



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA



**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
PARCIAL DE UNA SUSTANCIA
INHIBITORIA PRODUCIDA POR
*SPHINGOMONAS SP. DS-204***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

- **MAESTRO EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)
CON OPCIÓN EN: BIOQUÍMICA Y GENÉTICA MICROBIANA**

PRESENTA:

IBQ. ALBERTO AGUAYO ACOSTA

ASESOR DE TESIS: DC. JESUS MUÑOZ ROJAS

CO-ASESOR: DC. RICARDO CARREÑO LOPEZ

PUEBLA, PUE.

MAYO, 2015

Agradecimientos

Agradezco al Doctor Jesús Muñoz Rojas por su apoyo y guía a lo largo del proceso de trabajo. Por su aporte en diseños de metodología y por la confianza brindada en el desarrollo de esta tesis. Por su valiosa amistad.

Agradezco a las personas que me apoyaron en la realización de los experimentos presentes en el trabajo.

A la DC. Norma Angélica Chávez, investigadora de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, por su apoyo, guía y brindar su laboratorio para los ensayos en la investigación.

A la MC. Dolores Castañeda Alonso en el centro de investigaciones en ciencias microbiológicas, Ciudad Universitaria, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por su apoyo en el desarrollo y análisis de cromatografías. Por su valioso tiempo brindado en estos ensayo y su amistad.

Agradezco al comité revisor por su apoyo en la mejora de la redacción y depuración del escrito, por su paciencia y guía en los últimos pasos de escritura de la tesis.

A mis compañeros MC. Cristal Ayala Arias, LBM. Sinaí Sánchez Viveros, MC. Abraham González Jiménez, Ing. Amb. Verónica Barranco y MC Osvaldo Rodríguez Andrade por su apoyo incondicional en los momentos difíciles y su valiosa amistad.

A todos mis compañeros de laboratorio que apoyaron en la realización de esta tesis. Por su valiosa amistad.

A mis padres y hermanos que siempre me dieron su apoyo incondicional durante este proyecto.

El apoyo financiero otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) para la realización de este trabajo.

Índice general

Índice de tablas.....	V
Índice de Figuras y esquemas (Fig.)	VI
Glosario de abreviaturas:	VIII
Resumen.....	1
Introducción.....	2
Clasificación de bacteriocinas	4
Modo de acción de las bacteriocinas.....	5
Relación fuente de carbono con producción o biosíntesis de compuestos bioactivos antagónicos.....	8
Relación con otras rutas metabólicas o sistemas genéticos y sustancias antagónicas	8
Bacteriocinas como metabolitos secundarios.....	9
Sustancias con actividad antagónica; estrategia de supervivencia bacteriana	10
Estrategias de supervivencia bacteriana: Mecanismos de inhibición.....	11
Relevancia Bioquímica en la síntesis de sustancias inhibitorias: actinomicina producida por el género <i>Streptomyces</i>	13
Procesos biotecnológicos: Estrategias de identificación de cepas productoras de bacteriocinas	15
Producción y purificación de bacteriocinas	16
Procesos Biotecnológicos: Extracción de sustancias inhibitorias	16
Producción y purificación de bacteriocinas (sustancias inhibitorias/ bioactividad antagónica).....	19
Sistemas de extracción líquido-líquido o líquido-sólido.....	22
Procesos de reparto (extracción).....	23
Procesos de extracción para sustancias orgánicas.....	24
La lixiviación: proceso de extracción alternativo	25
Antecedentes	25
Relevancia de <i>Sphingomonas</i> sp. DS-204	25
Biorremediación	25
<i>Sphingomonas</i> sp. DS-204 como alternativa en control biológico	27
Justificación	29
Objetivo General:.....	30
Objetivos particulares:	30

