacteria**	**Ejemplos**
Péptidos	Bacterias Gram positivas	Nisina (LAB A)
Lipopéptidos cíclicos	Producida por bacterias del género *Pseudomonas, Xanthomonas*, etc.	Xantolisina
Sideróforos	Compuestos de bajo peso molecular con alta afinidad por ión férrico.	Lactoferrinas, Enterobactina, Aerobactina.
Bacteriocinas	Proteínas biológicamente activas contra miembros de la misma especie o especies muy relacionadas o no, a la cepa productora.	Colicinas,
	Producidas por bacterias Gram negativas y Gram positivas.	Bacteriocinas LAB
Antibióticos (amplio espectro)	Molécula pequeña, poco polar y con solubilidad lipídica; producida por la bacteria *Streptomyces venezuelae.*	Cloranfenicol
	Producida por la bacteria *Streptomyces kanamyceticus*.	Kanamicina
	Producidos por bacterias del género *Streptomyces*.	Oligomicina Estreptomicina

Tabla 1. Algunos productos metabólicos de las bacterias que ejercen acción antagónica.

Desde un punto de vista ecológico se ha reportado que las bacterias que producen una o más sustancias inhibitorias tienen ventajas competitivas sobre las bacterias que son sensibles (Muñoz-Rojas *et al.*, 2004).

Además algunos autores aseguran que las bacterias producen cuando menos una bacteriocina (Riley *et al*., 2002a; Riley *et al*., 2002b). Sabiendo que las bacteriocinas son un tipo específico de sustancias inhibitorias podríamos extrapolar esta suposición a la afirmación “todas las bacterias producen al menos una sustancia inhibitoria”. Considerando la enorme diversidad bacteriana que hay en nuestro planeta, es concebible que aún existen muchas sustancias inhibitorias por ser descubiertas y por lo tanto falta vislumbrar muchas vías bioquímicas alternativas que las bacterias usan para la producción de estas sustancias inhibitorias.

Las estrategias que se usan para explorar si una bacteria produce sustancias inhibitorias eficientes contra el crecimiento de otras bacterias del ambiente han sido básicamente dos: la metodología de agar en doble capa y la metodología de inhibición simultánea. En la primera, las bacterias que se exploran como productoras son colocadas en una placa de agar con el medio de cultivo apropiado (donde crecen las cepas que son posibles productoras) y se colocan bajo las condiciones de crecimiento óptimas, después éstas colonias de bacterias son removidas de la placa y eliminadas con vapores de cloroformo, para posteriormente colocar una segunda capa con agar a punto de gelificar de una cepa bacteriana que será explorada como posible sensible. La visualización de un halo de inhibición significa que la bacteria explorada como posible productora,

produce una sustancia inhibitoria que elimina a la cepa posible sensible. La otra metodología es la de inhibición simultánea que implica el crecimiento de las dos cepas (posibles productora y sensible) al mismo tiempo y en la misma placa de medio de cultivo (Morales-García *et al.*, 2010).

Además, las sustancias inhibitorias producidas por bacterias representan un potencial farmacéutico para ser explorado en el futuro (Muñoz-Rojas *et al.*, 2004), así como sistemas de marcaje novedosos que podrían ser utilizados en el diseño de bacterias recombinantes y obtención de mutantes múltiples en trabajos de ingeniería genética (Cases *et al*., 2005).

Los genes de la biosíntesis de algunas sustancias inhibitorias han sido descritos de forma parcial y pocos de forma completa (Morales-García, *et al*., 2007). Razón por la que deben intensificarse los esfuerzos para la búsqueda de los mismos, sobre todo en modelos de bacterias poco explorados y que son capaces de inhibir bacterias patógenas de interés médico. El entendimiento de la biosíntesis de las sustancias inhibitorias permitirá manipular a las bacterias para una producción adecuada, así como el diseño de bacterias recombinantes.

Diversidad de sustancias antimicrobianas.

Existen distintos tipos de sustancias inhibitorias que las bacterias utilizan para preservar su especie y competir mejor por los nutrientes (Riley *et al*., 2002b). Entre las que destacan las bacteriocinas, los sideróforos, los antibióticos de amplio espectro, el ácido cianhídrico, los antifúngicos y algunos compuestos de tipo lipopéptido (Yuan *et al*., 2012; Li *et al*., 2013).

Las bacteriocinas son proteínas y péptidos producidas tanto por bacterias Gram-positivas como Gram-negativas y del dominio Archaea. Tradicionalmente se considera a las bacteriocinas como péptidos biológicamente activos que tienen propiedades bactericidas contra otras especies estrechamente relacionadas con la cepa productora, sin embargo, este concepto se ha modificado ya que se han encontrado también acciones bactericidas contra cepas distanciadas filogenéticamente de la cepa productora (Yuan *et al*., 2012).

Entre las bacteriocinas de bacterias Gram-negativas se encuentran las colicinas y las microcinas producidas por *Escherichia coli*; las Piocinas, producidas por *Pseudomonas aeruginosa*, bacteriocinas de *Serratia maricesens*, entre otras.

Las bacteriocinas de bacterias Gram positivas son en su mayoría péptidos que difieren de las bacteriocinas producidas por bacterias Gram negativas en que su producción no es necesariamente un evento letal para la bacteria productora ya que poseen mecanismos de transporte para su liberación y algunas poseen un sistema de transporte específico mientras otras emplean la vía de exportación dependiente de *sec* (Muñoz-Rojas, 2004).

Las bacterias ácido lácticas (LAB) son capaces de producir distintos tipos de bacteriocinas, En 1988, Klaenhammer propuso tres clases de bacteriocinas de LAB. Bacteriocinas de LAB Clase I: Lantibióticos que en base a su estructura se subdividen en Lantibióticos clase A quienes inhiben a las células sensibles por despolarización de la membrana citoplasmática, son de tamaño aproximado de 21-38 aminoácidos. Como ejemplo encontramos a la Nisina producida por *Lactococcus lactis* sp. (utilizada como conservador). Lantibióticos clase B que

tienen una estructura secundaria más globular, no exceden los 19 aminoácidos y funcionan a través de inhibición enzimática. Como ejemplo encontramos la Mersacidina que interfiere con la biosíntesis de la pared celular.

Bacteriocinas de LAB Clase II: Son pequeñas, aproximadamente de 30-60 aminoácidos, estables al calor y se clasifican en tres subgrupos. Clase IIa: Es el grupo más grande, con una secuencia amino-terminal conservada, tienen una actividad compartida contra *Listeria* sp., actúan formando poros en la membrana citoplasmática. Como ejemplo encontramos la Pediocina AcH (*Pediococcus acidilactici*), Sacacina A (*Lactobacillus sake* 706) (Sablon *et al*., 2000); así como la Leucocina A (*Leuconostoc* spp). Clase IIb: Estas bacteriocinas forman poros en las membranas de las células blanco, estan formadas por dos proteínas que funcionan complementariamente, como ejemplo encontramos Lactacina F (*Lactobacillus johnsonii*) (Sablon *et al*., 2000; Bruno *et al*.,1993), Lactococcina G y M (*Lactococcus lactis*). Clase IIc: Son bacteriocinas *sec* dependientes como por ejemplo la Acidocina B (*Lactobacillus acidophilus*).

Bacteriocinas de LAB Clase III: Son proteínas grandes y sensibles al calor, en esta clase encontramos Helveticinas J y V (*Lactobacillus helveticus*) y Lactocina B. Se ha adicionado otro grupo de bacteriocinas de LAB Clase IV: Estas bacteriocinas incorporan carbohidratos o lípidos en la molécula para tener actividad como ejemplo encontramos Leuconocina S y Lactocina 27 (Muñoz-Rojas, 2004; Abee *et al*., 1994; Sahl *et al*., 1998; Gardner *et al*., 2004).

Y por último se encuentran las bacteriocinas producidas por el dominio Archaea, son llamadas Archaeocinas como por ejemplo las Halocinas producidas

por halobacterias. La halocina S8 es un péptido hidrofóbico corto de 36 aminoácidos, es codificada por un megaplásmido y es muy resistente, puede ser desalinada, hervida, sujeta a solventes orgánicos, almacenada a 4°C por periodos extensos sin pérdida de actividad. Cuando las fuentes de nutrientes son limitadas las células productoras lisan a las células sensibles y enriquecen de nutrientes al medio ambiente local. Así las proteínas estables pueden permanecer en el medio ambiente el tiempo necesario para inhibir a sus competidores en subsecuentes condiciones de flujo de nutrientes (Muñoz-Rojas, 2004).

La evolución de las bacteriocinas formadoras de poro (por actividad nucleasa) ocurre en dos pasos: En el primero sucede por diversificación del gen de inmunidad mediado por recombinación y en el segundo paso ocurren cambios del gen de producción de la sustancia inhibitoria y vinculado a la selección del gen de la inmunidad que codifica para el antídoto efectivo. De esta forma se genera una bacteriocina con actividad nucleasa nueva y con una inmunidad diversificada y contra-seleccionada (Muñoz-Rojas, 2004).

Otro tipo de sustancia inhibitoria bacteriana son los sideróforos los cuales funcionan como quelantes de hierro por ejemplo: la pseudobactina (*Pseudomona aeruginosa*), enterobactina (*Escherichia coli*) y bacillibactina (*Bacillus subtilis*), ferrioxamina B (*Streptomyces pilosus*), azotobactina (*Azotobacter vinelandii*) y pseudobactina (*Pseudomonas* B 10) entre otros.

Los sideróforos son pigmentos extracelulares fluorescentes con alta afinidad por el hierro. Son metabolitos hidrosolubles y de bajo peso molecular (500-1000 Da). Los sideróforos son producidos por una gran variedad de

microorganismos crecidos en condiciones de hierro limitante. El ion hierro Fe^{3+} tiene muy poca solubilidad a pH neutro, por lo que no puede ser utilizado por los organismos. Los sideróforos disuelven estos iones a complejos de Fe^{3+} que pueden ser asimilados por mecanismos de transporte activo. Muchos sideróforos son péptidos no ribosomales. Bajo condiciones de anoxia, el hierro está generalmente en el estado de oxidación +2 (ferroso) y soluble. Sin embargo, en presencia de oxígeno, el hierro se encuentra generalmente con la valencia +3 (férrico), formando varios minerales insolubles. Para obtener hierro de dichos minerales, las células producen sideróforos acoplables al hierro para la unión y transporte hacia dentro de la célula. Gran parte de los sideróforos consisten de derivados del ácido hidroxámico, el cual actúa muy fuerte como quelante férrico.

Las células poseen un sistema de transporte y un receptor de membrana específico que reconoce el complejo sideróforo-Fe^{+3}, por lo que se consideran vehículos de este elemento hacia el interior de la célula bacteriana.

Las principales características estructurales que determinan la selectividad de un sideróforo por el ion férrico son: el tipo, número (denticidad) y distribución espacial de los grupos de unión a metal (Boukhalfa *et al*., 2002).

A pesar de los más de quinientos sideróforos identificados hasta la fecha, la diversidad de los grupos funcionales que coordinan el ion férrico es escasa, debido a la necesidad de grupos donadores duros, como por ejemplo los oxianiones, para coordinar la forma más oxidada del hierro; permitiendo agrupar a la mayoría de sideróforos en: a) hidroxamatos, b) catecolatos, c) α-hidroxicarboxílicos y d) sideróforos mixtos (Ahmed and Holmström, 2014).

Todos los microorganismos (excepto *Lactobacillus*) requieren de hierro para satisfacer sus necesidades vitales, pues éste participa en procesos biológicos tan importantes como el transporte de oxígeno, síntesis del DNA, fijación del nitrógeno, fotosíntesis y respiración (Suárez *et al*., 2002).

Otro grupo de sustancias antimicrobianas son los antibióticos de amplio espectro, los cuales podrían ser bactericidas o bacteriostáticos, inhiben el desarrollo de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, mediante diversos mecanismos, por ejemplo es inhibiendo la síntesis proteica bacteriana al actuar sobre la subunidad 30S o 50S del ribosoma bacteriano. Algunos antibióticos son producidos por bacterias del género *Streptomyces* y aunque tienen mecanismos de acción semejantes, difieren en su estructura química. En este grupo encontramos al cloranfenicol, las tetraciclinas y los macrólidos (Malgor *et al*., 1999).

El Cloranfenicol es un antibiótico de amplio espectro producido por diversas especies del género *Streptomyces*. Es una molécula pequeña, soluble a los lípidos, formada por un grupo nitrobenceno conectado a un grupo propanol y un grupo amino conectado a un derivado del ácido dicloroacético (Morales-García *et al*., 2007). Es un medicamento usado como sustituto en pacientes alérgicos a los antibióticos β-lactámicos.

El cloranfenicol inhibe la síntesis de proteínas en las cepas sensibles, produciendo un efecto bacteriostático. Existen 15 genes asociados con la biosíntesis de Cloranfenicol, 12 de ellos están agrupados en una región de

aproximadamente 18 kb del DNA cromosómico (Vining *et al*., 1984; Morales-García *et al*., 2007).

La kanamicina es un antibiótico de amplio espectro, del grupo de los aminoglucósidos, bactericida; aislado de *Streptomyces kanamyceticus*. La kanamicina está conformada por dos azúcares aminados (aminoglucósidos) y un alcohol cíclico aminado (aminociclitol), unidos mediante enlaces glucosídicos.

Existe consenso en que estas moléculas inhiben la síntesis de proteínas y que, además, producen una lectura errónea de la información del ARN mensajero, determinando la incorporación de algunos aminoácidos incorrectos en la cadena peptídica. El efecto bactericida final sería de carácter pleiotrópico (fenómeno por el cual un solo gen es responsable de efectos fenotípicos o caracteres distintos y no relacionados), debido a la incorporación de algunos de estos péptidos a la membrana citoplasmática, lo que conduce a una alteración de la permeabilidad y una entrada progresiva de moléculas de aminoglucósidos al interior de la célula bacteriana, produciendo una inhibición irreversible de la actividad ribosomal y por tanto de la síntesis de proteínas. Si bien en procariontes a concentraciones terapéuticas la mayoría de los antimicrobianos aminoglucósidos son inhibidores de la síntesis proteica, a mayor concentración podrían también tener efecto sobre la síntesis de proteínas en mamíferos, probablemente mediante uniones no específicas a ribosomas y ácidos nucleicos eucarióticos (Mella *et al*., 2004).

Las tetraciclinas son antibióticos de amplio espectro producidas por distintos tipos de cepas del género *Streptomyces* (clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina) y otro tipo de tetraciclinas obtenidas de forma semisintética a partir de

la clortetraciclina por reducción; con actividad bacteriostática por lo que inhiben la síntesis proteica bacteriana (Rodríguez *et al*., 1998)

Las tetraciclinas están formadas por la fusión de cuatro anillos bencénicos con diversos sustituyentes.

Todos los antibióticos del grupo comparten una serie de características comunes (estructura química, espectro antimicrobiano, mecanismo de acción y toxicidad). Las principales diferencias radican en su perfil farmacocinético.

Los macrólidos están conformados por un anillo macrocíclico lactónico unido mediante enlaces glucosídicos a uno o dos azúcares. Por su estructura química, los macrólidos se dividen en cuatro grupos: macrólidos de 14 átomos, de 15 átomos (azálidos), de 16 átomos y los estólidos. Actualmente se consideran macrólidos de segunda generación, aquellos que tienen origen semisintético, con un espectro de acción más amplio, menos efectos secundarios y mejores características farmacocinéticas y farmacodinámicas como la azitromicina, los cetólidos, la claritromicina, diritromicina y roxitromicina (Caballero, 2012).

Recientemente se ha estudiado un compuesto antimicrobiano catalogado como un lipopéptido cíclico denominado como xantolisina que es producida por *Pseudomonas*, la que incluye actividad antifúngica y toxicidad contra bacterias Gram-positivas.

Las bacterias también sintetizan antifúngicos, por ejemplo se ha demostrado que cepas relacionadas con el género de *Pseudomonas* sp., *Pantoe* sp. y *Bacillus* sp., tienen potencial para inhibir el crecimiento de hongos del género *Stenocarpella maydis*, *Stenocarpella macrospora* y *Sporisorium reilianum*,

causantes de diversas enfermedades en el maíz (pudrición seca y carbón de la espiga). (Li *et al*., 2013).

Se ha demostrado que la cadena NJN-6 de *Bacillus amyloliquefaciens* produce sustancias antagónicas que tienen actividad antifúngico agonista contra *Fusarium oxysporum*, hongo responsable de la enfermedad de Panamá en los bananeros y de muchas enfermedades más en diferentes especies vegetales (Yuan *et al*., 2012).

Genes relacionados con la producción de las sustancias inhibitorias y localización.

La diversidad de sustancias inhibitorias es enorme y no se puede contar con estrategias específicas para purificarlas o para conocer los genes que las codifican. Por ejemplo los genes que codifican a las bacteriocinas de bacterias Gram-negativas, generalmente se encuentran en plásmidos aunque también se pueden encontrar en su cromosoma.

Un ejemplo muy estudiado son las colicinas producidas por bacterias *E. coli*, y los genes que codifican sus bacteriocinas se encuentran exclusivamente en plásmidos. Contienen un gen de colicina que codifica la toxina, un gen de inmunidad que codifica una proteína que confiere inmunidad específica a la célula mediante unión e inactivación de la toxina y un gen de lisis que codifica una proteína involucrada en la liberación de la colicina mediante lisis de la célula productora (Muñoz-Rojas, 2004). La producción de colicinas esta mediada por la respuesta del sistema S.O.S. ya que es producida en condiciones de estrés. Estas

bacteriocinas forman poros en la membrana y tienen actividad nucleasa contra blancos como ADN, ARN y ARNt. Pueden ser de tamaño variable de 449-629 aminoácidos y las que tienen actividad nucleasa varian desde 178-777 aminoácidos. Los genes que codifican para la biosínteis de la sustancia inhibitoria de *Sphingomonas* sp. DS-204, aún no se han descrito, pero la mutagénesis al azar podría ser la base para llevar a cabo la determinación de estos.

Otros ejemplos de bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas son las Piocinas, producidas por *Pseudomona aeuruginosa* y los genes que codifican para la producción de bacteriocinas se encuentran exclusivamente en su cromosoma. Los genes que codifican para bacteriocinas de *Serratia marcesens* se localizan tanto en cromosoma como en plásmidos.

El dominio central de las colicinas (proteínas) comprende el 50% de la proteína y se encarga del reconocimiento de receptores específicos de superficie celular, aproximadamente el 25% comprende el dominio N-terminal que es responsable de la traslocación dentro de la célula blanco y el resto que es una secuencia corta involucrada en la unión a otra proteína de inmunidad, es responsable de la toxicidad y de su propia inmunidad.

Las bacteriocinas de bacterias Gram-positivas, en particular los lantibióticos requieren muchos más genes para su producción de lo que requieren las bacterias Gram negativas (Muñoz-Rojas, 2004).

Se sabe que la producción de bacteriocinas es directamente proporcional a la concentración bacteriana por lo que a mayor concentración celular, aumenta la concentración de la molécula autoinductora y por lo tanto aumenta la producción

de la bacteriocina. Cuando se alcanza una concentración umbral la población ha llegado al *quórum* y se empiezan a expresar una serie de genes lo que desata la producción de bacteriocinas.

En el 2004, Riley y colaboradores, realizaron 96 cultivos de *Klebsiella penumoniae* y *K. oxytoca*; el 14.6% de estas bacterias producen fenotipos asesinos que sugirieron la producción de bacteriocinas-toxinas. Clonaron y secuenciaron un grupo de genes que codifican dos de esos fenotipos asesinos y dos ejemplos de una bacteriocina asociada con un gen bacteriófago, la primera organización genética descrita. La reciente identificación del grupo de genes de klebicina C fue descubierta *en K. pneumoniae* y *K. oxytoca*.

La identificación del grupo de genes de klebicina D fue detectado en *K. oxytoca*. Las comparaciones de la secuencia proteica y filogenética sugieren que la klebicina C está estrechamente relacionada para el grupo de colicinas rRNasa (como colicina E4), mientras que la klebicina D está estrechamente relacionada para el grupo de colicinas tRNasa (como colicina D). El grupo de genes de klebicina C y D tienen organizaciones genéticas y reguladoras similares. En ambos casos, se dedujo una estructura de operon que consiste en un fago asociado a un marco de lectura abierta y la actividad de la klebicina asociada a genes de inmunidad. Esta nueva organización de bacteriófago/bacteriocina podría proveer un nuevo mecanismo para la generación de diversidad de bacteriocinas en *Klebsiella* (Riley *et al*., 2001; Chavan *et al*., 2005).