Materiales y métodos.	31
Corroboración de la actividad antagónica de <i>Sphingomonas</i> sp. DS-204	31
Extracción de la sustancia inhibitoria	31
Comprobación de la actividad antagónica de <i>Sphingomonas</i> sp. DS-204.	31
Extracción por metodología de Lixiviación en frío	32
Determinación de unidades arbitrarias de los extractos (actividad antagónica)	32
Extracción adicional líquido-líquido	32
Características de Disolventes.	33
Detección de actividad antagónica de <i>Sphingomonas</i> sp. DS-204	33
Purificación	34
Tamaño de molécula	34
Estabilidad al pH	35
Estabilidad a temperatura	35
Estabilidad en almacenamiento	35
Parámetros biológicos	35
Tiempo de crecimiento bacteriano para la extracción óptima de la sustancia inhibitoria	35
Fuentes de carbono	35
Ensayos extracción líquido-líquido, con extracto obtenido en sólido-líquido.	36
Ensayo de tiempo y temperatura de extracción.	37
Ensayos extracción líquido-líquido, con extracto obtenido en sólido-líquido.	37
Tratamiento con proteasa de <i>Bacillus licheniformis</i>.	37
Cuantificación de proteínas por método Bradford	37
Determinación de picos por espectrofotometría de gases masas	37
Resultados	38
Corroboración de la actividad antagónica de <i>Sphingomonas</i> sp. DS-204	38
Extracción de la sustancia inhibitoria a partir de medio líquido.	38
Método de extracción por lixiviación en frío.	39
Determinación de la estabilidad de la sustancia inhibitoria extraída.	44
Ensayo estabilidad a temperatura.	44
Estabilidad a cambios de pH	44
Estabilidad en condiciones de almacenamiento	45
Determinación de tamaño de molécula.	45

Parámetros Biológicos.....	47
Tiempo de crecimiento bacteriano para la extracción óptima de la sustancia inhibitoria	47
Efecto de la fuente de carbono en la producción de la sustancia inhibitoria producida por <i>Sphingomonas</i> sp DS-204.....	48
Ensayos extracción líquido-líquido, con extracto obtenido en sólido-líquido.....	49
Tratamiento con proteasa de <i>Bacillus licheniformis</i>.....	49
Cuantificación de proteínas por método Bradford.....	49
Determinación del peso molecular de la sustancia inhibitoria mediante el método de electroforesis.....	50
Análisis cromatográfico del extracto con actividad inhibitoria probada, obtenido por la metodología de lixiviación en frío.....	50
Características de la sustancia inhibitoria extraída de <i>Sphingomonas</i> sp. DS-204.....	53
Discusión.....	54
Conclusiones.....	61
Anexo.....	62
Medios de cultivo utilizados.....	62

Índice de tablas

1) Bacteriocinas con estatus QPS	7
2) Mecanismo general de acción de compuestos antagónicos.	12
3) Bacterias y cepas utilizadas en el protocolo de trabajo.	31
4) Disolventes utilizados en protocolos de trabajo	36
5) Disolventes utilizados en ensayo lixiviación en frío.	42
6) Ensayo de estabilidad a cambios de temperatura.	44
7) Ensayo de estabilidad a cambios de pH	44
8) Ensayo filtración con tamaño de poro variable; resumen de datos.	47
9) Ensayo de producción de sustancia inhibitoria por <i>Sphingomonas</i> sp. DS-204 en fuentes de carbono variables en medios mínimos.	48
10) Extracción líquido-líquido	49
11) Ensayo de prueba de digestión con proteasa.	49
12) Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	50
13) Características de la sustancia inhibitoria producida por <i>Sphingomonas</i> sp. DS-204.	53
14) Composición del medio de cultivo LB	62
15) Composición del medio de cultivo MM9-fuente de carbono variable	62
16) Composición de la solución stock 10XM9	62
17) Composición de la solución stock fuentes de carbono	63
18) Composición del medio de cultivo Citrato de Simmons	63
19) Composición del medio de cultivo Mac Conkey	64

Índice de Figuras y esquemas (Fig.)

1) Mecanismo de acción de bacteriocinas por formación de poros.	6
2) Vía de biosíntesis de lisina y de la bencilpenicilina, relación entre la biosíntesis de sustancias antagónicas y otros compuestos del crecimiento de bacterias productoras.	10
3) Ejemplo estructuras químicas consideradas sustancias inhibitorias	11
4) Esquema de intercalamiento de Actinomicina D con dsADN, mecanismo de acción de Actinomicina D; Paramanathan <i>et al.</i> 2012.	13
5) Estructura química de Actinomicina C (Inbar y Lapidot, 1991).	13
6) Estructura de precursores del esqueleto carbonado de media estructura química de Actinomicina C.	14
7) Ruta biosintética de Actinomicina D producida por <i>Streptomyces parvulus</i> .	14
8) Esquema filtros absolutos y filtros profundos	18
9) Sistema de extracción líquido-líquido.	39
10) Relación gramos de agar en composición de los medios de cultivo.	40
11) Efecto del disolvente como control en actividad inhibitoria de cepas sensibles	41
12) Extracción metodología lixiviación en frío con disolventes orgánicos diferentes al etanol.	41
13) Ensayos extracción sólido-líquido (lixiviación en frío).	42
14) Resultado lixiviación en frío con etanol.	43
15) Esquema de trabajo lixiviación en frío.	43
16) Efecto en las condiciones de almacenamiento en la actividad del compuesto bioactivo de <i>Sphingomonas</i> sp. DS-204.	45
17) Esquema de filtración con tubos Millipore	46
18) Ensayo actividad antagónica extracto lixiviación en frío con etanol,	46

posterior a filtración con filtro Millipore 50 KDa.	
19) Ensayo actividad antagónica extracto lixiviación en frío con etanol, posterior a filtración con filtro Millipore 10 KDa.	46
20) Control de extracto con actividad antagónica para ensayos de filtración con membranas Millipore.	47
21) Gráfico de UAs/ml por hora de crecimiento.	48
22) Resultado obtenido electroforesis de proteínas.	50
23) Resultado obtenido análisis de cromatografía de gases del extracto obtenido por metodología de lixiviación en frío.	51
24) Análisis de compuestos identificados por cromatografía de gases masa,	54

Glosario de abreviaturas:

- a. “BAL”: Bacterias ácido lácticas
- b. “°C”: grado Celsius; escala de temperatura
- c. “CoQ10”:Ubiquinona 10
- d. “DS”: del inglés double strand, para determinar o hacer referencia a la molécula de ADN de “doble cadena” o bicatenario.
- e. “g”: fuerza centrífuga que es medible en “gravedades”
- f. “GRAS”: del inglés “generally recognized as safe
- g. “h”: hora
- h. “HPK”: proteína quinasa asociada a membrana
- i. “I”: Inhibición; parámetro cualitativo de presencia de sustancia inhibitoria en el extracto
- j. “K_D”: Coeficiente o índice de reparto de una sustancia cualquiera.
- k. “KDa”: abreviatura para kilo daltons
- l. “K_{DL}”: Coeficiente o índice de reparto de una sustancia *L*.
- m. “L”: litro
- n. “*L*”: notación utilizada para referirnos a cualquier sustancia sujeta a un proceso de extracción.
- o. “M”: Molaridad
- p. “min”: minutos
- q. “ml”: mililitros
- r. “μL”: microlitro
- s. “NI”: No inhibición; parámetro cualitativo de ausencia de sustancia inhibitoria en el extracto
- t. NRPS: siglas en inglés para : péptido sintetasa no ribosomales

- u. “p”: Fracción de L que se ubica en la fase orgánica o del disolvente de un sistema de extracción
- v. PCR: del inglés polymerase chain reaction que significa reacción en cadena de la polimerasa.
- w. “pH”: Concentraciones de iones H^+ , numero representante de acidez o alcalinidad
- x. “pKa”: Constante química de disociación de un producto
- y. “q”: Fracción de L que se ubica en la fase acuosa o líquida de un sistema de extracción
- z. “QPS”: del inglés “qualified presumption of safety”: calificado como presuntamente seguro
- aa. “QS”: quorum sensing
- bb. “r” : notación de volúmenes de los sistemas de extracción; indicando la relación entre volúmenes tal como: $\bar{V}/V = r$
- cc. “RPM”; revoluciones por minuto
- dd. “RR”: regulador de respuesta citoplasmático
- ee. “SGL”: esfingoglicolípidos
- ff. “SS”: del inglés single strand, para determinar o hacer referencia a la molécula de ADN de una “sola cadena” o monocatenario.
- gg. “UAs”: unidades arbitrarias
- hh. “UFC”: unidades formadoras de colonias
- ii. “V”: volumen de la fase líquida en sistemas de extracción.
- jj. “ \bar{V} ”: volumen de la fase orgánica en sistemas de extracción.