Las xantolisinas son un compuesto antimicrobiano correspondiente a un nuevo grupo de lipopéptidos cíclicos producido por bacterias del género

Xanthomonas. Las propiedades del principal compuesto de Xantolisina A, son compartidas con varios lipopéptidos de *Pseudomonas*, incluyendo la actividad antifúngica y toxicidad para bacterias Gram positivas, formación del biofilm y su facilidad para colonizar la superficie. También estos lipopéptidos cuentan con capacidad irregular para inhibir bacterias Gram negativas (Li *et al*., 2013).

En el anexo 3, se muestra la organización genética para la biosíntesis del cloranfenicol (Cm) y klebicina, así como en el anexo 4, la estructura química de algunos antibióticos con la finalidad de recordar la diversidad de moléculas antimicrobianas con nula similitud en sus estructuras.

Debido a la enorme diversidad de moléculas antimicrobianas es concebible que los genes que codifican a estas sustancias sean muy diferentes en cuanto a organización estructural y tamaño.

A causa de la enorme diversidad de sustancias inhibitorias, la estrategia de detección para conocer los genes implicados en la biosíntesis de sustancias inhibitorias es la mutagénesis al azar (Chavan *et al*., 2005). La razón del uso de mutagénesis al azar es por que no se conoce o no existe una regla que confirme que los genes son de un tamaño específico, así como la conservación de ellos. Pareciera que esta estratégia ha evolucionado desde diversos términos y no contamos con algo específico para poder captarlas por lo cual es imprescindible el uso de la mutagénesis al azar.

ANTECEDENTES

Sphingomonas sp. es una bacteria Gram-negativa, aerobia, degradadora de lindano (hexaclorociclohexano, HCH) (Böltner *et al.*, 2005; Böltner *et al.*, 2008) cuyos genes involucrados en la degradación son los llamados *lin* (Tabata *et al.*, 2013).

El lindano es un compuesto xenobiótico utilizado como plaguicida, altamente tóxico para el ser humano y medio ambiente, razón por la que está prohibido en todas sus formulaciones de sus isómeros geométricos (difieren en la posición de sus grupos sustituyentes con respecto al doble enlace que no posee capacidad de rotación por ejemplo: α, β, γy δ-HCH. (Nelson, D.L., Cox, M.M., 2008).

En 1989 Senoo y Wada observaron que *Sphingomonas paucimobilis* UT26 degradaban lindano, en ambientes contaminados del Japón. El ambiente contaminado usualmente contiene mezclas de α, β, γ y δ-HCH como resultado de su uso y deshecho. Estos isómeros no difieren únicamente en su orientación espacial en sus átomos de cloro unidos al anillo de carbono alifático, sino en su toxicidad, solubilidad y en sus características recalcitrantes para ser usados como fuente de carbono (Deo *et al*., 1994).

Los microorganismos involucrados en la degradación de lindano (pesticida altamente tóxico) son diversos, como por ejemplo: proteobacterias, cianobacterias, firmicutes, actinobacterias (Tu, 1976; Nalin *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 2000; Okeke *et al.*, 2002; Nawab *et al.*, 2003; Elango *et al.*, 2011). También se ha explorado

que miembros del género *Sphingomonas* degradan el lindano eficientemente usándolo como fuente de carbono (Böltner *et al*., 2005).

Las cepas del género *Sphingomonas* han sido propuestas como modelo para llevar a cabo la rizoremediación de compuestos tóxicos en suelos contaminados por pesticidas (Böltner *et al*., 2008), debido a la alta capacidad de esta cepa para establecerse en suelos rizosféricos, lo que supuso que son cepas altamente competitivas para esos ambientes.

La capacidad de diversas cepas de *Sphingomonas* spp. para producir sustancias inhibitorias fue explorada recientemente (Morales-García *et al.*, 2009c), observando que algunas cepas como *Sphingomonas* sp. DS-204 y *Sphingomonas* sp. Ans-285 producen una sustancia inhibitoria de amplio espectro que es capaz de inhibir el crecimiento de 120 cepas bacterianas de 18 géneros diferentes. El producir estas sustancias inhibitorias le otorga una elevada capacidad competitiva a *Sphingomonas* sp. para establecerse en suelos diferentes, donde se observó además una disminución de la flora bacteriana normal (Aguilera-Méndez, 2009).

Las cepas *Sphingomonas* sp. DS-204 y *Sphingomonas* sp. Ans-285 inhibieron algunas cepas de interés clínico como *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* (Morales-García *et al*., 2009). Destacando la capacidad de estas cepas para inhibir a dos cepas patógenas del género *Staphylococcus,* pertenecientes a las especies *S. aureus* y *S. epidermidis*. Es en las etapas tempranas de crecimiento de *Sphingomonas* sp. cuando se inicia la producción de la(s) sustancia(s) antagonista(s), alcanzando un nivel más elevado en su producción en la fase estacionaria (Aguilera-Méndez, 2009).

Staphylococcus aureus produce infecciones en tracto respiratorio, en huesos, tejidos blandos y mucosas. También este género bacteriano está asociado a enfermedades gastrointestinales graves en Londres, UK. Además, las cepas de *Staphylococcus* sp. se han tornado resistentes a varios antibióticos, incluyendo las cefalosporinas descritas más recientemente, por lo que se están convirtiendo en un problema de salud pública (Bernal *et al.*, 2009; Perazzi *et al*., 2010).

En el presente proyecto se planteó explorar el rango de antibiosis que la cepa de *Sphingomonas* sp. DS-204 presenta contra cepas de *Staphylococcus aureus,* las que fueron aisladas y caracterizadas fenotípicamente en el laboratorio clínico del Instituto de Seguridad Social y Servicio para Trabajadores del Estado de Puebla (ISSSTEP).

JUSTIFICACIÓN

Staphylococcus aureus es un patógeno nosocomial importante, presente en áreas quirúrgicas. Debido a que estos microorganismos se han tornado multirresistentes a los antibióticos utilizados en la clínica, es necesario investigar sobre las posibles sustancias alternativas a las que sean sensibles estas bacterias.

Algunas cepas de *Sphingomonas* sp. son productoras de sustancias con la capacidad de inhibir el crecimiento de 120 especies de 18 géneros bacterianos diferentes (Morales-García *et al*., 2009). Por lo tanto será importante conocer si las sustancias producidas por *Sphingomonas* sp. DS-204, inhiben el crecimiento de cepas clínicas de *S. aureus.*

Los genes que codifican para la síntesis de la(s) sustancia(s) inhibitoria(s) producida(s) por *Sphingomonas* sp. DS-204 no son conocidos. Es necesario iniciar estudios que conduzcan a la caracterización fenotípica y genotípica de las sustancias producidas por esta bacteria. Al identificar los genes implicados, se podría potenciar la producción de la(s) sustancia(s), así como para su manipulación genética con propósitos de marcaje, por lo que es importante contar con una mutateca de ésta cepa bacteriana.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto antagónico de *Sphingomonas* sp. DS-204 contra cepas de *Staphylococcus aureus*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar cepas presuntivas de *Staphylococcus aureus* de pacientes con problemas respiratorios, en el hospital del Instituto de Seguridad Social y Servicio para Trabajadores del Estado de Puebla (ISSSTEP).
- Caracterizar mediante pruebas bioquímicas los aislados presuntivos de *Staphylococcus aureus.*
- Determinar el perfil de susceptibilidad antibiótica de *Staphylococcus aureus.*
- Determinar el perfil de susceptibilidad antibiótica de *Sphingomonas* sp. DS-204.
- Determinar el espectro inhibitorio de *Sphingomonas* sp. DS-204 contra cepas de *S. aureus.*
- Obtener curva de crecimiento bacteriano para una cepa de *Sphingomonas* sp. DS-204 y otra curva de crecimiento para una cepa de *Staphylococcus aureus.*
- Establecer las condiciones para la mutagénesis de *Sphingomonas* sp.DS-204 usando transposones miniTn5-Km y obtener una banca de mutantes.

MATERIAL Y METODOS.

ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO
Toma de muestra de exudado bucofaríngeo.
Aislamiento de cepas presuntivas de *Staphylococcus.*
Indentificación mediante pruebas bioquímicas de las cepas de *Staphylococcus aureus.*
Búsqueda y selección de medios de cultivo para realizar ensayos de antibiosis
Experimentos de antibiosis simultánea entre cepas de *Sphingomonas* sp. DS-204 contra cepas de *S. aureus* en medio gelificado.
Experimentos de antibiosis en medio líquido entre una cepa de *Sphingomonas* sp. DS-204 contra otra cepa de, *S. aureus* para obtener curva de crecimiento de ambas cepas.
Mutagénesis
Inicio de banca de mutantes

Material biológico:

Para la realización del presente trabajo, se usaron las cepas mostradas en la Tabla 2 y se definen sus características generales.

BACTERIA	CARACTERÍSTICAS RELEVANTES	REFERENCIA
Staphylococcus aureus	Resistente a Antibióticos (Algunos de amplio espectro)	262 aislados de muestras bucofaríngeas
Staphylococcus aureus		32 cepas de *S. aureus* cepario del Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos (Arenas-Hernández 1986)
Sphingomonas sp. DS-204	Degradadora de Lindano Genes *lin*.	Rizorremediación (Böltner *et al*., 2008).

Tabla 2. Cepas bacterianas.

a) Aislamiento e identificación de cepas de *Staphylococcus aureus*.

Se realizaron 420 exudados faríngeos de pacientes con infección en vías respiratorias altas que acudieron a consulta externa al hospital ISSSTEP (Instituto de Seguridad Social al Servicio de Trabajadores del Estado de Puebla) durante el periodo mayo-septiembre 2009.

La toma de muestra se realizó usando un hisopo estéril, posteriormente los hisopos inoculados se estriaron en placas de Petri con medio agar Sal y Manitol y se incubaron a 30°C durante 24 h.

De ésta forma se inició la selección de colonias en las placas que fermentaron el manitol, al observar colonias que viraron el indicador Rojo de Fenol a color amarillo. Posteriormente se realizaron pruebas bioquímicas tales como catalasa, coagulasa y DNAsa.

De las placas sembradas anteriormente, se seleccionaron y resguardaron en glicerol, se seleccionaron 262 cepas por haber cumplido con las características fenotípicas con base a las pruebas bioquímicas.

También se tomó una población representativa de 32 cepas de *S. aureus* donadas por la D.C. Margarita María de la Paz Arenas Hernández, a las cuales previamente se les determinó la concentración mínima inhibitoria – CMI (Arenas-Hernández, 1986), de esta población se utilizaron 18 cepas de referencia de *S. aureus,* confirmadas en sus capacidades de crecer en medio sal y manitol y pruebas bioquímicas positivas. Estas cepas donadas fueron aisladas de pacientes que presentaron heridas expuestas, procesos de mala cicatrización o con infección en el área de Ortopedia y Traumatología del Hospital Universitario de Puebla - H.U.P. y mantenidas en crioalmacen (Agosto-Diciembre 1984).

b) Determinación del fenotipo de Resistencia a antibióticos de *Sphingomonas* sp. cepa DS-204.

Se tomó una colonia de *Sphingomonas* sp. cepa DS-204 y se sembró en un tubo Falcon con capacidad para 50 ml con volumen en ml de medio líquido LB,

este preinóculo se incubó durante 24 h a 30°C. Posteriormente se pipetearon 100 µl de preinóculo y se sembraron por estría masiva en una placa de Petri con medio LB y se incubó durante 24 h a 30 °C en presencia de Multidiscos con distintos antibióticos y su contenido en µg variable (BIO RAD, S.A. MULTIDISCOS* GRAM POSITIVOS CAT. 71080180, MULTIDISCOS* GRAM NEGATIVOS CAT. 71080280, MULTIDISCOS COMBINADOS* CAT. 71080380). (Tabla 3).

ANTIBIÓTICO	ABREVIA-TURA	CONTENI-DO APROXI-MADO EN µg	ANTIBIÓTICO	ABREVIA-TURA	CONTENI-DO APROXI-MADO EN µg
Amikacina (ag)	AK	30 µg	Cinoxacina (qn)	CIN	100 µg
Ampicilina (p)	AM	10 µg	Doxicilina (tt)	DC	30 µg
Ampicilina con Sulbactam (β-L)	SAM	10/10 µg	Eritromicina (mc)	E	15 µg
Amoxicilina c/ácido clavulánico	AmC	20/10 µg	Gentamicina	GE	10 µg
Carbenicilina (p)	CB	100 µg	Mezlocilina (p)	MZ	75 µg
Cefaclor (cfl)	CEC	30 µg	Nitrofurantoína (nf)	NF	1 µg
Cefalotina (cfl)	CF	30 µg	Netilmicina (ag)	NET	30 µg
Cefazolin (cfl)	CZ	30 µg	Ofloxacina (fqn)	OFX	5 µg
Cefepime (cfl)	FEP	30 µg	Oxacilina (p)	OX	1 µg
Cefoperazona (cfl)	CFP	75 µg	Penicilina (p)	P	10 unidades

Tabla 3. Características de los multidiscos usados en este estudio.

ANTIBIÓTICO	ABREVIATURA	CONTENIDO APROXIMADO EN µg	ANTIBIÓTICO	ABREVIATURA	CONTENIDO APROXIMADO EN µg
Cefotaxima (cfl)	CTX	30 µg	Piperacilina/Tazo Bactam (p)	TZP	100/10 µg
Cefotaxima (cfl)	CTX	30 µg	Piperacilina/Tazo Bactam (p)	TZP	100/10 µg
Cefotetan (cfl)	CTT	30 µg	Sulfametoxasol/ Tri Metoprim (ivf)	SXT	23.75/1.25 µg
Ceftazidima (cfl)	CAZ	30 µg	Tetraciclina	TE	30 µg
Ceftriaxona (cfl)	CRO	30 µg	Ticarcilina/Ácido Clavulánico (β-L)	TIM	75/10 µg
Cefuraxima (cfl)	CXM	30 µg	Vancomicina (gp)	VA	30 µg

Tabla 3. Características de los multidiscos usados en este estudio.

De acuerdo al Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, January 2014), los antibióticos usados en la tabla 3, se clasifican en clase y subclase, de los cuales usamos aminoglucósidos (ag), β-lactámicos (β-L), penicilinas (p), quinolonas (qn), fluoroquinolonas (fqn), tetraciclinas (tt), macrólidos (mc), cefalosporinas (cfl), nitrofurantoínas (nf), sulfonamidas (sfd), inhibidores vía folato (ivf) y glucopéptidos (gp).

Los puntos de corte para medir la resistencia de *Sphingomonas* sp. DS-204 a distintos antibióticos, estuvieron basados en los criterios de evaluación del CLSI, 2014 (Tabla 4).

Agente antimicrobiano	Disco-contenido	Diámetro (mm) Criterio interpretativo			MIC (µg/mL) Criterio interpretativo		
		S	**I**	**R**	**S**	**I**	**R**
X	30 µg	≥20	15-19	≤14	≤4	8-16	≥32
Y	_	_	_	_	_	_	_
Z	10 µg	≥16	_	_	≤1	_	_

Tabla 4. Criterio interpretativo de Resistencia/Susceptibilidad CLSI, (2014).
S: Susceptible, **I**: Intermedio, **R**: Resistente.

c) Pruebas de antibiosis en medio gelificado entre cepas de *Sphingomonas* sp. cepa DS-204 vs cepas de S*taphylococcus aureus* para determinar el espectro inhibitorio de la sustancia antagónica producida por *Sphingomonas* sp. cepa DS-204.

Para conocer el espectro inhibitorio de *Sphingomonas* sp. DS-204 sobre diferentes cepas de *S. aureus*, se efectuaron ensayos de inhibición simultánea (Aguilera-Méndez, 2009). Se realizaron precultivos de las cepas de *S. aureus* y *Sphingomonas* sp. DS-204 por separado en tubos Falcon con capacidad para 50 ml, con 10 ml de medio líquido Sal y Manitol para *S. aureus* y en otro tubo medio líquido con 10 ml de medio LB Sm^{30} para *Sphingomonas* sp. DS-204, a temperatura de 30°C, bajo agitación constante a 180 rpm durante 24 horas. Después del periodo de incubación se inocularon 100 µl de las cepas de *S. aureus* en medio de cultivo sólido LB Rojo Fenol mediante estría masiva.

Posteriormente se colocó un volumen de 10 µl de cultivo de *Sphingomonas* sp. cepa DS-204, en el centro de la placa de Petri preinoculada con la cepa estafilocócica, se dejaron secar, se incubaron a 30°C durante 24 h. Después del periodo de incubación, se determinó la presencia o ausencia de halos de inhibición. En las muestras donde se generaron halos inhibitorios se registraron los diámetros de los halos generados en las placas de Petri (Martínez-Lazalde *et al*., 2014).

d) Determinación de los perfiles de susceptibilidad de cepas de *Staphylococcus aureus* a distintos antibióticos.

Se seleccionaron 130 cepas estafilocócicas al azar para realizarles pruebas de Resistencia/Sensibilidad a distintos antibióticos usando Multidiscos (BIO RAD, S.A. MULTIDISCOS* GRAM POSITIVOS II CAT. 71080180, MULTIDISCOS* GRAM NEGATIVOS II CAT. 71080280, MULTIDISCOS COMBINADOS* CAT. 71080380).

Se incubaron cada una de las cepas estafilocócicas en tubos Falcon con capacidad de 50 ml, con 10 ml de Medio líquido LB; a 30°C durante 24 h, a 240 rpm. Se tomaron alícuotas de 100 µl de cada una de las cepas y se sembraron masivamente en placas de Petri con medio sólido LB, finalmente se colocaron los

multidiscos con diferentes antibióticos a diferentes concentraciones y se incubaron a 30°C durante 24 h. (Tabla 5).

ANTIBIÓTICO	ABREVIATURA	CONTENIDO APROXIMADO EN µg	ANTIBIÓTICO	ABREVIATURA	CONTENIDO APROXIMADO EN µg
Amikacina	AK	30 µg	Cefepime	FEP	30 µg
Ampicilina	AM	10 µg	Cefotaxima	CTX	30 µg
Cefalotina	CF	30 µg	Cefuraxima	CXM	30 µg
Ceftriaxona	CRO	30 µg	Levofloxacina	LEV	5 µg
Cloranfenicol	CL	30 µg	Tetraciclina	TE	30 µg
Dicloxacilina	DC	1 µg	Nitrofurantoina	NF	1 µg
Enoxacina	ENX	10 µg	Netilmicina	NET	30 µg
Eritromicina	E	15 µg	Penicilina	P	10 unidades
Gentamicina	GE	10 µg	Sulfametoxasol/Trimetoprim	SXT	23.75/1.25 µg

Tabla 5. Contenido antibiótico (µl) presente en los Multidiscos

De acuerdo al Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, January 2014), los antibióticos usados en la tabla 4, se clasifican en clase y subclase, de los cuales usamos aminoglucósidos (ag), penicilinas (p), fluoroquinolonas (fqn), tetraciclinas (tt), macrólidos (mc), cefalosporinas (cfl), nitrofurantoínas (nf), sulfonamidas (sfd), fenicoles (fnc) y azafluoroquinolonas (afqn).

Los puntos de corte para medir la resistencia de *Sthaphylococcus aureus* a distintos antibióticos, fueron basados de acuerdo a los criterios de evaluación del CLSI, 2014, pp30, 68-76.

e) Antagonismo bacteriano en medio líquido entre *Sphingomonas* sp. cepa DS-204 y *Staphylococcus aureus* para obtener curva de crecimiento bacteriano.

1. Búsqueda de medios de cultivo.

Se examinaron diferentes medios de cultivo, buscando como característica principal el crecimiento de la cepa estafilocócica y el no crecimiento de la cepa*Sphingomonas* sp. DS-204. Otro medio de cultivo selectivo en donde se permitiera el crecimiento de *Sphingomonas* sp. DS-204 y el no crecimiento de la cepa de *S. aureus* y un tercer medio de cultivo en donde pudieran crecer ambas cepas, con la finalidad de realizar experimentos de co-inoculación y monitorear selectivamente a las cepas implicadas. Los medios de cultivo explorados fueron Sal y Manitol, MM9-citrato, McConkey, LB, LB-benomilo (1 µg/ml), LB-rojo de fenol, LB Km^{80}.