Resumen.

Las bacteriocinas, así como otras biomoléculas con potencial inhibitorio, han tomado gran interés, en una gama de campos de estudio y desarrollo humano (agricultura, industria alimentaria y biotecnología), como agentes de control biológico en contra de organismos patógenos.

A su vez han demostrado ser una alternativa ideal para la sustitución de sustancias químicas recalcitrantes en la agricultura, o la sustitución de conservadores químicos en la industria alimentaria.

Muchas de estas sustancias, aún no descritas en su totalidad, presentan una amplia gama de estructuras, así como características químicas diferentes, lo que vuelve la tarea de extracción y purificación un proceso particular.

Para cada uno de los compuestos con actividad inhibitoria, se deben describir metodologías diferentes dependientes de las características químicas y bioquímicas particulares de dichas sustancias.

Sphingomonas sp. DS-204, cepa bacteriana originalmente aislada de suelos contaminados con lindano, ha presentado una capacidad de producción de sustancias con actividad inhibitoria contra cepas del género *Staphylococcus* y cepas fúngicas *Fusarium*, esta cepa ha demostrado un gran potencial como agente de biocontrol de géneros fúngicos patógenos descritos en la agricultura. Debido a este potencial se realizó un ensayo para el desarrollo metodológico de extracción, para aislar a esta sustancia inhibitoria de amplio espectro.

Se lograron determinar parámetros bioquímicos de producción de una sustancia inhibitoria, así como una metodología de extracción “Lixiviación en frío”, logrando realizar una caracterización de este péptido con actividad inhibitoria, peso molecular aproximado de 3.5 KDa, estabilidad térmica, en rango de -4 a 60 °C, y estabilidad a variaciones de pH, en rango de 3 a 9 en valor de pH, fuente de carbono presente en el medio de cultivo para su producción y tiempos de producción de dicha sustancia por la cepa *Sphingomonas* sp. DS-204. Todas estas pruebas se realizaron en el extracto obtenido con etanol obtenidos por medio de la metodología, lixiviación en frío, propuesta en el presente trabajo.

Introducción

Sphingomonas es un género conformado por bacterias Gram negativas, con forma de bacilo, con características quimio-heterótrofas, aerobias, con glicoesfingolípidos en la envoltura celular, pertenecientes al grupo de α -proteobacterias. Estas bacterias típicamente forman colonias de color amarillas, producen esfingoglicolípidos (SGL) del tipo glucuronosil ceramida (SGL-1) (Dworkin y Falkow, 2006) y contienen Ubiquinona 10 (CoQ10) en la cadena de transporte de electrones de la respiración aerobia celular.

El género incluye a más de 20 especies con una amplia diversidad en términos de sus características filogenéticas, ecológicas y fisiológicas. Ampliamente distribuido en la naturaleza este género bacteriano ha sido aislado de muchos hábitats terrestres y acuáticos, En los sistemas radiculares de las plantas y especímenes clínicos (Garrity, 2005). Este género ha sido ampliamente utilizado en diversas aplicaciones biotecnológicas, desde la biorremediación de contaminantes ambientales (Fuiji *et al.*, 2003, Hong *et al.*, 2002) hasta la producción de polímeros extracelulares esfinganos utilizados en la industria alimentaria (Johnsen *et al.*, 2002). En la agricultura se ha utilizado a *Sphingomonas* sp. OF 178 como promotora del crecimiento en plantas de maíz (Morales-García *et al.*, 2008).

En un nicho ecológico normal, las bacterias están sujetas a un constante estrés para poder sobrevivir, ya sea por la falta de nutrientes o por la alta competitividad para la captación de los mismos, incluso por la presencia de algún compuesto potencialmente tóxico en el ambiente. Durante la evolución de cada una de las especies protistas, se han desarrollado algunas estrategias de supervivencia, para establecerse en los ambientes naturales donde la competencia es intensa. Muchas de estas estrategias se han limitado a compartir el ambiente con otros tipos de organismos y así tratar de obtener algún efecto benéfico por ambas partes, un caso podría ser la microflora intestinal del ser humano, por una parte el ser humano le brinda un nicho donde poder sobrevivir así como parte de los nutrimentos requeridos por la microflora y en cambio la microflora provee de otros compuestos considerados como nutrientes para el hospedero (Monroy-Dosta *et al.*, 2009). Otra de las estrategias es el cambiar su batería metabólica durante un proceso de evolución que las hace más resistentes a ciertas condiciones o les confiere alguna ventaja competitiva en contra del resto de organismos presentes en su ambiente. Un ejemplo es la capacidad de degradar algún compuesto presente en el ambiente que ninguna otra de las especies u organismos sea capaz de hacerlo, esto le confiere la habilidad de sobrevivir sin tener una competencia directa por los nutrientes (Böltner *et al.*, 2008, Fuiji *et al.*, 2003, Hong *et al.*, 2002).

Así se pudieran mencionar muchos ejemplos de cómo es que los microorganismos se han adaptado y han evolucionado para su supervivencia en su hábitat, sin embargo, una de las estrategias que ha tomado un gran interés por parte de los investigadores es la que conlleva

a la producción y excreción de ciertas sustancias capaces de inhibir o atenuar el crecimiento de los organismos competidores en un ambiente dado (Riley y Wertz, 2002a).

Esta característica de ciertas cepas o microorganismos de producir sustancias con actividad antagónica ha tomado gran interés en base a los beneficios biotecnológicos (Monroy-Dosta *et al.*, 2009), biorremediación y de ámbito de la salud humana que pueden tener; resultan ser una herramienta aplicable en contra de organismos perjudiciales dentro del desarrollo industrial (Aguado Bautista *et al.*, 2010), la ecología o la salud humana (Engelhardt *et al.*, 2010).

Los microorganismos son capaces de producir una cantidad extraordinaria de sustancias para su defensa (Muñoz-Rojas *et al.*, 2004), que incluyen: antibióticos de amplio espectro (Morales-García *et al.*, 2007), productos metabólicos como el ácido láctico (Monroy-Dosta *et al.*, 2009), agentes líticos como las lizosimas, exotoxinas y bacteriocinas. Estas últimas siendo definidas como proteínas con actividad bactericida. Estos sistemas de defensa bacteriana son tan diversos como abundantes, pues se considera que tan solo cada una de las especies de microorganismos produce un tipo único de sustancia con actividad bactericida. En base a esto se pueden identificar tantas bacteriocinas como especies de bacterias, muchas de estas sustancias son de espectro estrecho, lo que indica que solo pueden inhibir el crecimiento de especies parecidas o relacionadas filogenéticamente (Riley y Wertz, 2002b).

Originalmente las bacteriocinas son definidas como compuestos proteicos de síntesis ribosomal que son capaces de inhibir cepas de la misma especie o especies relacionadas (Papagianni, 2003; Katikou, 2005). Son toxinas potentes y altamente específicas, que son producidas normalmente bajo condiciones de estrés, que causan la rápida eliminación de las células circundantes que no son inmunes o resistentes a su efecto (Roh *et al.*, 2010). Algunos estudios afirman que también pueden actuar frente a otras especies bacterianas, hongos y algunos parásitos (Monroy-Dosta *et al.*, 2009).

Las bacteriocinas representan una defensa de competición al inhibir cepas de la misma especie, así mismo esta actividad antagónica impide que su hábitat sea invadido por otras bacterias que pudieran comprometer su desarrollo. La aplicación de bacteriocinas como sistemas de control biológico se ve comprometido, ya que la gran variabilidad en estructuras químicas, ha limitado el desarrollar de procesos de extracción y purificación de estas sustancias (Riley y Wertz, 2002a).