Tanto la inoculación independiente como en mezcla fue realizada en medio líquido, permitiendo crecer a *S. aureus* sp. 99-1/118-14 y *Sphingomonas* sp. DS-204 y la mezcla de ambas a 30°C durante 24 horas a 240 rpm, evaluando el

crecimiento de cada cepa en los diferentes medios de selección. A continuación detallamos este experimento.

2. Experimento de Antagonismo en medio líquido.

Para conocer si la inhibición mostrada por *Sphingomonas* sp. DS-204 ocurre en un medio indeterminado (líquido), se eligió una cepa sensible de *S. aureus*. Tanto la cepa productora de la sustancia inhibitoria como la cepa sensible se incubaron en co-interacción y además en medios independientes. Para ello, se realizaron precultivos de la cepa de *S. aureus* en tubo Falcon con capacidad para 50 ml, conteniendo 10 ml de medio líquido sal y manitol y de la cepa de *Sphingomonas* sp. DS-204 en tubo Falcon con capacidad para 50 ml conteniendo 10 ml de caldo medio líquido LB Sm^{30} a 240 rpm, a 30°C durante 24 horas.

Cada cepa (*Sphingomonas* sp. DS-204, *S. aureus* sp. 99-1/118-14) se inoculó en 100 ml de medio líquido LB, tanto de forma independiente como en co-cultivo, usando matraces Erlenmeyer con capacidad para 250 ml. Para ello los cultivos de los preinóculos fueron inoculados en los nuevos medios, ajustando a una densidad óptica (D.O.) de 0.05 de absorbancia a 600 nm. Los cultivos se crecieron a 30°C, durante 24 horas bajo agitación constante de 240 rpm. Se incluyó un control de medio de cultivo sin bacteria en otro matraz Erlenmeyer con medio LB para cada ensayo.

El monitoreo del número de bacterias se realizó a lo largo de la curva de crecimiento para cada tratamiento (inoculaciones independiente y en co-interacción). Para ello, se tomaron alícuotas de 1 ml de medio de cada tratamiento

(once en total) y se cuantificó el número de bacterias presente por el método de goteo en placa (Herigstad *et al*., 2001), usando placas de Petri con medios selectivos respectivos (Sal y Manitol para *S. aureus* sp. 99-1/118-14, MacConkey para *Sphingomonas* sp. DS-204 y LB Rojo Fenol para la mezcla).

f) Mutagénesis

1. Selección de cepas bacterianas para establecer el experimento de mutagénesis

Cuando se requieren conocer los genes implicados en la biosíntesis de alguna sustancia inhibitoria se puede utilizar la metodología de mutagénesis al azar (Duque *et al*., 2007). Debido a que no se ha mutagenizado a *Sphingomonas* sp., fue necesario encontrar las condiciones adecuadas para realizar estos ensayos.

Se propuso utilizar mutagénesis triparental que consiste en usar tres cepas para la conjugación. Una cepa bacteriana donadora que contiene un plásmido con un cassette de Kanamicina dentro de un transposón miniTn5 (*Escherichia coli* cc118λpirpUT-Km) (Lorenzo *et al*., 1990; Curtiss, 1969). Una cepa bacteriana que facilita la transferencia del plásmido (*E. coli* pRK-600) y otra cepa receptora que fue *Sphingomonas* sp. DS-204 a la cual se le insertó el cassette de Kanamicina (Tabla 6).

BACTERIA	CARACTERÍSTICAS RELEVANTES	REFERENCIA
Escherichia coli cc118λpir	Con proteína λpir, Km^{80}, plásmido pUTKm.	(Lorenzo *et al*., 1990).
Escherichia coli RK-600	Contiene el plásmido RK-600= Cm^{20} ColE 1 oriV RK2mob^{+} tra^{+8}	(Lorenzo *et al*., 1990).
Sphingomonas sp. DS-204	Degradadora de Lindano,	(Böltner *et al*, 2005a; Böltner *et al*., 2008b; Aguilera-Méndez, 2009).

Tabla 6. Cepas utilizadas para la mutagénesis.

Se verificó que las cepas de *E. coli* no fueran susceptibles a la producción de sustancias inhibitorias producidas por *Sphingomonas* sp. DS-204.

En la tabla 7 se resumen los medios de selección empleados para el crecimiento de cada cepa bacteriana. Debido a que se debe permitir el evento de transposición.

MEDIOS DE CULTIVO	BACTERIA
LB Km^{80} (kanamicina) (sólido y líquido)	*Escherichia coli* cc118λpir
LB Cm^{20}(cloranfenicol) (sólido y líquido)	*Escherichia coli* RK-600
LB Sm^{30} (estreptomicina), LB Ben (Benomilo 1 µg/ml), MM9CitratoSm^{30} (sólido y líquido).	*Sphingomonas* sp. DS-204
LB Km^{80}, MM9CitratoKm^{80}, MMKm^{80}, LB Cm^{20} (sólido y líquido)	Selección de mutantes

Tabla 7. Medios de selección para la transposición.

2. Transferencia por Conjugación

La conjugación es la transferencia de genes de una célula procariota a otra por un mecanismo que implica contacto célula-célula y un plásmido (Madigan, *et al*. 2004).

La movilización del plásmido (no autotransferible) pUT-Km desde *E. coli* cc118λpir a *Sphingomonas* sp. DS-204 se realizó mediante la conjugación. El plásmido de *E. coli* cc118λpir (cepa donadora) fue transferido a *Sphingomonas* sp. DS-204 (cepa receptora*)* por medio de *E.coli* RK-600 (cepa auxiliar). Esto fue posible porque la cepa *E. coli* RK-600 es portadora de los genes *tra* encargados de las funciones de transferencia. El plásmido transferido a la cepa *Sphingomonas* sp. DS-204 (cepa receptora) es incapaz de replicarse porque esta cepa no produce la proteína lamda pir, y la única forma de que esta cepa resista a la kanamicina es siendo mutagenizada. Significa que el mini transposón se insertó en una zona del genoma de la cepa *Sphingomonas* sp. DS-204 (cepa receptora) donde se ubica el cassette de resistencia a kanamicina (Lorenzo, *et al*., 1990).

A éste sistema se le nombra tripartito o triparental (Imagen 1).

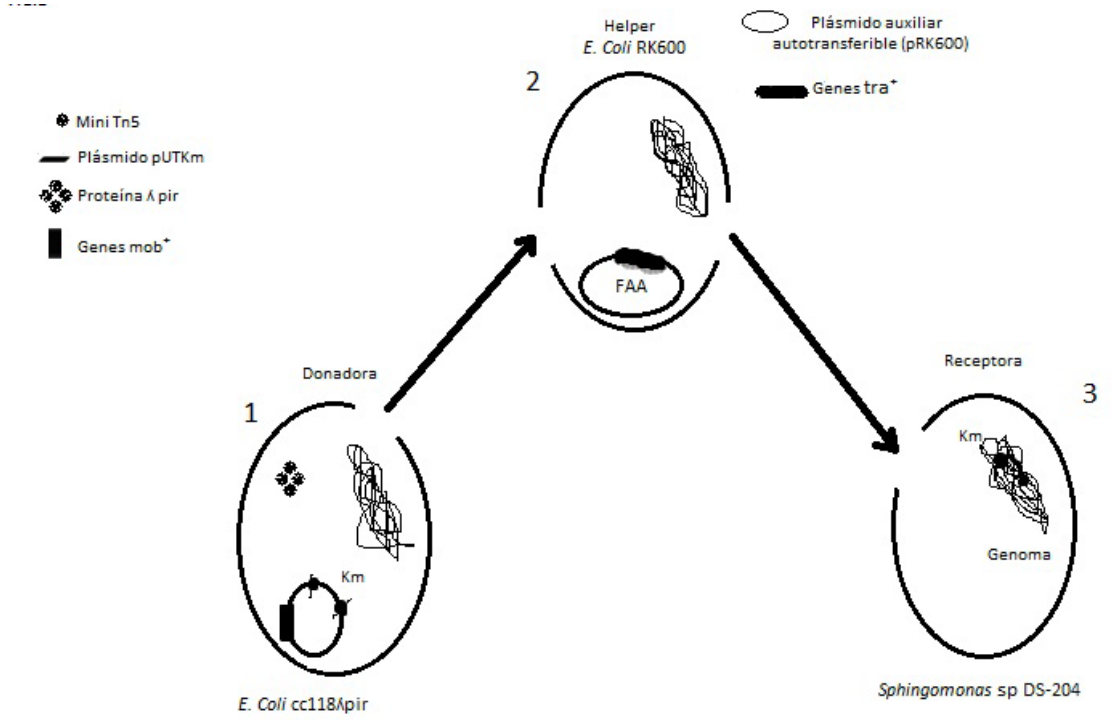


Imagen 1. Mutagénesis triparental. En esta figura se observa un ejemplo de la participación de tres cepas bacterianas para llevarse a cabo el experimento (Lorenzo, *et al*., 1990).

Con las cepas de *E. coli* cc118λpir*, E. coli* RK-600 *y Sphingomonas* sp*.* DS-204, se realizaron precultivos de 10 ml a los que se les midió la densidad óptica (D.O.) a 620 nM con el espectrofotómetro a 0.05 de ABS para cada cepa y se incubaron a 30^0 C durante 24 h. Transcurrido este lapso de tiempo se tomaron dos alícuotas de 500 µL de cada muestra perfectamente homogeneizada, una de ellas sirvió para la mezcla y la otra sirvió para realizar el control. Las alícuotas se colocaron en tubos Eppendorf y se centrifugaron a 12,000 revoluciones por minuto (rpm), durante 2 minutos. Después, se eliminó por pipeteo el sobrenadante y se lavó con 1 ml de medio LB, se agitó y se centrifugó a 12,000 rpm durante 2 minutos. Nuevamente se eliminó el sobrenadante de cada muestra. Se tomaron alícuotas de 500 µl de cada una de las cepas para realizar la mezcla, con un

volumen final de 1500 µl (con las tres bacterias juntas). La mezcla fue centrifugada, el sobrenadante se decantó y el paquete celular se resuspendió con el buffer restante. El pellet se inoculó en cajas de Petri con medio LB sólido, colocando en uno de los extremos exteriores de la caja de Petri una gota del inóculo, sin estriar la muestra. Se incubó durante 24 h a 30^0C para que se llevara a cabo la conjugación.

Las alícuotas de 500 µl de cada cepa bacteriana son los controles, se procesaron de forma similar y de manera independiente. Una vez pasado el tiempo de incubación, tanto de la mezcla como de las cepas individuales, se recolectó el crecimiento bacteriano adicionando 1 ml de agua destilada, estéril, sobre la colonia, esta suspensión se mezcló suavemente y se le adicionó un total 3 ml de agua, la mezcla fue aspirada con una micropipeta y depositada en un tubo Falcon de 15 ml de capacidad. De ésta mezcla se realizaron diluciones 1:10 seriadas hasta la 7. Cada una de las diluciones fueron plaqueadas en medio MM9-citrato-Km^{80}, MM9-citrato, LB-Km^{80} y LB. Las bacterias se incubaron durante 24 h a 30 ^{0}C. El mismo procedimiento se les realizó a los controles.

Los controles se colectaron de igual forma con 3 ml de agua estéril cada uno por separado y se colocaron en 3 tubos Falcon con capacidad de 15 ml. Se realizaron 7 diluciones 1:10 para cada una de las cepas bacterianas y se plaquearon en su medio de selección y en placas de Petri con MM9-citrato-Km^{80}.

Las mutantes que llegaron a crecer en las placas con MM9-citrato-Km^{80} se picaron con la ayuda de palillos estériles y se resembraron en nuevas placas de Petri con medio MM9-citrato-Km^{80} para asegurar que son mutantes verdaderas y no *E. coli* creciendo como satélites. Las colonias que presentaron resistencia al antibiótico fueron transferidas a placas de Petri con medio LB-Km^{80}, para verificar la morfología típica de la cepa de *Sphingomonas* sp. DS-204.

Las clonas fueron conservadas en 10 ml de medio LB $km^{80}Sm^{30}$ líquido hasta fase estacionaria del que se tomaron 500 µl de cada cepa más 500 µl de glicerol y se almacenaron a -80^0C. Es importante resaltar que *Sphingomonas* sp. DS204 crece de forma natural en estreptomicina.

Para comprobar que las mutantes resistentes a la Km corresponden a la especie *Sphingomonas* sp. DS204; realizamos un ensayo de extracción de ADN genómico también se extrajo el ADN total de la cepa silvestre tomándola como referencia. Para lo cual se usó el kit Promega y se siguió el protocolo de extracción. También realizamos un ensayo de extracción de DNA plasmídico para comprobar o descartar la existencia de plásmidos en las cepas mutantes, usando el kit Promega. En ambos casos el material genético fue visualizado en geles de agarosa.

RESULTADOS

Se tomaron 420 muestras de exudados bucofaríngeos de pacientes del Laboratorio Clínico del ISSSTEP, 262 cepas resultaron positivas a las pruebas bioquímicas, razón por la que en este trabajo se designaron como *Staphylococcus aureus*.

En total se exploraron 280 cepas designadas como *S. aureus* (262 cepas de *S. aureus* provenientes de exudados bucofaríngeos y 18 cepas de *S. aureus* donadas provenientes del area de ortopedia y traumatología del HUP) y fueron resguardadas en glicerol a -80°C.

a) Determinación de perfil de susceptibilidad antibiótica de *Sphingomonas* sp. DS-204.

Se exploró el patrón de susceptibilidad a distintos antibióticos usando multidiscos (Tabla 3) Se encontró que la cepa *Sphingomonas* sp. DS-204, bajo los criterios determinados por el CLSI 2014 (pp30), es susceptible a los siguientes antibióticos: Cefepime, Ofloxacina, Mezlocilina, Cefoperazona, Piperacilina /Tazobactam, Ceftazidima, Ceftriaxona, Tetraciclina, Ampicilina, Gentamicina, Cefotaxima y Netilmicina, mostrando halos inhibitorios variables de ≥ 16- 20 mm de diámetro (Tabla 8).

La cepa resultó resistente a los siguientes antibióticos: Ampicilina con Sulbactam, Cefazolin, Cefotetan, Nafcilin, Cefaclor, Vancomicina, Amoxicilina con ácido Clavulanico, Penicilina, Oxacilin, Ticarcilina con ácido Clavulánico, Cefalotina, Eritromicina, Sulfametoxasol con Trimetoprim, Cefotaxima, Cefuraxima, Doxiciclina, Penicilina y Carbenicilina; entre los que destacamos a la Estreptomicina; ya que este antibiótico es económico y de fácil adquisición (Tabla 8). Las cepas de *S. aureus* también son resistentes a este antibiótico.

RESISTENCIA-R		**SENSIBILIDAD-S**		**RESISTENCIA-R**	**SENSIBILIDAD-S**
CF^{30}		CAZ^{23} (20 mm Ø)	CRO^{26}	SAM^{20}	FEP^{30} (no creció)
E^{38}		TE^{68} (22 mm Ø)		CZ^{30}	OFX^{5} (22 mm Ø)
AM^{4}		GE^{40} (25 mm Ø)		CTT^{30}	MZ^{75} (20 mm Ø)
SXT^{66}	NF^{49}	FEP^{13} (20 mm Ø)		NF^{1}	CFP^{75} (no creció)
CTX^{18}	CI^{30}		NET^{52}	CEC^{30}	TZP^{110} (21 mm Ø)
CXM^{27}	CB^{9}			VA^{30}	
DC				AmC^{30}	
PE				P^{10}	
				OX^{1}	
				TIM^{85}	

Tabla 8. Perfil de susceptibilidad antibiótica de *Sphingomonas* sp. DS-204.
R: Resistencia. **S:** Sensibilidad.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la tabla 7, la cepa *Sphingomonas* sp. DS-204, se considera multirresistente ya que presenta resistencia a más de dos familias de antibióticos (Cornaglia *et al*., 2004) (Tabla 9).

FAMILIA DE ANTIBIÓTICOS	ANTIBIÓTICOS
Penicilinas	PE, AM, DC
Macrólidos	E
Aminoglucósidos	NET, GE, AK
Fluoroquinolonas	LEV
Inhibior vía folato	SXT
Cephem	CF, CRO, FEP, CTX, CXM
Fenicol	CL
Azafluoroquinolonas	ENX
Nitrofurantoína	NF
Tetraciclina	TE

Tabla 9. Familias de antibióticos presentes en los multidiscos usados en el presente trabajo.

La cepa *Sphingomonas* sp. DS-204 crece en medios LB, LB Rojo Fenol, LB Sm^{30}, MM9Citrato, LB Manitol y MacConkey. Sin embargo no crece en LB Km^{80}, ni tampoco en Sal y Manitol, ni en LB Cm^{20}. Debido a que *Sphingomonas* sp. DS-204 está reportada como tolerante a tóxicos orgánicos de tipo lindano (hexaclorociclohexano) (Böltner *et al*., 2008). En este trabajo se corroboró su resistencia a benomilo (1 µg/ml); un compuesto tóxico para el ambiente

(Rodríguez-Andrade, 2009). La cepa resultó resistente a benomilo, razón por la que un medio de selección para crecer *Sphingomonas* sp. DS-204 fue LB Sm^{30}, benomilo (1 µg/ml). Las cepas de *Staphylococcus aureus* se incubaron en medio Sal y Manitol, en LB Sm^{30}, pero no fueron capaces de crecer en medio MacConkey, ni en LB-Km^{80}. En función de los resultados obtenidos, los medios de selección propuestos para experimentos de antibiosis en medio indeterminado (líquido), fueron MacConkey para *Sphingomonas* sp. DS-204, Sal y Manitol para cepas de *Staphylococcus aureus* y se usó medio LB Rojo de Fenol Sm^{30} para el crecimiento simultáneo de ambas cepas.

b) Rango de antagonismo de *Sphingomonas* sp. DS-204 vs cepas de *Staphylococcus aureus*.

Las 280 cepas de *S. aureus* se sometieron a experimentos de antagonismo por inhibición simultánea (Aguilera, 2009). Se usó la cepa *Sphingomonas* sp. DS-204 para determinar su espectro inhibitorio. En estos experimentos se usó LB-rojo de fenol Sm^{30} como medio de soporte. Se observó que las cepas *Staphyloccoccus aureus* mostraron halos inhibitorios producidos por cepas *Sphingomonas* sp. DS-204 (ANEXO 2), (Imagen 2).

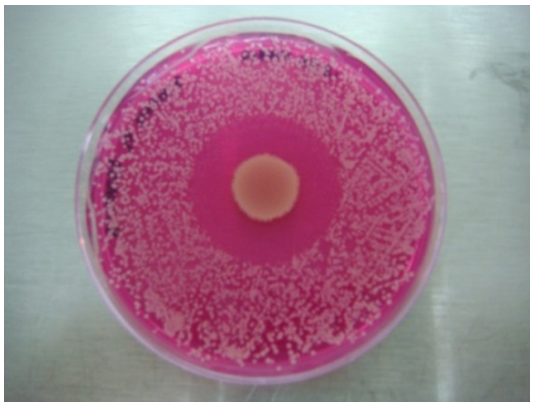


Imagen 2. Antagonismo de *Sphingomonas* sp. DS-204 contra *S. aureus* sp. cepa 99-1/118-14

En esta imagen, se observó antagonismo bacteriano con un halo inhibitorio de 10 mm, producido por la cepa *Sphingomonas* sp. DS-204 ubicada al centro de la placa, contra la cepa *Staphylococcus aureus* sp. 99-1/118-14, ubicada alrededor.

Se observó que la cepa *Sphingomonas* sp. DS-204, produjo halos inhibitorios de diferentes diámetros en más de la mitad de las cepas de *S. aureus.* El 64.6 % de las cepas de *S. aureus* mostraron halos inhibitorios de diámetros variables producido por cepas de *Sphingomonas* sp. DS-204 (Tabla 10).