Las bacteriocinas debido a su amplia presencia en cepas bacterianas del genero BAL (bacterias ácido lácticas) han sido utilizadas en la industria alimentaria con un grado de seguridad considerable, tomando muchas de estas sustancias el estatus de GRAS (generalmente reconocidas como seguras), iniciando con un péptido representativo de estos compuestos inhibidores (Piña-Suarez *et al.*, 2011), la nisina fue el primer compuesto en

obtener el estatus de GRAS en el año de 1988, dado que no es tóxica y se degrada por enzimas digestivas, además no brinda sabor o color (de Arauz *et al.*, 2008).

En la industria alimentaria se han considerado a las bacteriocinas (sin ser un factor primario en la preservación) como un elemento importante en los procesos de inocuidad; conocido como tecnología de “obstáculos” (“hurdle approach”) (Nuñez *et al.*, 2007), tecnología basada en el escalonamiento del proceso de preservación por medio de implementación de varios factores que ayuden a la preservación del alimento y no solo el dejar la tarea de preservación a un solo proceso que se aplica dentro de la industria alimentaria; estos pasos u obstáculos pueden ser factores intrínsecos (implementación de bacteriocinas, modificación de pH o uso de preservadores químicos) y factores extrínsecos (atmósferas modificadas, temperatura de almacenamiento) que actúan en forma de barreras frente al crecimiento microbiano (Leistner, 1994).

Clasificación de bacteriocinas

Kemperman en 2003 realizó una clasificación de las bacteriocinas por sus características bioquímicas que a continuación es citada:

- Clase I: Lantibióticos; son péptidos pequeños activos a nivel de membrana y que contienen algunos aminoácidos poco comunes como lantionina, β -metil-lantionina y dihidroalanina que se forman debido a modificaciones posteriores al proceso de la traducción. Con poca estabilidad al calor, péptidos policíclicos (< 5 KDa) con aminoácidos modificados. Un ejemplo bien conocido de estas bacteriocinas es la nisina; En función de su estructura y modo de acción, los lantibióticos se subdividen en 2 grupos:
 - Clase I A: Péptidos elongados y catiónicos que actúan a nivel de membrana y que engloban a los lantibióticos de un solo péptido y a aquellos que requieren la presencia de dos péptidos para ejercer su actividad antimicrobiana total.
 - Clase I B: Péptidos globulares e hidrófobos que actúan como inhibidores enzimáticos.

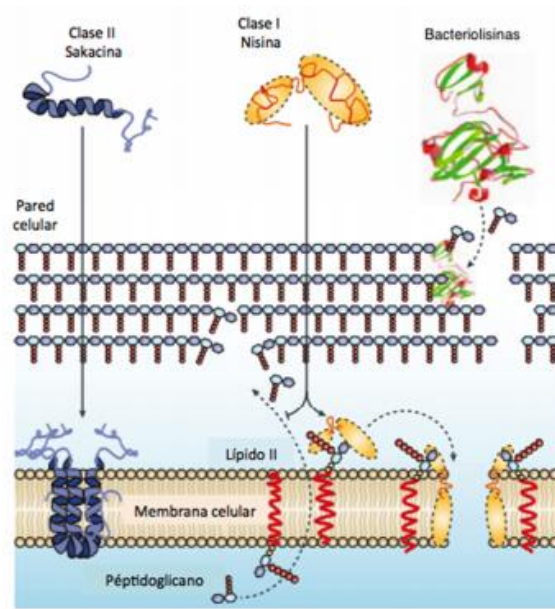
- Clase II: No lantibióticos; bacteriocinas lineales y no modificadas postraduccionalmente. Son péptidos pequeños (< 10 kDa) y termoestables, que actúan a nivel de la membrana plasmática. El representante más característico de este grupo es la pediocina PA-1, la bacteriocina más estudiada después de la nisina. En este grupo se pueden identificar tres subclases:
 - Clase IIa: Péptidos activos contra *Listeria*, tienen la secuencia consenso en la región N-terminal TGNGVXC y sus representantes característicos son la pediocina PA-1 y la sakacina-P.