Cepas de *S. aureus*	**Total de cepas 280**	**Porcentajes: 100 %**
Cepas con halo inhibitorio Ø 1 mm –18 mm	181	64.6 %
Cepas sin halo inhibitorio	99	35.4 %

Tabla 10. Resultados de antagonismo producido por cepas de *Sphingomonas* sp. DS-204 frente a cepas de *S. aureus*.

En los ensayos de antibiosis de *Sphingomonas* sp. DS-204 contra 280 cepas estafilocócicas, se obtuvieron resultados variables, el 37.4 % de cepas mostraron halos inhibitorios de 1 mm a 4 mm de diámetro y el 27% mostraron halos inhibitorios mayores a 5 mm hasta 18 mm. (Tabla 11) (Fig. 3).

DIÁMETRO DE HALO INHIBITORIO	NÚMERO DE CEPAS SIN/CON HALO INHIBITORIO	PORCENTAJE DE CEPAS NO INHIBIDAS E INHIBIDAS (n=280)
Ø 0 mm	99	35.4 %
Ø 1 mm	28	10 %
Ø 2 mm	37	13.2 %
Ø 3 mm	32	11.4 %
Ø 4 mm	08	2.8 %
Ø 5 mm	23	8.2 %
Ø 6 mm	19	6.7 %
Ø 7 mm	14	5 %
Ø 8 mm	05	1.78 %
Ø 9 mm	05	1.78 %
Ø 10 mm –18 mm	10	3.5 %

Tabla 11. Diámetros de halos de inhibición de cepas de *S. aureus* en experimento de antibiosis frente a *Sphingomonas* sp. cepa DS-204; a distintos intervalos de tiempo, iniciando antagonismo a partir de las 24 horas (Anexo 2).

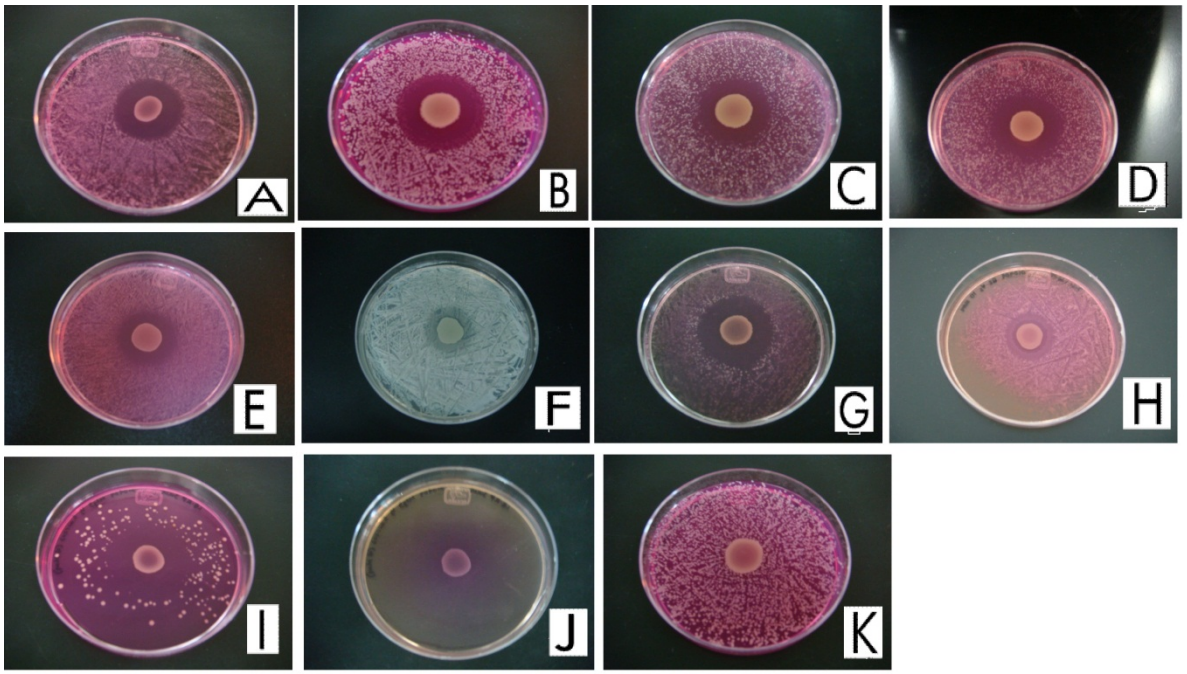
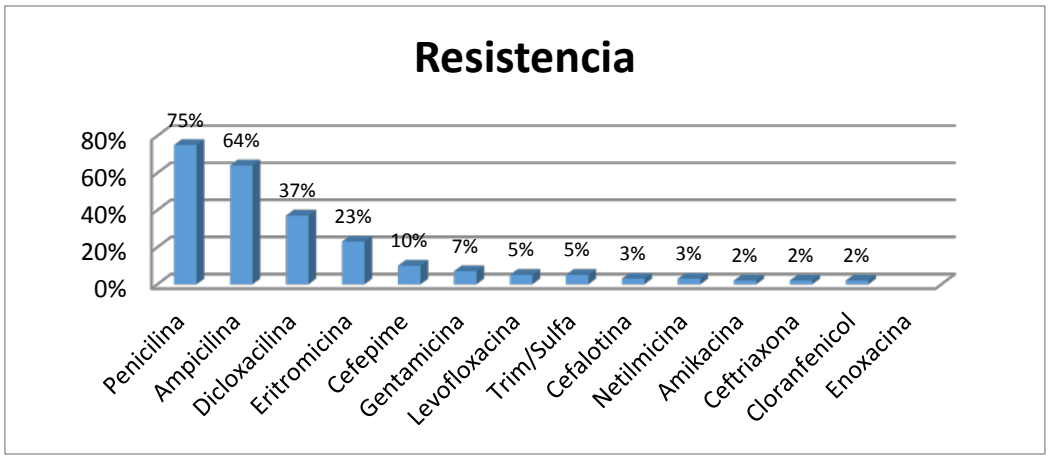


Imagen 3. Antagonismo bacteriano entre *Sphingomonas* sp. DS-204 y distintas cepas de *S. aureus*. En las imágenes se aprecian halos inhibitorios de diferentes diámetros producidos por la cepa *Sphingomonas* sp. DS-204 al centro de la placa contra diferentes cepas estafilocócicas estriadas en toda la placa en medios de cultivo sólido LB Sm^{30} con rojo de Fenol y LB Sm ^{30} sin rojo de Fenol (F). En algunas placas se aprecian colonias bien definidas, en una de las placas con rojo de Fenol no existe crecimiento de la cepa estafilocócica también por inhibición (J) y en otra placa no presentó antagonismo (K).

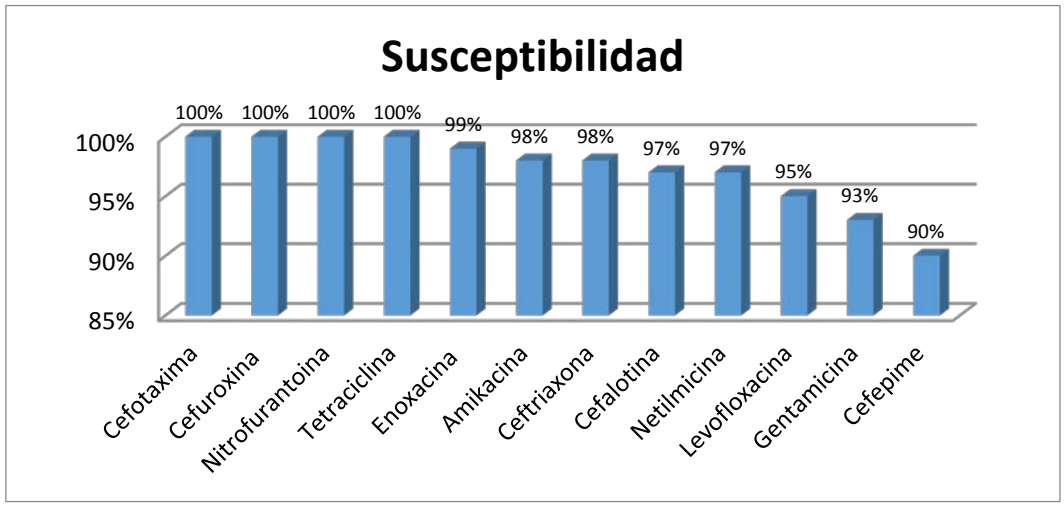
c) Perfil de susceptibilidad de 130 cepas estafilocócicas seleccionadas al azar.

Se exploró el patrón de susceptibilidad de 130 cepas seleccionadas al azar de *S. aureus* a 18 antibióticos diferentes, (Tabla 5). En este trabajo se encontró que algunas de estas cepas estafilocócicas fueron resistentes a los siguientes antibióticos: Penicilina (PE), Ampicilina (AM), Eritromicina (E), Dicloxacilina (DC), Trimetoprim/Sulfametoxazol (SXT), Cefalotina (CF), Cloranfenicol (CL), Cefepime (FEP), Gentamicina (GE), Levofloxacina (LEV), Amikacina (AK), Ceftriaxona (CRO), Netilmicina (NET). Se observó que algunas cepas estafilocócicas

presentaron halos inhibitorios de diferentes diámetros frente a los siguientes antibióticos: Enoxacina (ENX), Cefalotina (CF), Cefotaxima (CTX), Cefuroxina (CXM), Gentamicina (GE), Levofloxacina (LEV), Tetraciclina (TE), Amikacina (AK), Ceftriaxona (CRO), Cloranfenicol (CL), Netilmicina (NET), Nitrofurantoina (NF), Cefepime (FEP) (Gráficas 1,2).



Gráfica 1. Porcentajes de los resultados en las pruebas de resistencia antibiótica de 130 cepas estafilocócicas (R-Resistencia).



Gráfica 2. Porcentajes de los resultados en las pruebas de susceptibilidad antibiótica de 130 cepas estafilocócicas (S-Susceptibilidad)

Las bacterias muetran R-Resistencia a las siguientes familias de antibióticos: penicilinas 37-75%, macrólidos 23%, aminoglucósidos 2-7%, fluoroquinolonas 5%, inhibidores de vía folato 5%, cephem 2-10%, fenicol 2%. Y presentan S-Susceptibilidad a aminoglucósidos en un 93-98%, fluoroquinolonas 95%, cephem 90-100%, azufluoroquinolonas 99%, nitrofurantoina 100%, tetraciclina 100%.

Se considera a una cepa bacteriana como multirresistente, cuando es resistente a más de dos antibióticos que pertenecen a diferentes familias (Cornaglia, *et al*. 2004).

Con base en estos datos, se observó que el 83 % de las 130 cepas estafilocócicas mostró resistencia a más de un antibiótico.

El 6.1 %, resultó multirresistente. El 16.9 % de las cepas estafilocócicas no mostró resistencia antibiótica. El 6.1 % de las cepas estafilocócicas, no mostró resistencia antibiótica ni fue inhibida por la cepa *Sphingomonas sp*. DS-204. El 19.2 % de las cepas mostró resistencia a dos familias diferentes de antibióticos. El 94 % de las cepas resultó susceptible a uno o más antibióticos y finalmente el 73 % de éstas, mostró halos inhibitorios de 1 mm - 10 mm frente a *Sphingomonas* sp. DS-204 (Tabla 12, 13)

No. Cepa	Resisten-cia Antibiótica	Diámetro de Halo Inhibitorio vs DS-204. (Número de cepa estafilocócica).	No. Cepa	Resistencia Antibiótica	Diámetro de Halo Inhibitorio vs DS-204. (Número de cepa estafilocócica).
1	**-**	// (28)	66	**-**	5 mm (168)
2	PE,AM,E	1 mm (40)	67	**-**	6 mm (207)
3	DC	// (55)	68	PE,AM,DC	// (227)
4	PE,AM	// (60)	69	PE,AM,DC	1 mm (96)
5	PE, AM	8 mm (43)	70	PE, AM, DC, FEP	1 mm (161)
6	PE, AM, SXT	2 mm (53)	71	PE, AM	8 mm (30)
7	PE,AM	// (73)	72	PE, E, DC	1 mm (65)
8	PE,AM	6 mm (97)	73	PE, AM, DC	// (154)
9	PE,AM	// (83)	74	AM	3 mm (179)
10	PE,AM	6 mm (128)	75	GE, SXT	6 mm (36)
11	PE	1 mm (108)	76	AM	// (38)
12	PE, E, AM	// (111)	77	AM	6 mm (42)
13	PE, AM, E	2 mm (117)	78	AM, LEV	2 mm (183)
14	PE,AM	4 mm (24)	79	AM	1 mm (91)
15	-	3 mm (35)	80	AM	6 mm (41)
16	-	2 mm (19)	81	-	// (90)
17	PE,AM	10 mm (12)	82	AM	6 mm (10)
18	PE,AM	10 mm (99)	83	AM,GE	5 mm (156)
19	PE,E	3 mm (103)	84	AM	6 mm (171)
20	PE,AM,E	7 mm (244)	85	AM	// (209)
21	DC	// (258)	86	AM	1 mm (114)
22	-	// (241)	87	AM,SXT	6 mm (46)
23	PE,AM,E	2 mm (132)	88	AM	// (140)
24	-	//	89	AM	1 mm (91)
25	PE,AM	1 mm (146)	90	AM	1 mm (169)
26	PE	1 mm (47)	91	AM	// (192)
27	PE,AM	// (186)	92	PE,DC	5 mm (66)
28	PE	7 mm (63)	93	AM,PE,GE,DC	// (230)
29	PE,AM	7 mm (238)	94	PE,DC	// (198)
30**MR**	PE,AM,E,DC ,CF	2 mm (80)	95 **MR**	AM,PE,E,DC,ENX	10 mm (1)
31	PE,AM	// (225)	96 **MR**	AM,PE,GE,SXT,C RO,NET,AK	12 mm (264)
32	-	7 mm	97	AM,PE,DC	3 mm (58)
33	PE,AM,E	6 mm (138)	98	AM,PE,DC	2 mm (86)
34	PE,AM,DC	9 mm (13)	99	AM,PE,DC	// (236)
35	E	5 mm (145)	100	AM,PE,DC	1 mm (76)
36	PE	4 mm (50)	101	PE	3 mm (249)
37**MR**	PE,AM,E,DC ,CF	6 mm	102	AM,PE,DC,CF	18 mm (268)
38	E,CL	7 mm ((153)	103 **MR**	AM,PE,E,CF	// (119)
39	PE,AM,E	13 mm (15)	104	AM,PE,DC	// (85)
40	PE,AM,E	8 mm (100)	105	AM,PE,DC	6 mm (52)
41	PE,AM	6 mm (152)	106	E	// (233)

MR: Cepas estafilocócicas multirresistentes.

--: Sin Resistencia antibiótica. ***//*:** Sin formación de halo inhibitorio.

No. Cepa	Resisten-cia Antibiótica	Diámetro de Halo Inhibitorio vs DS-204. (Número de cepa estafilocócica).	No. Cepa	Resistencia Antibiótica	Diámetro de Halo Inhibitorio vs DS-204. (Número de cepa estafilocócica).
42	PE,AM,DC,S	2 mm (187)	107	**-**	// (75)
43	XT	10 mm (269)	108	PE	2 mm (105)
44	PE,DC	10 mm (279)	109	**-**	// (267)
45	PE	8 mm (5)	110	AM,PE,E,DC	7 mm (272)
46	PE,DC	9 mm (23)	111	E	12 mm (271)
47	DC	6 mm (8)	112	**-**	1 mm (217)
48	PE, AM	5 mm (166)	113	AM, PE	// (189)
49	PE, AM	6 mm (196)	114	AM,PE,DC	// (92)
50	**-**	10 mm (246)	115	AM,PE,DC	7 mm (2)
51	**-**	9 mm (148)	116	AM,PE,DC	// (175)
52	**-**	10 mm (204)	117	**-**	2 mm (259)
53**MR**	**-**	9 mm (141)	118	**-**	// (199)
54	PE,AM,E,DC	7 mm (112)	119	AM,PE,DC	// (213)
55**MR**	,FEP	5 mm (144)	120 **MR**	AM,PE,E,DC,GE,N	2 mm (87)
56	PE,AM,DC,F	8 mm (16)	121	ET	7 mm (251)
57	EP	3 mm (164)	122	AM,PE	// (194)
58	PE,AM,E,DC	9 mm (18)	123	AM,PE,DC	6 mm (67)
59	,FEP	// (201)	124	AM,PE,E,DC	3 mm (149)
64	PE	2 mm (137)	129	AM,PE,E,DC	1 mm (134)
65	PE,AM	6 mm (3)	130	AM,PE,DC	// (275)
	-			**-**	
	PE,AM				
	-				
	PE,AM,E,DC				

MR: Cepas estafilocócicas multirresistentes.
--**:** Sin Resistencia antibiótica. ***//*****:** Sin formación de halo inhibitorio.

Tabla 12. Perfiles de resistencia antibiótica de 130 cepas de *S. aureus* y los halos de inhibición producidos por *Sphingomonas* sp. DS-204.

Cepas resistentes (R) a más de un antibiótico (25 % n= 130)	Cepas multirresistentes (MR) (6.1 % n=130)	Cepas susceptibles (S) (16.9 % n=130)
Ø 1 mm – 2.3 %	Ø 2 mm – 1.5 %	Ø 1 mm – 0.7 %
Ø 2 mm – 5.3 %	Ø 5 mm – 0.7 %	Ø 2 mm – 3 %
Ø 3 mm – 1.5 %	Ø 6 mm – 0.7 %	Ø 3 mm – 0.7 %
Ø 4 mm – 00	Ø 9 mm – 0.7 %	Ø 5 mm – 0.7 %
Ø 5 mm – 1.5 %	Ø 10 mm – 0.7 %	Ø 6 mm – 1.5 %
Ø 6 mm – 4.6 %	Ø 12 mm – 0.7 %	Ø 7 mm – 0.7 %
Ø 7 mm – 3 %	// sin halo – 0.7 %	Ø 9 mm – 1.5 %
Ø 8 mm – 0.7 %		Ø 0 mm – 1.5 %
Ø 9 mm – 0.7 %		// sin halo – 6.1 %
Ø 10 mm – 0.7 %		
Ø 12 mm – 0.7 %		
Ø 13 mm – 0.7 %		
Ø 18 mm – 0.7 %		
// sin halo – 2.3 %		

Tabla 13. Porcentajes de Resistencia/Susceptibilidad-Multirresistencia a diferentes antibióticos de 130 cepas estafilocócicas y sus diferentes diámetros inhibitorios frente a la cepa *Sphingomonas* sp. DS-204.

d) Antagonismo en medio líquido entre *Sphingomonas* sp. DS-204 y *Staphylococcus aureus*.

Se eligió la cepa de *S. aureus* 99-1/118-14 (ANEXO 2), que mostró un halo de inhibición de 10 mm ante la presencia de *Sphingomonas* sp. DS-204.

1. Selección de medios de cultivo para el crecimiento de *Sphingomonas* sp. y *S. aureus*.

Seleccionamos medios de cultivo con la finalidad de llevar a cabo experimentos de antagonismo en medio líquido. Encontrando que el medio Sal y Manitol permitió el crecimiento de *S. aureus* sp. 99-1/118-14 y donde no puede |crecer *Sphingomonas* sp. DS-204. El medio MacConkey permitió el crecimiento de *Sphingomonas* sp. DS-204 y no el de *S. aureus* 99-1/118-14 (Tabla 14).

Se hicieron crecer por separado las cepas *Sphingomonas* DS-204 en medio MacConkey y la cepa *Staphylococcus aureus* 99-1/118-14 en medio Sal y Manitol, para posteriormente incubarlas co-interactuando en medio LB $Sm^{3°}$.

De esta manera evaluamos el antagonismo simultáneo en medio líquido entre ambas cepas en base a la actividad antagónica de la cepa DS-204.

MEDIO DE CULTIVO	***Sphingomonas* sp.DS-204**	***S. aureus* 118-14.**
Medio Sal y Manitol.	NC	C
LB Sm^{30}.	C	C
MacConkey	C	NC

Tabla 14. Medios de cultivo seleccionados para experimento de antagonismo en medio líquido
C: Con crecimiento bacteriano en el medio de cultivo.
NC: Sin crecimiento bacteriano en el medio de cultivo.

2. Experimento de Antagonismo en medio líquido.

Se observó que la cepa *Sphingomonas* sp. DS-204 tuvo un crecimiento en medio MacConkey en forma independiente así como cuando crece en medio LB $Sm^{3°}$ en coinoculación con la cepa estafilocócica sensible.

La cepa *Staphylococcus aureus* creció adecuadamente en medios Sal y Manitol y LB $Sm^{3°}$ de forma independiente, pero el crecimiento de esta bacteria fue afectado cuando crece en medio LB $Sm^{3°}$ en co-inoculación con la cepa *Sphingomonas* sp. DS-204.

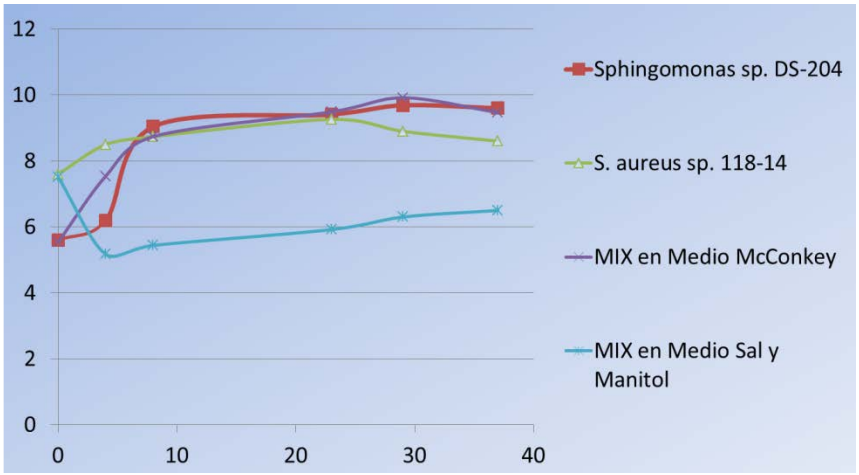
Se observó que a pesar de que la cepa *S. aureus* sp. 99-1/118-14 fue afectada en su crecimiento, esta cepa logró sobrevivir en números bajos (6.5 UFC en comparación con el crecimiento de Sphingomonas sp. DS204 la cual creció 9.47 UFC a las 29 horas) lo que implica que en esta condición, la inhibición no es tan fuerte como la observada en placa.

En la mezcla en medio LB Sm³° en donde crecen ambas cepas, observamos que la cepa *Sphingomonas* sp. DS-204 se mantuvo en fase de latencia durante las primeras 4 horas para posteriormente entrar en fase exponencial durante las siguientes 64 horas; en las siguientes 37 horas decreció y se mantuvo en fase estacionaria.

En la mezcla en LB Sm³°, observamos que la cepa estafilocócica 99-1/118-14, se mantuvo en fase de latencia durante las primeras horas, en las siguientes 4 horas comenzó a decrecer ante la actividad antagónica de la cepa DS-204 pero se recuperó y se mantuvo en fase exponencial casi indetectable a partir de las 12 horas posteriores hasta la culminación del experimento (Tabla 16; Gráfica 3).

TIEMPO (Horas).	0	4	8	23	29	37
***Sphingomonas* sp. DS-204. MacConkey (UFC)**	5.6	6.2	9.04	9.41	9.69	9.6
***S. aureus*sp.99-1/118-14. Sal y Manitol (UFC)**	7.6	8.5	8.74	9.26	8.9	8.6
Mezcla en Medio McConkey. LBSm³º (UFC)	5.54	7.54	8.74	9.49	9.92	9.47
Mezcla en Medio Sal y Manitol. LBSm³º (UFC)	7.51	5.17	5.44	5.92	6.3	6.5

Tabla 15. Experimento de antagonismo en medio líquido.



Gráfica 3. Curva de crecimiento bacteriano-antibiosis.
Gráfica morada *Sphingomonas* en co-cultivo. Gráfica azúl, *S. aureus* en co-cultivo. X: TIEMPO en Horas. Y: Crecimiento Bacteriano en Log UFC/m

e) Mutagénesis

En el presente trabajo, como la cepa *Sphingomonas* sp. DS-204 inhibe a diferentes cepas bacterianas; se experimentó con la presencia de cepas de *E. coli* para saber si podrían causarle alguna inhibición para posteriormente efectuar la mutagénesis. Al realizar los experimentos de antibiosis los resultados fueron negativos a la inhibición.

Se observó que la cepa *Sphingomonas* sp. DS-204 creció sin formar halo inhibitorio contra las cepas de *E. coli* RK-600 y *E. coli* cc118λpir usadas para la mutagénesis triparental.

Con estos resultados se confirmó que se podía llevar a cabo la mutagénesis triparental.

Se observó que al estriar masivamente tres colonias de las cepas *E. coli* y colocarles al centro una alícuota de 10 µl al de la cepa DS-204, no se obtuvo un halo inhibitorio por lo que la cepa *Sphingomonas* sp. DS-204 no antagoniza a ninguna de las dos cepas de *E. coli* que se usan para la mutagénesis triparental (Imagen 4).

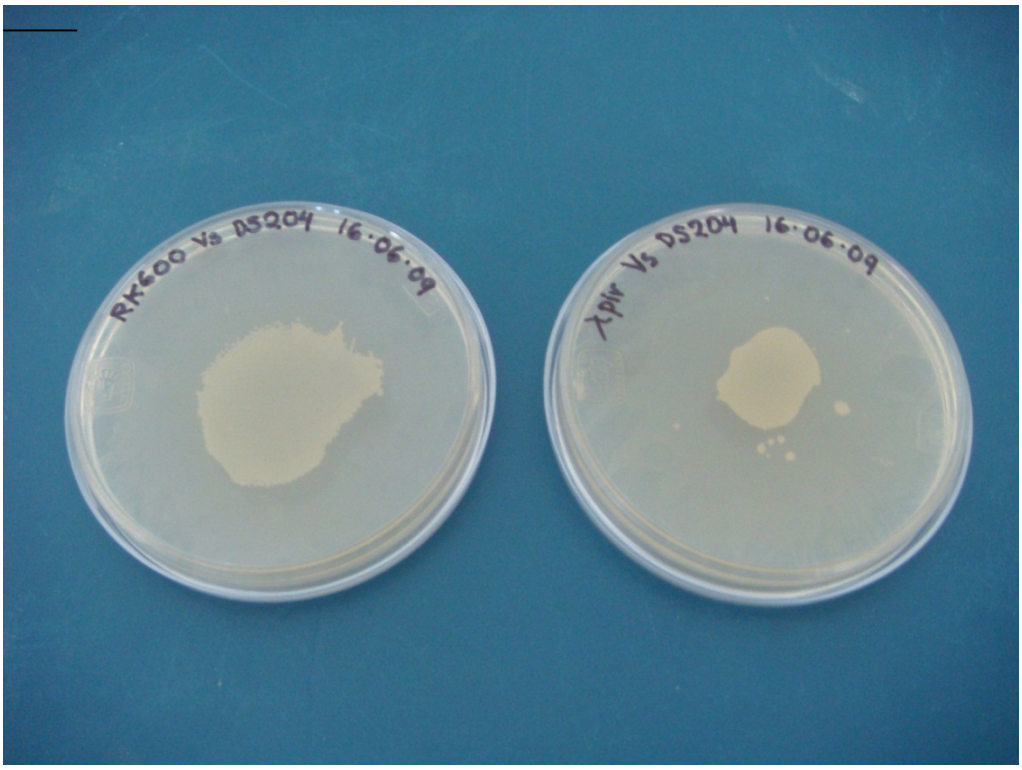


Imagen 4. Cepas *E. coli* RK-600 y *E.coli cc*118λpir no antagonizadas por *Sphingomonas* sp. DS-204.

En los diferentes experimentos de mutagénesis que se realizaron se lograron rescatar 900 mutantes. Estas mutantes representan el inicio de una banca de mutantes resguardadas a -80ºC. Estas mutantes servirán para realizar experimentos de antagonismo contra cepas de *S. aureus* para buscar las cepas mutantes que pierden la capacidad de antagonizar a la cepa sensible.

Posteriormente se podrán estudiar los genes involucrados en la biosíntesis de la sustancia inhibitoria.

DISCUSIÓN

Staphylococcus. aureus es una bacteria patógena cuyo problema sigue vigente dentro de los hospitales a nivel mundial ya que muchas cepas se han tornado multirresistentes a los antibióticos de uso comercial dirigidos contra el patógeno (Bernal *et al*., 2009). Esta bacteria se encuentra en la flora normal bacteriana humana, sin embargo; causa múltiples daños en pacientes inmunocomprometidos ya que afecta mucosas, sistema musculoesquelético, corazón, provocando daños irreversibles y resultando en la mayoría de los casos enfermedades mortales por lo que resulta importante investigar otros métodos de tratamiento para combatir a las cepas estafilocócilas (Mehta, *et al*. 2007; Rosenthal, *et al*., 2008; Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2007; Wiersma, *et al*., 2009).

En el presente trabajo se seleccionaron 280 cepas que resultaron positivas a pruebas de indentificación fenotípica para *S. aureus*, encontrando que el 64.6 % de ellas son sensibles a la actividad antagónica producida por *Sphingomonas* sp. DS204. Docientos sesenta y dos cepas provinieron de pacientes ambulatorios con infecciones en vías respiratorias altas y 18 cepas fueron aisladas de pacientes hospitalizados en el área de traumatología y ortopedia, este género bacteriano, puede ser aislado dentro de los hospitales y más importante aún dentro de quirófanos que han sido desinfectados previamente; lo cual significa un problema nosocomial (Velazquez-Meza, *et al*., 2013).

Sphingomonas sp. DS-204 es una cepa que ha resultado ser altamente competitiva en ambientes rizosféricos y en suelo (Böltner *et al*., 2008; Aguilera-

Méndez, 2009). Esta cepa es capaz de inhibir a miembros de diversos géneros y especies (Morales-García *et al*., 2009). Por ejemplo inhibe el crecimiento de cepas benéficas y cepas patógenas para humanos y plantas, tales como *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Bradyrhizobium*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus fecalis*, *Staphylococcus aureus*, entre otras (Morales-García, 2010).

En el experimento de antagonismo en medio sólido, se observó que *Sphingomonas* sp. DS-204 inhibió con diámetros variables en sus halos inhibitorios (1 mm - 18 mm) al 64.9 % de las cepas estafilocócicas aisladas, de las cuales, el 6.1 % de 130 cepas exploradas al azar resultó multirresistente, presentando halos inhibitorios desde 2 mm hasta 12 mm de diámetro.

Lo que significa que la(s) sustancia(s) inhibitoria(s) producidas por *Sphingomonas* sp. DS-204 podría(n) ser una estrategia como tratamiento alternativo contra *Staphylococcus aureus*. Razón por la que la caracterización de esta(s) sustancia(s) es relevante.

Mientras que en los experimentos de antagonismo en medio líquido, se observó que la cepa *Sphingomonas* sp. DS-204 antagonizó de manera efectiva a la cepa *S. aureus* 118-14, desde su etapa de crecimiento exponencial, *Sphingomonas* sp. DS-204 detuvo el crecimiento de *S. aureus* sp. 99-1/118-14 hasta su fase de crecimiento estacionaria. Sin embargo esta inhibición resultó mas efectiva en medio sólido; donde se observaron halos de inhibición.

Resaltando lo anteriormente expuesto y debido al amplio rango de sustancias inhibitorias producidas por bacterias es muy difícil tener estrategias

universales de purificación y de caracterización de los genes que codifican para estas sustancias (Riley & Wertz, 2002a). Sin embargo, hay dos pasos generales que podrían ayudarnos a entender la naturaleza química de la sustancia inhibitoria. El primero consiste en intentar concentrar y purificar a la sustancia inhibitoria por métodos químicos, lo cual resulta difícil debido a que se desconoce justamente cuál es la naturaleza de la sustancia. La otra forma es mutagenizando al azar el genoma con el propósito de saber qué genes están involucrados en la biosíntesis de la sustancia inhibitoria (Murray *et al*., 2009; Curtiss, 1969; Chavan *et al*., 2005).

En este trabajo se plantearon las bases de la mutagénesis para *Sphingomonas* sp. DS-204, en donde realizaron ensayos de antibiosis de las cepas “helper” y donadora contra la cepa DS-204 para confirmar que se podía llevar a cabo la mutagénesis triparental, posteriormente se buscaron los medios de selección con sus respectivos antibióticos para cada una de las cepas participantes y finalmente, se obtuvieron las mutantes.

Sin embargo; al momento no se han reportado trabajos de mutagénesis de en *Sphingomonas* sp. DS-204, por lo que se tuvo que iniciar con las condiciones que permitieran mutagenizar esta bacteria. Se exploraron mutagénesis biparentales (no mostrado) y mutagénesis triparentales. La mutagénesis triparental fue la que ofreció buenos resultados para introducir un cassette de Km al azar en el genoma de la cepa productora, usando a los transposones miniTn5 (Murray *et al*., 2009).

Observando que la mutagénesis triparental es efectiva al lado de la mutagénesis biparental aunque esto sólo es la base, pues puede significar el hecho de contar con una banca de mutantes en la cual ya se puede buscar aquella mutante defectuosa en la producción de la-s sustancia-s inihibitoria-s, y es el principio de la caracterización de los genes estructurales.

Por lo tanto es importante destacar que *Sphingomonas* sp DS-204 antagoniza de manera efectiva a más de la mitad de cepas de *S. aureus*.

Este es el inicio de investigaciones para conocer la(s) sustancia(s) que antagonizan el crecimiento de cepas de *S. aureus* utilizando una banca de mutantes para posteriormente conocer el gen involucrado en la producción de la sustancia antagónica y de esta manera llevarlo a estudios para crear un nuevo fármaco para el mejoramiento de la salud pública.

Finalmente es importante mencionar que durante las pruebas de mutagénesis la cepa *Sphingomonas* sp. DS-204 se mostró poco accesible para la inserción fácil del cassette de Km por lo que confirmamos que esta cepa es difícil de mutagenizar con respecto a otras cepas bacterianas en donde se logró crear una mutatéca (Corral-Lugo, 2010).

CONCLUSIONES

- *Sphingomonas* sp DS-204 tiene un efecto antagónico sobre el 64.6% de las cepas de *S. aureus* analizadas.
- El 6.1 % de las 130 cepas de *S. aureus* son multirresistentes.
- Las cepas multirresistentes, en el experimento de antagonismo bacteriano en medio sólido, formaron halos inhibitorios contra cepas de *Sphingomonas* sp. DS-204 que van de los 2 mm hasta 12 mm de diámetro y una cepa sin formar halo inhibitorio.
- *Sphingomonas* sp DS-204 provoca antagonismo en 7 de 8 cepas de *S. aureus* multirresistentes
- La capacidad antagónica de la cepa *Sphingomonas* sp DS-204 contra las cepas de *Staphylococccus aureus* es más efectiva en medio sólido que en médio líquido.
- Sphingomonas sp. DS-204 es una cepa multirresistente.
- El 19.2 % de las cepas mostraron resistencia a dos familias diferentes de antibióticos, de la misma forma, no presentando halos inhibitorios y presentando halos con diámetros variables en presencia de *Sphingomonas* sp. DS-204.
- Establecimos las bases para la mutagénesis al azar de la cepa Sphingomonas sp. DS-204.
- Se mutagenizó a Sphingomonas sp. DS-204 con una taza baja de mutagénesis.

PERSPECTIVAS

Cabe destacar que la cepa *Sphingomonas* sp. DS-204 tiene un alto potencial inhibitorio contra cepas de *S. aureus* multirresistentes a antibióticos de amplio espectro, lo que concede a este trabajo el inicio de un gran trayecto por la búsqueda de alguna sustancia benéfica para disminuir de manera importante a la cepa patógena oportunista en pacientes inmunocomprometidos, buscando los genes responsables para la biosíntesis de la(s) sustancia(s) inhibitoria(s).

Es posible que mediante un sistema de mutagénesis al azar se podría estudiar la cepa *Sphingomonas* sp. DS-204, para realizar la búsqueda de genes involucrados en la biosíntesis de las posibles sustancias inhibitorias, sin embargo la taza de mutagénesis es muy baja.

También se podrían caracterizar molecularmente las cepas de *Staphylococcus aureus*.

BIBLIOGRAFÍA

Abee, T., Klaenhammer, T., & Letellier, L. (1994). Kinetic studies of the action of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus johnsonii* that forms poration complexes in the cytoplasmic membrane. Appl Environ Microbiol, 60(3):1006-13.

Aguilera-Méndez, N. (2009). Búsqueda de sustancias inhibitorias en *Sphingomonas* sp. (Tésis de Licenciatura). Facultad de Biología BUAP. Biblioteca Central BUAP.

Ahmed E., and Holmström S. J. M. (2014). Siderophores in environmental research: roles and applications. Microb. Biotechnol. 7(3):196-208. doi:10.1111/1751-7915.12117

Arenas-Hernández, M. M. P. (1986). Búsqueda de Plásmidos como posibles determinantes de resistencia a los Aminoglucósidos en cepas de *Staphylococcus aureus*. (Tesis de Licenciatura). Facultad de Ciencias Químicas BUAP. Biblioteca Central BUAP.

Barreto, D., Valero, N., Muñoz, A., & Peralta, A. (2007). Efecto de Microorganismos Rizosféricos sobre Germinación y Crecimiento Temprano de *Anacardium excelsum*. Universidad Popular del Cesar (Colombia). Recuperado de http://revistas.concytec.gob.pe/scielo.php?pid=S1814-89212007000100019&script=sci_arttext

Bernal, P., Zloh, M., & Taylor, P. (2009). Disruption of D-alanyl esterification of *Staphylococcus aureus* cell wall teichoic acid by the {beta}-lactam

resistance modifier (-)-epicatechin gallate. J Antimicrob Chemother, 63(6):1156-62. doi: 10.1093/jac/dkp094.

Böltner, D., Moreno-Morillas, S., & Ramos, J. L. (2005). 16S rDNA phylogeny and distribution of lin genes in novel hexachlorocyclohexane-degrading *Sphingomonas* strains. Environ Microbiol, 7(9):1329-38.

Böltner, D., Godoy, P., Muñoz-Rojas, J., Duque, E., Moreno-Morillas, S., Sánchez, L., & Ramos, J. L. (2008). Rhizoremediation of lindane by root-colonizing *Sphingomonas*. Microb Biotechnol, 1(1):87-93. doi: 10.1111/j.1751-7915.2007.00004.x.

Boukhalfa, H., & Crumbliss, A. (2002). Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. Biometals, 15(4):325-39.

Broadbent, J. R., Gummalla, S., Hughes, J. E., Johnson, M. E., Rankin, S. A., & Drake M. A. (2004). Overexpression of *Lactobacillus casei* D-hydroxyisocaproic acid dehydrogenase in cheddar cheese. 70(8):4814-20.

Bruno, M., & Montville, T. (1993). Common mechanistic action of bacteriocins from lactic Acid bacteria. Appl Environ Microbiol, 59(9):3003-10.

Caballero, J., (2012). Actualización en Farmacología Clínica: MACRÓLIDOS. Revista Paceña de Medicina Familiar. Recuperado de http://mflapaz.com/Revista_6/revista_6_pdf/11%20macrolidos.pdf

Cases, & De Lorenzo. (2005). Genetically modified organisms for the environment: stories of success and failure and what we have learned from them. Int Microbiol, 8(3):213-22.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2007). Severe methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* community-acquired pneumonia associated with influenza--Louisiana and Georgia, December 2006-January 2007. MMWR Morb Mortal Wkly Rep., 56(14):325-9.

Chavan, M., Rafi, H., Wertz, J., Goldstone, C., & Riley, M. (2005). Phage associated bacteriocins reveal a novel mechanism for bacteriocin diversification in *Klebsiella*. J Mol Evol., 60(4):546-56.

CLSI (2014). Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S24. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement.

Cornaglia, G. (2004). European recommendations for antimicrobial resistance surveillance. Clin Microbiol Infect., 10: 349–383.

Curtiss, R. (1969). Bacterial Conjugation. Annual Review of Microbiology. Vol., 23:69-136.

Deo, P., Karanth, N., & Karanth, N. (1994). Biodegradation of hexachlorocyclohexane isomers in soil and food environment. Crit Rev Microbiol, 20(1):57-78.

Elango, V., Kurtz, H. Jr., Anderson, C., & Freedman, D. (2011). Use of γ-hexachlorocyclohexane as a terminal electron acceptor by an anaerobic enrichment culture. J Hazard Mater, 197:204-10. doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.09.080.

Elein, T. A., Leyva, A., & Hernández, A. (2005). Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (*Lycopersiconesculentum*, Mill). Rev. Colomb. Biotecnol., 7:47-54.

Frioni, L. (1999). Procesos Microbianos. Editorial de la fundación Universidad Nacional de Rio Cuarto. Argentina. Recuperado de http://www.fagro.edu.uy/~microbiologia/Procesos%20Microbianos.pdf

Gardner, A., West, S., & Buckling, A. (2004). Bacteriocins, spite and virulence. Proc Biol Sci., 271(1547):1529-35.

Gould, F., MRSA, Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. (2009). Guidelines 2008 for the prophylaxis and treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in the United Kingdom. J Antimicrob. Chemother, 63(5):849-61. doi: 10.1093/jac/dkp065.

Hatt, H., (1980). American Type Culture Collection Methods: I. Laboratory manual on preservation, freezing and freeze-drying. American Type Culture Collection. Rockville.

Herigstad, B., Hamilton, M., & Heersink, J., (2001). How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. J Microbiol Methods, 1;44(2):121-9.

Hugenholtz, P., & Pace, N. R. (1996). Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. Trends Biotechnol, 14(6):190-7.

Hughes, J.B.,Hellman J.J., […],& Bohannan. B.J.M., (2001). Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. Appl. Environ. Microbio, 67(10):4399-4406.

Jawetz, E., Melnick, & Adelberg. (2008). *MICROBIOLOGÍA MÉDICA DE JAWETZ, MELNICK Y ADELBERG.* (19ª Ed). Editorial Manual Moderno, México; 702-703 p.

Kerr, R.A. (1997). Life goes to extremes in the deep earth-and else where. Science, 276:703-704.

Kirsop, B., & Doyle, A. (1991). Maintenance of microorganisms and cultures cells. Academic Press. London.

Lapage, S.; Shelton, J.; Mitchell, T., & Mackenzie, A. (1970) Culture collection and the preservation of bacteria. Methods in Microbiology. Vol. 3. Academic Press. London.

Leahy, J.G., & Colwell, R. R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiol Rev., 54(3):305-15.

Leifert, C., Sigee, D.C., Stanley, R., Knight, C., & Epton, H. A. S. (1993). Biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Alternaria brassicicola* on Dutch white cabbage by bacterial antagonists at cold-store temperatures. Plant Pathology Volume 42.2007.DOI: 10.1111/j.1365-3059.1993.

Li, W., Rokni-Zadeh, H., De Vleeschouwer, M., Ghequire, M., Sinnaeve, D., Xie, G., De Mot, R. (2013). The antimicrobial compound xantholysin defines a new group of *Pseudomonas* cyclic lipopeptides. PLoS One., 8(5):e62946. doi: 10.1371/journal.pone.0062946.

Lorenzo, V., Herrero, H., Jakubzik, U., & Timmis, K. (1990). Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal

insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. J. Bacteriol, 172 (11):6568-6572.

Lowe, S.E., Jain, M. K., & Zeikus, J.G. (1993). Biology, Ecology and Biotechnological Applications of Anaerobic Bacteria Adapted to Environmental Stresses in Temperature, pH, Salinity, or Substrates. Microbiological Reviews, 57:451-509.

Lucy, M., Reed, E., & Glick, B. R. (2004). Applications of free living plant growth-promoting *Rhizobacteria*. Antonie van Leewenhoek, 86(1):1-25.

(a). MacFaddin, J. (2003). *PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DE IMPORTANCIA CLÍNICA. Sección 1. PRUEBAS BIOQUÍMICAS INDIVIDUALES*. (3ª Ed.). EDITORIAL MEDICA panamericana. p73, 98-109.

Madigan, M., Martinko, & J., Parker, J. (Eds), (2004). *Brock, Biología de los Microorganismos*. (10ª Ed.) Editorial PEARSON Prentice Hall, Madrid, 58-59 p.

Malgor, L.A., Valsecia,M.E. (1999). Antibióticos de Amplio Espectro: Tetraciclinas, Cloramfenicol, Macrólidos, p. 34-45. In L.A. Malgor & M.E. Valsecia (eds.). Farmacologìa médica, Cátedra de Farmacología Facultad de Medicina, Universidad Nacional del Noreste, Argentina. Sección V: Capítulo 32. Recuperado de:http://med.unne.edu.ar/catedras/farmacologia/temas_farma/volumen3/cap32_tetrcloreritro.pdf

Martínez-Lazalde, J.E., Arenas-Hernández, M.M., Morales-García, Y.E., Bustillos-Cristales, M.R., Hernández-Tenorio, A.L., Juárez-Hernández, D., Muñoz-Rojas, J. (2014). Antagonismo bacteriano entre cepas *Sphingomonas* sp. DS-204 contra 280 cepas de *Staphylococcus aureus*. XI Encuentro "Participación de la Mujer en la Ciencia". Modalidad *Poster*, MS-0100/14.Medicina y Ciencias de la Salud. S2-MCS16.

Mehta, A., Rosenthal, Mehta, Chakravarthy, Todi, Sen … Damani, (2007). Device-associated nosocomial infection rates in intensive care units of seven Indian cities. Findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC). J Hosp. Infect., 67(2):168-74.

Mella, M., Sepúlveda, A., González, R., Bellot, H., Domínguez, Y., Zemelman, Z., & Ramírez, G. (2004). ANTIMICROBIANOS. Aminoglucósidos-aminociclitoles: Características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia. Rev Chil Infect., 21 (4): 330-338.

Morales-García, Y., Herrera, M., & Muñoz, J. (2007). Cloranfenicol, un antibiótico clásico como alternativa en el presente. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 38(1):58-69. Recuperado de: http://www.researchgate.net/publication/235902810_Cloranfenicol_un_antibitico_clsico_como_alternativa_en_el_presente.

Morales-García, Y.(2007). Bacterias preservadas. Una fuente importante de recursos biotecnológicos.

Morales-García, Y., Aguilera-Méndez, N., Huerta-Gómez, A., Fuentes-Ramírez, & Muñoz-Rojas, J. (2009). Evaluación del antagonismo entre bacterias de

interés agrícola y formulación de un inoculante multiespecies. Memoria VI encuentro "Participación de la mujer en la Ciencia". *In extenso*. Biotecnología y Ciencias agropecuarias. ISBN: 978-607-95228-0-3. León. Guanajuato, México.

Morales-García, Y.E., Martínez-Lazalde, J.E., Montenegro-Camacho, G., Huerta-Gómez, M.C., Muñoz-Rojas, J., (2010) Antagonismo entre bacterias mediante inhibición simultánea. PROCESOS CELULARES FUNDAMENTALES, Manual de Prácticas de Laboratorio. Pérez y Terrón R., Ediciones Color 2000. P 278.

Munoz, J. M., Sabith, A., Richards, A., Loake, G., Watson, M., & Shaw, C. (1998). Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli towards flavonoid inducers of the symbiotic nodulations genes. J. Gen. Microbial, 134:2741-2746.

Muñoz-Rojas, J., Martínez-Romero, E., & Martínez, J. (Eds), (2004). Microbios en línea (2ª Ed.). UNAM-AMM. Recuperado de http://www.researchgate.net/publication/235953137_Bacteriocinas_una_estrategia_de_competencia_microbiana_propuesta_como_alternativa_de_antibiticos_dirigidos_para_el_futuro_humano

Murray, P., *et al*. (2009). *Microbiología Médica, Mosby*. (6ª Ed.). Editorial Elsevier. España, 158-159 p.

Nalin, R., Simonet, P., Vogel, T., & Normand, P. (1999). *Rhodanobacterlindaniclasticus* gen. nov., sp. nov., a lindane-degrading bacterium. Int J Syst Bacteriol, 49 Pt 1:19-23.

Nápoles, J., & Ábalos, A. (s/f). Biorremediación de Ecosistemas Contaminados con Xenobióticos. Universidad de Oriente. Facultad de Ciencias Naturales. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Recuperado de http://es.scribd.com/doc/114365494/bioremediacion

Nawab, A., Aleem, A., & Malik, A. (2003). Determination of organochlorine pesticides in agricultural soil with special reference to gamma-HCH degradation by *Pseudomonas* strains. Bioresour Technol, 88(1):41-6.

Nelson D.L., Cox M.M. (2008) Lehninger Principios de bioquímica, 4ª Edición. Pp 17

Okeke, B., Siddique, T., Arbestain, M., & Frankenberger, W. (2002). Biodegradation of gamma-hexachlorocyclohexane (lindane) and alpha-hexachlorocyclohexane in water and a soil slurry by a *Pandoraea* species. J Agric Food Chem, 24;50(9):2548-55.

Pace, N.R. (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. Science, 276:734-740.

Perazzi, B., Camacho, M., Bombicino, K., Flores, Z., Vay, C., & Famiglietti, A. (2010). *Staphylococcus aureus*: nuevos y antiguos antimicrobianos. Revista Argentina de Microbiología, 42:199-202.

Pérez y Terrón, R., González-Montfort, T., Muñoz-Rojas, J., (2014). Antagonismo microbiano asociado a cepas bacterianas provenientes de jitomate

(*Lycopersicum esculentum* Mill) y maíz (*Zea Mays*). Revista Iberoamericana de Ciencias, ISSN 2334-2501.

Ramos, J. L., González, M. M., Caballero A., & Eillewijn, P. (2005). Biorremediation of polynitrated aromatic compounds: plants and microbes put up a fight. Current Opinion Biotech, 16(3):275-281.

Riley, M., Pinou, T., Wertz, J., Tan, Y., & Valletta, C. (2001). Molecular characterization of the klebicin B plasmid of *Klebsiella pneumoniae*. Plasmid., 45(3):209-21.

(a) Riley, M., & Wertz, J. E. (2002). Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. Biochimie, 84(5-6):357-64.

(b) Riley, M., & Wertz, J. E. (2002). BACTERIOCINS: Evolution, Ecology and Application. Rev. Microbiol, 56:117-37

Rivas, C., & Mota, M. (2006). *TEMAS DE BACTERIOLOGÍA Y VIROLOGÍA MÉDICA*. *Sección 21. BACTERIAS ANAEROBIAS*. (4ª Ed.). Editorial Higiene Edu.,. 355-380 p. Recuperado de http://es.scribd.com/doc/220360818/Temas-de-Bacteriologia-y-Virologia-Medica

Rodríguez, M., González, J., Barreto, J., Alonso, L., Areu, A., & Pardo, A. (1998). TETRACICLINAS. ACTA MÉDICA. Cuba., 8(1):75-9

Rodríguez-Andrade O. (2009). Estrés abiótico sobre bacterias benéficas. (Tésis de Maestría). Facultad de Biología BUAP. Biblioteca Central BUAP.

Rosenthal, V., Maki, D., & Graves, N. (2008). The International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC): goals and objectives, description of surveillance methods, and operational activities. Am J Infect Control., 36(9):e1-12.doi: 10.1016/j.ajic.2008.06.003.

Sablon, E., Contreras, B., & Vandamme, E. (2000). Antimicrobial peptides of lactic acid bacteria: mode of action, genetics and biosynthesis. Adv Biochem Eng Biotechnol, 68:21-60.

Sahl, H., & Bierbaum, G., (1998). LANTIBIOTICS: Biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. Annu. Rev Microbiol, 52:41-79

Singh, B., Kuhad, R., Singh, A., Tripathi, K., & Ghosh, P. (2000). Microbial degradation of the pesticide lindane (gamma-hexachlorocyclohexane). Adv Appl Microbiol, 47:269-98.

Suárez P., & Reyes R. (2002). La incorporación de metales pesados en las bacterias y su importancia para el ambiente. Interciencia, vol. 27, núm. 4. Asociación Interciencia Venezuela, 160-164 p. Recuperado de http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33906702

Tabata, M., Ohtsubo, Y., Ohhata, S., Tsuda, M., & Nagata, Y. (2013). Complete Genome Sequence of the γ-Hexachlorocyclohexane-Degrading Bacterium *Sphingomonas* sp. Strain MM-1. Genome Announc, 1(3). pii: e00247-13. doi: 10.1128/genomeA.00247-13.

Tu, C. M. (1976). Utilization and degradation of lindane by soil microorganisms. Arch Microbiol, 108(3):259-63.

Velazquez-Meza M.(2013). Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* causing nosocomial infections in five medical centers of Monterrey, Nuevo León, México from 2005-2009. Arch Med Res., 44(7):570-4. doi: 10.1016/j.arcmed.2013.09.001.

Vining, L. & Westlake, D. (1984). Chloramphenicol: properties, byosinthesis and fermentation, p. 387-411. In Vandamme, E.J. (ed.), Bio/Technology of Industrial Antibiotics, Marcel Dekker, New York.

Wiersma, P.(2009). Surveillance for severe community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. Epidemiol Infect., 137(12):1674-8. doi: 10.1017/S0950268809002490.

Yuan, J., Raza, W., Huang. Q., & Shen, Q. (2012). The ultrasound-assisted extraction and identification of antifungal substances from *B. amyloliquefaciens* strain NJN-6 suppressing *Fusarium oxysporum*. J Basic Microbiol., 52(6):721-30. doi: 10.1002/jobm.201100560.

ANEXOS

ANEXO 1. Caracterización bioquímica de los aislados presuntivos de *S. aureus*.

a. Prueba de Tinción de Gram

Las bacterias pueden dividirse en dos grandes grupos debido a su envoltura celular. Gram positivas y Gram negativas ya que por su composición se tiñen de diferente color. (Madigan *et al.*, 2004). Para realizar la tinción de Gram se llevó a cabo el siguiente método:

Se realizó un frotis fijado al calor en portaobjeto con un precultivo de cada una de las cepas de *S. aureus*, al cual se adicionó solución cristal violeta durante un minuto, se enjuagó con agua. Después se agregó solución de lugol durante 1 minuto.

Todas las células siguen del mismo color azul-violeta. Se procedió a decolorar brevemente con alcohol-acetona (alrededor de 20 segundos). Las células Gram positivas siguen de color azul-violeta mientras que las Gram negativas se decoloran.

Se adicionó el colorante de contraste (safranina) durante 1 minuto. Las células Gram positivas (G^+) retienen el colo azul-violeta y las Gram negativas (G^-) se tiñen de color rosa o rojo. En este trabajo se le realizaron pruebas de Gram (+) para las cepas presuntivas de *Staphylococcus* (Jawetz, *et al*., 2008; Murray, *et al*., 2009).

b. Prueba bioquímica de Catalasa para identificar *Staphylococcus aureus*

La catalasa es una enzima producida por *S. aureus*, que cataliza la descomposición de peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es un residuo del metabolismo celular de muchos organismos vivos con función protectora contra microorganismos patógenos (Rivas *et al*., 2006).

Método en portaobjeto.

1.- Con una aguja de inoculación, recoger el centro de la colonia pura de un cultivo de 18 a 24 h y colocar sobre un portaobjeto de vidrio limpio.

2.- Colocar una gota de H_2O_2 al 30 % sobre la suspensión bacteriana usando un portaobjeto con un gotero o pipeta Pasteur. No invertir el orden del procedimiento ya que pueden ocurrir resultados falsos positivos. No es necesario mezclar el H_2O_2 y el cultivo.

3.- “Observar la producción inmediata de burbujeo (liberación de gas) y registrar el resultado” (Macfaddin., *et al*.,2003, p 73).

Para su determinación se colocó una colonia de *S. aureus* presuntiva en un portaobjetos con ayuda de una aza bacteriológica estéril, posteriormente se colocó una gota de H_2O_2 y se seleccionaron los portaobjetos que reaccionaron burbujeando en contacto con la colonia.

S. aureus es positiva a esta reacción.

c. Prueba bioquímica de Coagulasa para identificar *Staphylococcus aureus*.

“La coagulasa es una proteína producida por cepas de *Staphylococcus aureus* la cual reacciona con la protrombina presente en sangre, formando el complejo

staphylothrombina, permitiendo que una proteasa convierta el fibrinógeno en fibrina, revistiendo la superficie bacteriana y resistiendo de esta forma la fagocitosis, dando como resultado la coagulación de la sangre" (Macfaddin, *et al*.,2003, p 98-109). *Staphylococcus aureus* produce coagulasa ligada y coagulasa libre. Para detectar la coagulasa ligada ("Factor de Clumping") se realiza una prueba en portaobjetos y para la coagulasa libre se realiza una prueba de coagulasa en tubo. En éste trabajo sólo se realizó la prueba de coagulasa libre. La prueba consistió en inocular un tubo de ensayo que contenía plasma, con una colonia presuntiva de *Staphylococcus*, se incubaron los inóculos a 37°C durante 18 h. Se seleccionaron los tubos que formaron coágulo.

d. Prueba bioquímica de Desoxirribonucleasa (DNAsa) para identificar *Staphylococcus aureus*.

Para la prueba de DNAsase utilizó DNase Test Agar, para diferenciar a los microorganismos con base en la actividad de desoxirribonucleasa (DNAsa).

S. aureus produce DNAsa termoestable que es detectable en este medio. Esta prueba se utiliza principalmente como confirmación diagnóstica.Existe una correlación excelente entre la coagulasa y la actividad de la DNAsa de los estafilococos aislados de muestras clínicas" (Macfaddin, *et al*.,2003, p 109).

La triptona, uno de los componentes del medio, proporciona nutrientes para el crecimiento. El cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico. El alto nivel de ácido desoxirribonucleico molecular hace posible la detección de la desoxirribonucleasa (DNAsa) que despolimeriza el ADN.

La prueba consistió en estriar una placa que contenía ADN en el medio de cultivo, posteriormente se incubó la placa a 37°C durante 24 h. Después de la incubación, la placa se inundó con ácido clorhídrico durante 2 min, lo que provocó la precipitación del ADN polimerizado e hizo al medio opaco. En algunas placas se observaron zonas transparentes alrededor del área de crecimiento debido a que el ADN fue degradado por la bacteria; por lo tanto el resultado de la prueba dio positivo a la DNAsa. Las colonias de *S. aureus* no presentaron zonas transparentes alrededor de las colonias ya que mostraron un resultado negativo a la DNAsa . Esta prueba se utiliza principalmente en la identificación de *Staphylococcus aureus* y su diferenciación de *S. epidermidis* u otros estafilococos, estos últimos dan un resultado negativo a la DNAsa. Tanto las cepas de *Staphylococcus aureus* como de *Serratia marcescens* pueden presentar resultado positivo a la DNAsa. Sin embargo, *S. aureus* es Gram positivo mientras que *S. marcescens* es Gram negativo.

e) Crioalmacen de cepas identificadas como *Staphylococcus aureus* (conservación en glicerol).

Las cepas identificadas como *S. aureus* se incubaron durante 24 horas a 30°Cen placas de Petri con medio Sal y Manitol, para después incubarlas bajo las mismas condiciones de tiempo y temperaturaen matraces Erlenmeyer con medio líquido Sal y Manitol. Se conservaron cada una de las cepas confirmadas como *S. aureus* en medio LB adicionado con glicerol al 50 %, tomando de los inóculos previamente crecidos en medio líquido; 500 µl de precultivo que se colocaron en

tubos Eppendorf con capacidad de 1 ml y que contenían 500 µl de glicerol (1:1 v/v) para resguardalos bajo congelación a -20°C (Lapage *et al*., 1970; Kirsop *et al*., 1991; Hatt, 1980).

ANEXO 2. Halos de inhibición generados por la cepa *Sphingomonas* sp. DS-204 contra 280 cepas de *Staphylococcus aureus* (Resultados).

Cepa Bacteriana	Halo de Inhibición (Ø diámetro en mm)	Cepa Bacteriana	Halo de Inhibición (Ø diámetro en mm)
1	**10 mm** (24 h)	141-195/17	**9 mm** (24 h)
2	5 mm (24 h) **7 mm** (48 h)	142-4/17	3 mm (24 h)
3	3 mm (24 h) 6 mm (48 h)	143-22/272	4 mm (24 h)
4	3 mm (24 h) **10 mm** (48 h)	144-22/95	5 mm (24 h)
5	4 mm (24 h) **8 mm** (48 h)	145-209-9	5 mm (24 h)
6	3 mm (24 h) **9 mm** (48 h)	146-52-8	1 mm (24 h)
7	2 mm (24 h) **7 mm** (48 h)	147-157-9	--
8	3 mm (24 h) 6 mm (48 h)	148-64-7	--
9	3 mm (24 h) 5 mm (48 h)	149-101-13	3 mm (24 h)
10	6 mm (24 h) 4 mm (48 h)	150-50-13	2 mm (24 h)
11	6 mm	151-173-13	3mm (24 h)
12	2 mm (24 h) **10 mm** (96 h)	152-276-14	6 mm (24 h)
13	**9 mm** (24 h)	153-106-14	**7 mm** (24 h)
14	0 mm (24 h) **7 mm** (96 h)	154-76-25	--
15	**7 mm** (24 h) **13 mm** (96 h)	155-169-21	2 mm (24 h)
16	0 mm (24 h) **8 mm** (96 h)	156-76-18	5 mm (24 h)

--: No presentó halo de inhibición.

Cepa Bacteriana	**Halo de Inhibición (Ø diámetro en mm)**	**Cepa Bacteriana**	**Halo de Inhibición (Ø diámetro en mm)**
17	0 mm (24 h) 6 mm (96 h)	157-47	3 mm (24 h)
18	0 mm (24 h) **9 mm**(96 h)	158-128-14	3 mm (24 h)
19	2 mm (24 h)	159-182-18	--
20	3 mm (24 h)	160-13-14	--
21	2 mm (24 h)	161-94-14	1 mm (24 h)
22	3 mm (24 h)	162-3-20	--
23	**9 mm** (24 h)	163-188-14	--
24	4 mm (24 h)	164-74-25	3 mm (24 h)
25	3 mm (24 h)	165-45-18	--
26	6 mm (24 h)	166-1-20	5 mm (24 h)
27	2 mm (24 h)	167-53-25	2 mm (24 h)
28	-- (24 h)	168-18-18	--
29	5 mm (24 h)	169-143-25	1 mm (24 h)
30	**8 mm** (24 h)	170-13-05	2 mm (24 h)
31	6 mm (24 h)	171-30-14	6 mm (24 h)
32	**7 mm** (24 h)	172-112-9	2 mm (24 h)
33	2 mm (24 h)	173-186-11	--
34	2 mm (24 h)	174-232-27	--
35	3 mm (24 h)	175-194-4	--
36	6 mm (24 h)	176-50-1	--
37	3 mm (24 h)	177-142-26	--
38	--	178-273-8	--
39	5 mm (24 h)	179-102-3	3 mm (24 h)
40	1 mm (24 h)	180-33-9	--

--: No presentó halo de inhibición.

Cepa Bacteriana	**Halo de Inhibición (Ø diámetro en mm)**	**Cepa Bacteriana**	**Halo de Inhibición (Ø diámetro en mm)**
41	6 mm (24 h)	181-132-20	1 mm (24 h)
42	6 mm (24 h)	182-170-8	5 mm (24 h)
43	**8 mm** (24 h)	183-59-9	2 mm (24 h)
44	5 mm (24 h)	184-60-2	2 mm (24 h)
45	5 mm (24 h)	185-227-2	1 mm (24 h)
46	6 mm (24 h)	186-174-10	--
47	1 mm (24 h)	187-15-28	2 mm (24 h)
48	**7 mm** (24 h)	188-171-8	-- (24 h)
49	1 mm (24 h)	189-158-10	--
50	4 mm (24 h)	190-18-9	1 mm (24 h)
51	6 mm (24 h)	191-175-11	1 mm (24 h)
52	6 mm (24 h)	192-102-9	--
53	2 mm (24 h)	193-Dan	--
54	5 mm (24 h)	194-203-11	--
55	--	195-167-11	--
56	5 mm (24 h)	196-25-11	--
57	**7 mm** (24 h)	197-139-1	--
58	3 mm (24 h)	198-9076	--
59	3 mm (24 h)	199-22-156	--
60	--	200-20-17	2 mm (24 h)
61	5 mm (24 h)	201-118-17	--
62	3 mm (24 h)	202-88-6	1 mm (24 h)
63	**7 mm** (24 h)	203-22-95	--
64	3 mm (24 h)	204-22-235	--
65	1 mm (24 h)	205-125-17	4 mm (24 h)
66	5 mm (24 h)	206-7-6	--

--: No presentó halo de inhibición.

Cepa Bacteriana	**Halo de Inhibición (Ø diámetro en mm)**	**Cepa Bacteriana**	**Halo de Inhibición (Ø diámetro en mm)**
67	6 mm (24 h)	207-47-6	--
68	1 mm (24 h)	208-13-9103	2 mm (24 h)
69	3 mm (24 h)	209-195-17	--
70	4 mm (24 h)	210-22-71	1 mm (24 h)
71	3 mm (24 h)	211-22-177	--
72	5 mm (24 h)	212-22-153	--
73	--	213-22-263	--
74	1 mm (24 h)	214-15-62	3 mm (24 h)
75	--	215-4-17	1 mm (24 h)
76-31/167-11	1 mm (24 h)	216-22-263	5 mm (24 h)
77-36/60-2	3 mm (24 h)	217-22-262	1 mm (24 h)
78-32/232-27	--	218-24-212	5 mm (24 h)
79-23/170-8	**7 mm** (24 h)	219-22-202	2 mm (24 h)
80-22/9077-24	2 mm (24 h)	220-209-9	1 mm (24 h)
81-45/273-8	5 mm (24 h)	221-157-9	--
82-1-20	3 mm (24 h)	222-276-14	--
83-30/186-11	--	223-64-7	--
84-28/194-4	--	224-101-13	--
85-29/50-1	--	225-17.3-13	--
86-19/15-28	2 mm (24 h)	226-106-14	--
87-20/227-2	2 mm (24 h)	227-52-8	--
88-21/158-10	5 mm (24 h)	228-50-13	--
89-43/17-8	1 mm (24 h)	229-149-21	--
90-24/174-10	--	230-19-14	--
91-25/175-11	1 mm (24 h)	231-231-6	2 mm (24 h)
92-26/102-3	--	232-221-28	--

--: No presentó halo de inhibición.

Cepa Bacteriana	**Halo de Inhibición (Ø diámetro en mm)**	**Cepa Bacteriana**	**Halo de Inhibición (Ø diámetro en mm)**
93-27/00	--	233-59-21	--
94-42/112-9	--	234-109-20	6 mm (24 h)
95-41/18-9	3 mm (24 h)	235-41-30	--
96-45/45-18	1 mm (24 h)	236-61-15	--
97-44/25-11	6 mm (24 h)	237-194-28	3 mm (24 h)
98-40/102-9	2 mm (24 h)	238-241-6	7 mm (24 h)
99-1/**118-14**	**10 mm** (24 h)	239-152-28	2 mm (24 h)
100-2/94-14	**8 mm** (24 h)	240-193-29	--
101-3/45-18	--	241-129-3	--
102-4/76-18	--	242-71-22	--
103-5/3-20	3 mm (24 h)	243-164-28	3 mm (24 h)
104-6/30-14	3 mm (24 h)	244-193-28	7 mm (24 h)
105-7/53-25	2 mm (24 h)	245-84-27	4 mm (24 h)
106-8/182-18	2 mm (24 h)	246-138-27	--
107-34/33-9	--	247-17-27	2 mm (24 h)
108-9/1-20	1 mm (24 h)	248-210-17	--
109-33/139-1	--	249-200-101	3 mm (24 h)
110-38/203-11	--	250-189-25	--
111-39/102-28	--	251-61-11	**7 mm** (24 h)
112-35/59-9	**7 mm** (24 h)	252-81-18	--
113-37/142-26	5 mm (24 h)	253-273-27	--
114-15/143-25	1 mm (24 h)	254-36-24	1 mm (24 h)
115-16/169-21	--	255-189-25	--
116-17/13-11	--	256-258-11	--

--: No presentó halo de inhibición.

Cepa Bacteriana	**Halo de Inhibición (Ø diámetro en mm)**	**Cepa Bacteriana**	**Halo de Inhibición (Ø diámetro en mm)**
117-18-18	2 mm (24 h)	257-10-24	3 mm (24 h)
118-14/47(A)	2 mm (24 h)	258-111-10	--
119-14/47(B)	--	259-292-27	2 mm (24 h)
120-13/13May	--	260-147-1 (sep)	2 mm (24 h)
121-12/74-25	--	261-137-24	1 mm (24 h)
122-11/76-25	--	262-99-27	5 mm (24 h)
123-10/128-14	3 mm (24 h)	**263-262*1**	--
124-24/212	3 mm (24 h)	**264-260*2**	**12 mm (96 hrs)**
125-118/17	5 mm (24 h)	**265-254*3**	--
126-88/6	2 mm (24 h)	**266-226*4**	**2mm** (24 h)
127-22/202	2 mm (24 h)	**267-224*5**	--
128-7-6	6 mm (24 h)	**268-220*6**	**15mm (48 h) 1.8 (96 h)**
129-22/235	1 mm (24 h)	**269-260*7**	**10mm** (24 h)
130-22/71	--	**270-254*8**	--
131-22/117	--	**271-250*9**	**12mm** (24 h)
132-22/153	2 mm (24 h)	**272-204*10**	**7 mm** (24 h)
133-22/262	4 mm (24 h)	**273-232*11**	**2 mm (24 h) 0 mm (96 h)**
134-22/156	1 mm (24 h)	**274-224*12**	**5 mm** (24 h)
135-13/9103	--	**275-214*13**	--
136-47/6	2 mm (24 h)	**276-186*14**	**3 mm** (24 h)
137-15/62	2 mm (24 h)	**277-182*15**	--
138-125/17	6 mm (24 h)	**278-180*16**	--

--: No presentó halo de inhibición.

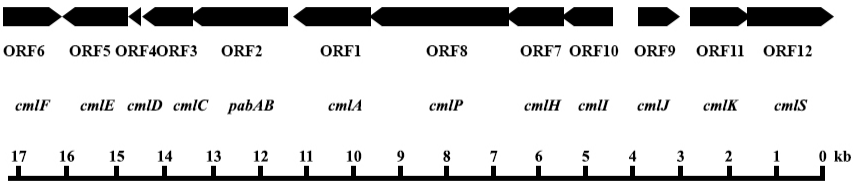
Cepa Bacteriana	**Halo de Inhibición (Ø diámetro en mm)**	**Cepa Bacteriana**	**Halo de Inhibición (Ø diámetro en mm)**
139-20/17	**--**	**279-152*17**	**8 mm (24 h) 9 mm (48 h) 1 cm (96 h)**
140-22/263	**--**	**280-130*18**	**2 mm** (24 h)

--: No presentó halo de inhibición.

***Cepas multiresistentes a antibióticos donadas por M.C. MA.P.A.H.**

ANEXO 3. Organización de genes involucrados en la biosíntesis de Cloramfenicol (Cm) (Imágen 5) y Klebicina (Imagen 6).

Imagen 5. *Streptomyces venezuelae* y su función sugerida (Morales-García *et al*., 2007a).



cmlF, Expulsión del Cm;

cmlE, Desoxi-arabino-heptulosonato-7-fosfato sintasa;

cmlD,Corismato mutasa;

cmlC, Crefenato deshidrogenasa;

pabAB, Amino-desoxicorismato sintasa;

cmlA, No identificada;

cmlP, Péptido con actividad sintetasa no ribosómica;

cmlH, No identificada;

cmlI, Transporte de membrana tipo ABC;

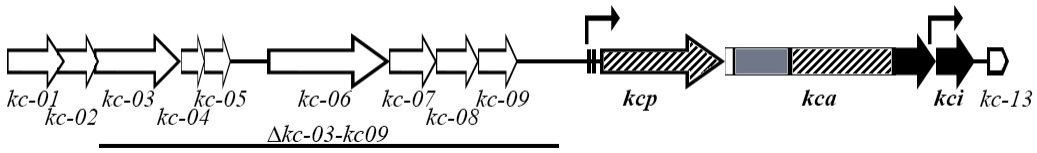
cmIJ, Cetoreductasa;

cmIK, AMP-ligasa;

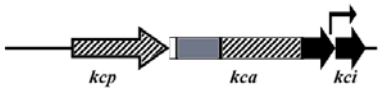
cmlS, Halogenasa.

Imagen 6. Organización de genes clonados para síntesis de Klebicina.

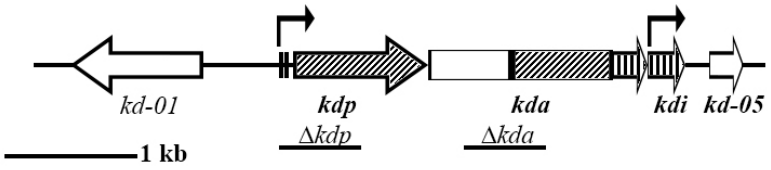
(a)



(b)



(c)



(a) Klebicina C clon de *Klebsiella pneumoniae* Misc40. **(b)** Klebicina C grupo de genes de *K. oxytoca* Misc712. **(c)** Klebicina D clone de *K. oxytoca* Misc192. Regiones Promotoras (┌), Lex A cajas ligadas (I), similitud con los demás clones (///)

Colicinas conocidas E4(■), E1( ), y D(III). El % AT menor a 100-bp disminuyendo en la imagen de klebicina C. Las deleciones ΔDkc-03_kc-09, ΔDkdp, y ΔDkda están indicadas por líneas subrayadas (Chavan *et al*., 2005).

ANEXO 4.

a) **Extracción de ADN Genómico y resultados,**

b) **Extracción de ADN Plasmídico y resultados.**

a) **EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO y resultados.**

Para comprobar que se trataba de cepas mutadas de *Sphingomonas* sp. DS-204 Km resistentes; se realizó un ensayo de extracción de ADN genómico y visualizar el experimento en un Gel de Agarosa (Imagen 3).

En este ensayo, inicialmente se eligieron 25 cepas mutantes de *Sphingomonas* sp. DS-204 (resistentes a Km) al azar.

Se incubaron las cepas mutantes precedentes de glicerol, se tomaron 100 µl y se colocaron en un tubo Falcon de 45 ml conteniendo 10 ml de medio líquido LB sin antibiótico, se incubaron los tubos bajo agitación constante a 30°C durante 24 h. Posterior al tiempo transcurrido, se tomaron 20 µl de preinóculo y se colocaron en una placa con medio LB km^{80} sólido y estriamos; se incubaron las placas a 30°C, durante 24 h.

De las 25 cepas seleccionadas, únicamente se logró el crecimiento de 19 cepas, las otras 6 cepas mutantes no crecieron ni en medio líquido ni en medio sólido sin antibiótico.

Se realizó un ensayo de extracción de ADN genómico de las 19 cepas mutantes de *Sphingomonas* sp. DS-204.

En este experimento se utilizó el kit Promega y se siguió el protocolo de extracción (Imagen 7).

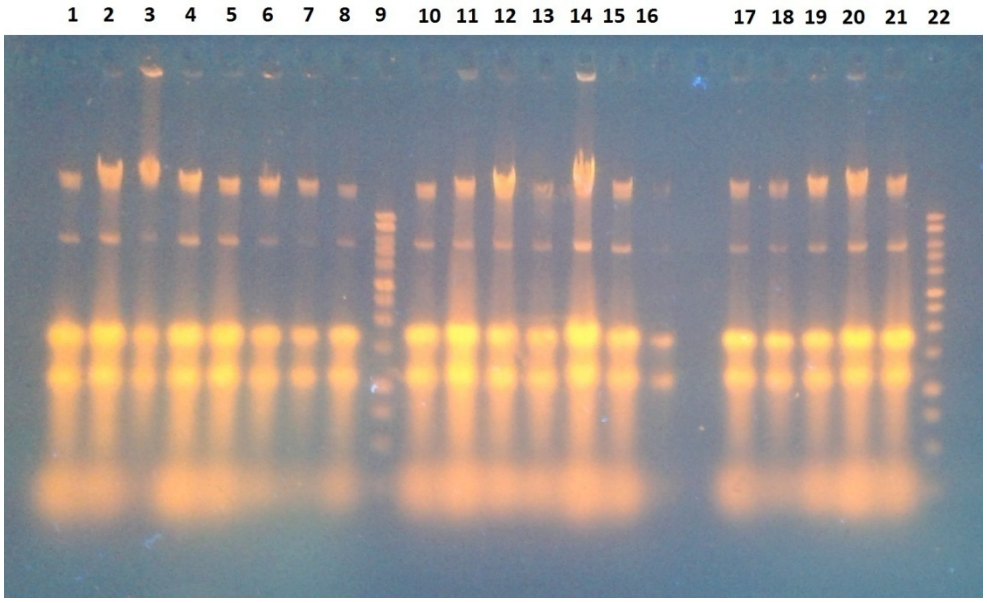


Imagen 7. Extracción de ADN genómico de *Sphingomonas* sp. DS-204 y cepas mutantes.
El pozo 1 contiene la cepa DS-204; pozo 2, mutante A; pozo 3, mutante B; pozo 4, mutante C; pozo 5, mutante D; pozo 6, mutante E; pozo 7, mutante F; pozo 8, mutante G; pozo 9, CONTROL; pozo 10, mutante H; pozo 11, mutante I; pozo 12, mutante J; pozo 13, mutante K; pozo 14, mutante L; pozo 15, mutante M; pozo 16, mutante N, pozo 17, mutante Ñ; pozo 18, mutante O; pozo 19, mutante P; pozo 20, mutante Q; pozo 21, mutante R; pozo 22, CONTROL.

Observamos que las cepas mutantes de *Sphingomonas* sp. DS-204 Km^{80}, tienen una similitud en sus bandas. Exceptuando las celdas 3 y 14 correspondientes a las mutantes B y L respectivamente, las que presentaron una diferencia con las otras bandas y similitud entre ellas.

b) EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO y resultados.

Para la extracción de ADN plasmídico, se siguieron los mismos procedimientos anteriores de incubación pero cambiando el protocolo de extracción de ADN genómico por el protocolo de extracción de ADN plasmídico utilizando el Zyppy™Plasmid Miniprep Kit (Imagen 8). En este experimento se usaron

únicamente las cepas mutantes I, K, L, y M (seleccionadas al azar) de los gliceroles anterioriores, se tomaron 100 µl y se colocaron en un tubo Falcon de 50 ml conteniendo 10 ml de medio líquido LB sin antibiótico, se incubaron los tubos en agitación constante a 30°C durante 24 h.

Después del tiempo de incubación, se tomaron 20 µl de preinóculo y se sembraron en una placa con medio LB km^{80} sólido y estriamos; se incubaron las placas a 30°C, durante 24 h (Imagen 8).

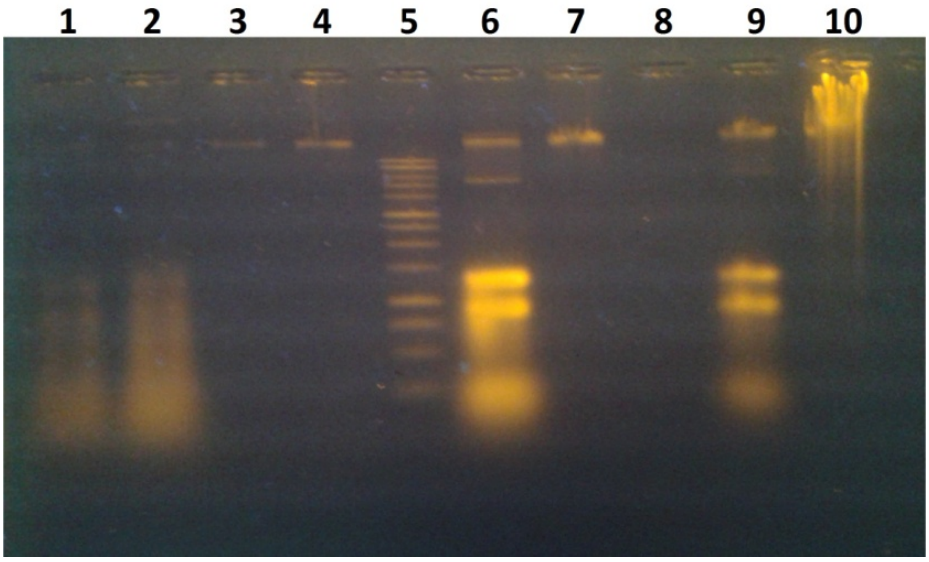
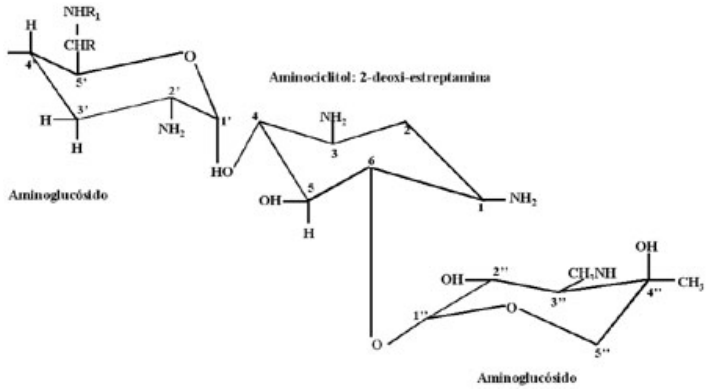
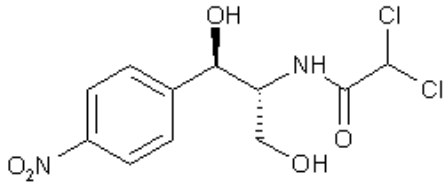


Imagen 8. Extracción de ADN plasmídico de las cepas utilizadas para mutagénesis triparental y cuatro mutantes de la cepa *Sphingomonas* sp. DS-204.
En el pozo número 1 se colocó la cepa *E. coli* λpir en donde se muestra poca cantidad de plásmidos, en el pozo número 2, se colocó la cepa *E. coli* RK-600, también mostrando poca actividad plasmídica, en el pozo 3 se colocó la cepa *S.* DS-204 (A), en el pozo 4 se colocó la cepa *S.* DS-204 (B), en el pozo 5 se colocó el CONTROL, en el pozo 6 se colocó la cepa mutante I, la cual mostró una densidad diferente en sus bandas a las anteriores, en el pozo 7 se colocó la cepa mutante K, la celda 8 se dejó vacía, y en las celdas 9 y 10 se colocaron las cepas mutantes L y M respectivamente, visualizando bandas diferentes.

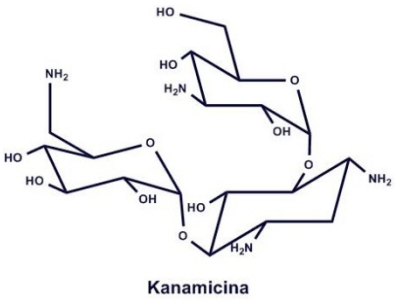
ANEXO 5. Estructura química de algunos antibióticos.



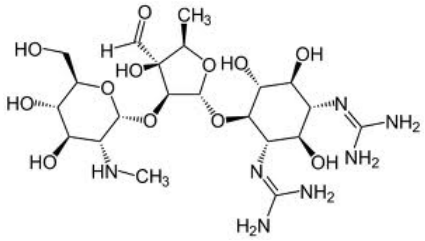
Aminoglucósido



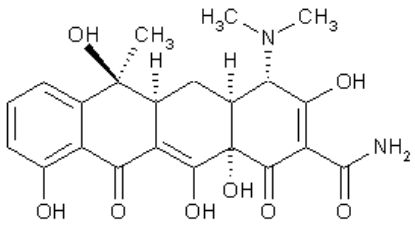
Cloramfenicol



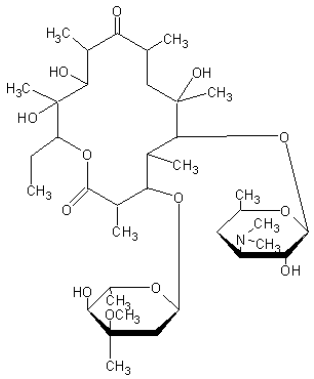
Kanamicina



Estreptomicina



Tetraciclina



Macrólido

ANEXO 6. XI Encuentro "Participación de la Mujer en la Ciencia". Modalidad *Poster*, MS-0100/14. Medicina y Ciencias de la Salud. S2-MCS16.

Antagonismo bacteriano entre cepas *Sphingomonas* sp. DS-204 contra 280 cepas de *Staphylococcus aureus*.

Julia Elisa Martínez Lazalde[a], M. Arenas Hernández[a], Y. E. Morales García[a], Ma.R. Bustillos Cristales[a], A.L. Hernández Tenorio[a], D. Juárez Hernández[a]Jesús Muñoz Rojas[a].

[a]CICM-ICUAP, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. joymerre@hotmail.com,jeml92@hotmail.com

RESUMEN:

Sphingomonas sp. es una bacteria Gram negativa degradadora de lindano, es una cepa altamente competitiva debido a que inhibe bacterias patógenas y no patógenas; ya que produce una sustancia inhibitoria eficaz contra 120 cepas de 18 géneros bacterianos diferentes (Aguilera-Méndez, Morales-García & Muñoz-Rojas, 2009). En el presente trabajo se realizaron experimentos de antagonismo de la cepa *Sphingomonas* sp. DS-204 contra 262 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas previamente de pacientes que acudieron a consulta externa al hospital ISSSTEP, por presentar infecciones en las vías respiratorias altas. Las 262 cepas fueron caracterizadas fenotípicamente (coagulasa, catalasa y DNAsa positivas); 18 cepas de *S. aureus* multirresistentes fueron donadas; aisladas de pacientes del área de quemados del HUP. Se realizaron los experimentos de inhibición simultánea con la cepa *Sphingomonas* sp. DS-204 y las 280 cepas de *S. aureus*; se midieron los halos inhibitorios y se observó que el 64% de las cepas de *S. aureus* fueron inihibidas por la cepa de *Sphingomonas* sp. DS-204. Destacando que estas cepas tienen alto potencial inihibitorio contra cepas de *S. aureus* multirresistentes a antibióticos de amplio espectro, lo que concede a este trabajo el inicio de la búsqueda de los genes involucrados en la biosíntesis de una nueva sustancia inhibitoria.

1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias sostienen una competencia intensa por los nutrientes en sus respectivos hábitats y varias son las estrategias que ellas han empleado para mantener esta competencia (Riley & Wertz, 2002). Por ejemplo, algunas cambian el pH del entorno y evitan que otras bacterias se puedan adaptar bajo esas condiciones, otras crecen muy aceleradamente, otras han desarrollado mecanismos de quimiotaxis para llegar hasta los sitios donde están las fuentes de carbono disponibles y quizás el mecanismo más activo que las bacterias han desarrollado a lo largo de su evolución es la competencia mediante el uso de sustancias antimicrobianas (Muñoz-Rojas, Martínez-Romero & Martínez, J., 2004). Las sustancias antimicrobianas que las bacterias

producen son muy diversas, por ejemplo péptidos, lipopéptidos cíclicos, sideróforos, bacteriocinas, antibióticos, macrólidos (Riley *et al*., 2002). Desde un punto de vista ecológico se ha reportado que las bacterias que producen una o más sustancias inhibitorias tienen ventajas competitivassobre las bacterias que son sensibles (Caballero-Mellado, *et al*., 2012). Además algunos autores aseguran que las bacterias producen cuando menos una bacteriocina (Riley, *et al*., 2002). Sabiendo que las bacteriocinas son un tipo específico de sustancias inhibitorias podríamos extrapolar esta suposición a la afirmación "todas las bacterias producen al menos una sustancia inhibitoria". Considerando la enorme diversidad bacteriana que hay en nuestro planeta, es concebible que aún existen muchas sustancias inhibitorias por ser descubiertas y por lo tanto falta vislumbrar muchas vías biosintéticas alternativas que las bacterias usan para la producción de estas sustancias inhibitorias.

Además, Las sustancias inhibitorias producidas por bacterias representan un potencial farmacéutico para ser explorado en el futuro (Muñoz-Rojas, 2004) así como sistemas de marcaje novedosos que podrían ser utilizados en el diseño de bacterias recombinantes y obtención de mutantes múltiples en trabajos de ingeniería genética (Cases & de Lorenzo, 2005).

2. TEORÍA

Sphingomonas sp. es una bacteria gram negativa, aerobia, degradadora de lindano (hexaclorociclohexano (HCH) (Böltner, D., Moreno-Morillas, S., & Ramos, 2005).

Las cepas del género *Sphingomonas* han sido propuestas como modelo para llevar a cabo la rizoremediación de compuestos tóxicos en suelos contaminados (Böltner, *et al*., 2008).

Debido a la alta capacidad de esta cepa para establecerse en suelos rizosféricos, lo que supuso que son cepas altamente competitivas.

La capacidad de diversas cepas de *Sphingomonas* sp. para producir sustancias inhibitorias fue explorada recientemente, observando que algunas cepas como *Sphingomonas* sp. DS-204 produce una sustancia inhibitoria de amplio espectro que es capaz de inhibir el crecimiento de 120 cepas bacterianas de 18 géneros diferentes.

Interesantemente la cepa DS-204 inhibió a algunas cepas de interés clínico. Destacando la capacidad de esta cepa para inhibir a dos miembros patógenos del género *Staphylococcus*: *S. aureus* y *S. epidermidis,*(Aguilera-Méndez, 2009).

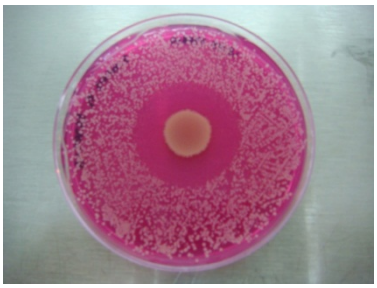
Staphylococcus aureus produce infecciones en tracto respiratorio, en huesos, tejidos blandos, mucosas, osteomielitis, endocarditis bacteriana, shock séptico hasta muerte. Además las cepas de *Staphylococcus aureus* se han tornado resistentes a varios antibióticos, incluyendo las cefalosporinas descritas más recientemente (Bernal, P., Zloh, M., & Taylor, P., 2009). Por lo que se ha convirtiendo en un problema de salud pública actual, pues se sabe que *Staphylococcus aureus* es un microorganismo presente en los hospitales incluyendo el área quirúrgica de éstos. Debido a que estos microorganismos se han tornado multirresistentes a antibióticos de rutina, es necesario investigar sobre las posibles sustancias alternativas a las que no son resistentes estas bacterias.

En el presente proyecto se planteó explorar el rango de antibiosis que la cepa de *Sphingomonas* sp. DS-204 ofrece contra cepas de *S. aureus* (Laboratorio clínico del INSTITUTO DE SEGURIDAD SOCIAL Y SERVICIO PARA TRABAJADORES DEL ESTADO DE PUEBLA-ISSSTEP y HOSPITAL UNIVERSITARIO-HUP). Ya que se piensa que la cepa *Sphingomonas* sp. DS-204 produce una sustancia inhibitoria capaz de inhibir el crecimiento de cepas estafilocócicas multirresistentes.

3.PARTE EXPERIMENTAL

Se aislaron cepas presuntivas de Staphylococcus aureus a partir de pacientes que acudieron a consulta externa al hospital ISSSTEP. Los pacientes presentaron infecciones en vías respiratorias altas.
Se realizaron raspados de faringe usando un hisopo estéril, posteriormente el hisopo inoculado se estrió en medio sólido Sal y Manitol y las placas se incubaron a 30°C durante 24 h.
De ésta forma se seleccionaron colonias que viraron el indicador Rojo de Fenol a color amarillo. Las colonias características fueron amarillas y el medio de cultivo viró de naranja a amarillo. Posteriormente se realizaron pruebas fenotípicas tales como catalasa, coagulasa y DNAsa.
Adicionalmente 18 cepas de *S. aureus* fueron donadas por la M.C. Margarita María de la Paz Arenas Hernández y confirmadas en sus capacidades de crecer en medio "Sal y Manitol" y pruebas fenotípicas positivas. Las cepas donadas fueron aisladas de pacientes que presentaron heridas expuestas, procesos de mala cicatrización o con infección en el área de Ortopedia y Traumatología del H.U.P.
Para determinar el espectro inhibitorio de *Sphingomonas* sp. DS-204 frente a diferentes cepas de *S. aureus*, se realizaron ensayos de inhibición simultánea. Se realizaron preinóculos de cada una de las cepas de *S. aureus* en tubos Falcon con capacidad para 45 ml, conteniendo 10 ml de medio líquido Sal y Manitol y de la cepa de *Sphingomonas* sp. DS-204 en tubos Falcon con capacidad para 45 ml conteniendo medio líquido LB Sm^{30}, bajo agitación constante y en incubación a 30°C durante 24 horas. Después del crecimiento de cada una de las cepas de *S. aureus* se transfirió en medio de cultivo sólido LB Rojo Fenol, tomando 100 µl de preinóculo y se sembró bajo estría masiva. Se dejaron unos minutos hasta que secaran las placas. Posteriormente se colocó en medio de la placa, una gota con 20 µl del preinóculo de la cepa de *Sphingomonas* sp. DS-204, se dejaron las placas hasta que secaran perfectamente y por último se incubaron a 30°C durante 24 h. Por último en este experimento se observaron y midieron los halos de inhibición. Se observó que el 64% de las cepas fueron inhibidas por *Sphingomonas* sp. DS-204, las cuales mostraron halos inhibitorios que variaron desde 1 mm hasta 1.8 cm de diámetro.

IMAGEN 1. Cepa estafilocócica inhibida por *Sphingomonas* sp DS-204.



Posteriormente se exploró el patrón de resistencia/sensibilidad a distintos antibióticos usando multidiscos.En este trabajo se encontró que las cepas estafilocócicas son resistentes a los siguientes antibióticos: Penicilina (PE) 75%, Ampicilina (AM) 64%, Eritromicina (E) 23%, Dicloxacilina (DC) 37%, Trimetoprim/Sulfametoxazol (SXT) 05%, Cefalotina (CF) 03%, Cloranfenicol (CL) 02%, Cefepime (FEP) 10%, Gentamicina (GE) 07%, Levofloxacina (LEV) 05%, Amikacina (AK) 02%, Ceftriaxona (CRO) 02%, Netilmicina (NET) 03%. Las cepas resultaron sensibles a los siguientes antibióticos: Enoxacina (ENX) 99%, Cefalotina (CF) 97%, Cefotaxima (CTX) 100%, Cefuroxina (CXM) 100%, Gentamicina (GE)93% , Levofloxacina (LEV) 95%, Tetraciclina (TE) 100%, Amikacina (AK) 98%, Ceftriaxona (CRO) 98%, Cloranfenicol (CL) 98%, Netilmicina (NET) 97%, Nitrofurantoina (NF) 100%, Cefepime (FEP) 90%.

En este experimento obtuvimos como resultado que el 57% de las cepas no son multirresistentes, el 30% de las cepas resultaron multirresistentes y el 13% resultaron sensibles totalmente a los multidiscos.

Del 57% de las cepas NO Multirresistentes, el 55% mostró halos inhibitorios de 1 mm - 1.8 cm. Del 30% de las cepas Multirresistentes, el 31% de las cepas mostró halos inhibitorios de 1 mm – 1.3 cm y finalmente del 13% de las cepas totalmente sensibles a los multidiscos, el 14% de las cepas mostraron halos inhibitorios de 1 mm – 1.2 cm.

Se realizó otro experimento de antagonismo en medio líquido entre *Sphingomonas* sp. DS-204 y una cepa de *S. aureus*. Para llevar a cabo éste experimento se eligió una cepa de *S. aureus* sensible a *Sphingomonas* sp. DS-204. La cepa de *S. aureus* sp.118-14,fue altamente sensible a la actividad de la sustancia inhibitoria producida por *Sphingomonas* sp. DS-204, ya que mostró un halo de inhibición de 1 cm ante la presencia de *Sphingomonas* sp. DS-204.

Se observó que la cepa *Sphingomonas* sp. DS-204 tuvo un crecimiento adecuado tanto cuando está creciendo en forma independiente como cuando crece en coinoculación con la cepa sensible.

De la misma forma la cepa *Staphylococcus aureus* tuvo un crecimiento adecuado cuando crece de forma independiente, pero el crecimiento de esta bacteria fue afectado cuando crece en coinoculación con la cepa productora. De forma interesante se observó que a pesar de que la cepa *S. aureus* sp. 118-14 fue afectada en su crecimiento, esta cepa logró sobrevivir en números moderados lo que implica que en esta condición la inhibición no es tan fuerte como la observada en placa.

3. CONCLUSIONES

Los experimentos confirmaron nuevamente la teoría sobre la producción de sustancias inhibitorias de la cepa *Sphingomonas* sp. DS-204 en fase estacionaria ya que se observó inhibición de la cepa *Staphylococcus aureus* en competencia con la cepa *Sphingomonas* sp. DS-204 (Aguilera-Méndez, 2009). En conjunto con el experimento de antagonismo en medio líquido se concluyó que la sustancia inhibitoria podría ser una sustancia bacteriostática ya que no se logró erradicar en su totalidad la cepa estafilocócica, sin embargo si se observó una disminución significativa de esta cepa en competencia con Sphingomonas sp. DS-204.

Cabe destacar que las cepas *Sphingomonas* sp. DS-204 son cepas con un alto potencial inhibitorio contra cepas de *S. aureus* multirresistentes a antibióticos de amplio espectro, lo que concede a este trabajo el inicio de un gran trayecto por la búsqueda de los genes involucrados en la producción de alguna sustancia benéfica para disminuir de manera importante cepas estafilocócicas multirresistentes que podrían ser patógenas oportunistas en pacientes inmunocomprometidos de las áreas de cuidados intensivos en los hospitales.

BIBLIOGRAFÍA

Aguilera-Méndez, N. (2009). Búsqueda de sustancias inhibitorias en Sphingomonas sp. (Tésis de Licenciatura). Facultad de Biología BUAP. Biblioteca Central BUAP.

Bernal, P., Zloh, M., & Taylor, P. (2009). Disruption of D-alanyl esterification of Staphylococcus aureus cell wall teichoic acid by the {beta}-lactam resistance modifier (-)-epicatechin gallate. J Antimicrob Chemother, 63(6):1156-62. doi: 10.1093/jac/dkp094.

Böltner, D., Moreno-Morillas, S., & Ramos, J. L. (2005). 16S rDNA phylogeny and distribution of lin genes in novel hexachlorocyclohexane-degrading Sphingomonas strains. Environ Microbiol, 7(9):1329-38.

Böltner, D., Godoy, P., Muñoz-Rojas, J., Duque, E., Moreno-Morillas, S., Sánchez, L., & Ramos, J. L. (2008). Rhizoremediation of lindane by root-colonizing Sphingomonas. Microb Biotechnol, 1(1):87-93. doi: 10.1111/j.1751-7915.2007.00004.x.

Cases, & De Lorenzo (2005). Genetically modified organisms for the environment: stories of success and failure and what we have learned from them. Int Microbiol, 8(3):213-22.

Cevada-Marin, V., Munoz-Rojas, J., Caballero-Mellado, J., Mascarua-Esparza, M.A., Castaneda-Lucio, M. Carreño-Lopez, R., Estrada-de los Santos, P. and Fuentes-Ramirez, L.E. (2012). Antagonistic interactions among bacteria inhabiting pineapple

Cornaglia, G., et al. (2004). European recommendations for antimicrobial resistance surveillance. Clin Microbiol Infect., 10: 349–383.

Corral-Lugo, A. (2010). Determinación de genes de resistencia a desecación, por mutagénesis al azar, en *Klebsiella variicola* T29A2 del tipo PGPR. (Tésis de Maestría). ICUAP-Instituto de Ciencias Microbiológicas. BUAP.

Hujer *et al*., (2006). Analysis of antibiotical resistance genes in Multidrug-Resistant Acinetobacter sp. Isolates from Military and Civilian Patients Treated at the Walter Reed Army Medical Center.

Muñoz-Rojas, J., Martínez-Romero, E., & Martínez, J. (Eds), (2004). Microbios en línea (2ª Ed.). UNAM-AMM. Recuperado de http://www.researchgate.net/publication/235953137_Bacteriocinas_una_estrategia_de_competencia_microbiana_propuesta_como_alternativa_de_antibiticos_dirigidos_para_el_futuro_humano

(a) Riley, M., & Wertz, J. E. (2002). Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. Biochimie, 84(5-6):357-64