- Clase IIb: Formadores de complejos para la formación de poros que consisten de dos péptidos diferentes. Ambos péptidos son necesarios para una mejor actividad antimicrobiana. En este grupo se encuentran la lactococcina G y las plantaricinas EF y JK.
- Clase IIc: péptidos pequeños, termoestables, no modificados y que se transportan mediante péptidos líder. En esta subclase solamente se reportan las bacteriocinas divergicina A y acidocina B.
- Clase III: bacteriocinas de elevado tamaño molecular (>30 kDa) y termolábiles. Las bacteriocinas más conocidas de esta clase son helveticina J, V, acidofilicina A y lactacinas A y B.
- Clase IV: bacteriocinas complejas. Son péptidos con una parte proteica y una o más fracciones lipídicas o glucídicas necesarias para su actividad biológica. Por tanto, esta clase incluye bacteriocinas que se consideran como glicoproteínas (lactocina S) o como lipoproteínas (mesenterocina 52).
- Clase V: bacteriocinas de estructura circular y no modificadas postraduccionalmente. A esta clase pertenecen la enterocina AS-48 y la gasicina A.

Modo de acción de las bacteriocinas

El modo de acción de las bacteriocinas varía dependiendo de su clasificación; la clasificación de las bacteriocinas se puede subdividir en tres tipos de mecanismo de acción generales: desestabilización de membrana citoplasmática (Piña-Suarez *et al.*, 2011), apertura de poros con pérdida de macromoléculas (Chen y Hoover, 2003) y unión a precursores de peptidoglicano (Cotter *et al.*, 2005).

Es decir que la clasificación estructural se puede resumir por una clasificación menor de 3 clases (con respectivas subclases estructurales) pero que tratan de englobar a las bacteriocinas por los mecanismos de acción en formación de poros en membrana celular.



Modo de acción de los antibióticos (Clase I), no-antibióticos (Clase II) y bacteriocinas (Clase III)

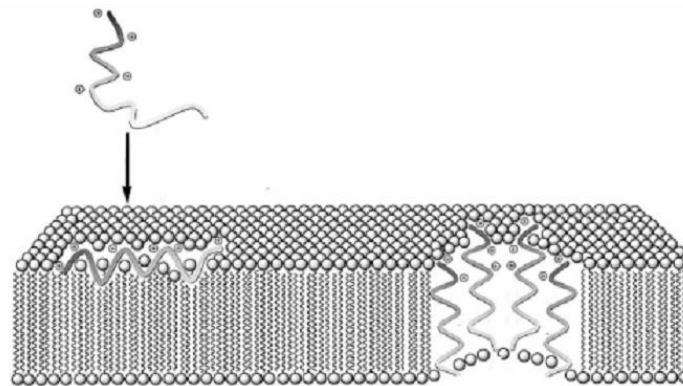


Fig 1. Mecanismos de acción de bacteriocinas por formación de poros, imagen tomada de Moll, *et al*, 1999).

El modo de acción de los antibióticos se atribuye a la desestabilización de las funciones de la membrana citoplasmática, por la formación de poros. La estructura de estos péptidos α -helice o β -laminar, pueden formar dos caras, una hidrofílica y otra hidrofóbica creando oligómeros que pueden atravesar la membrana formando poros (Chen y Hoover, 2003). La acumulación de nisina en la monocapa externa de lípidos de la membrana, conduce a su agregación y al enlazamiento del precursor del peptidoglicano, el lípido II. Conduciendo a la formación de un poro híbrido, compuesto por ocho moléculas de nisina y dos de lípido II (Piña-Suarez *et al.*, 2011). El lado apolar de las moléculas se situará próxima a los lípidos de la membrana y el lado polar al centro del poro. Como consecuencia se observará una pérdida de iones K^+ , ATP, aminoácidos y moléculas pequeñas.

Algunos miembros de la clase I, como la nisina, han demostrado un modo de acción dual. La nisina, se une a la pared celular mediante atracciones electrostáticas, lo cual se facilita

debido a la carga positiva de este péptido y las cargas negativas de los componentes de la pared celular. Posteriormente, se une al lípido II, transportador principal de peptidoglicano desde el citoplasma a la pared celular, previniendo la síntesis correcta de la pared celular. Provocando la formación de un poro transmembranal (Cotter *et al.*, 2005).

Los no-lantibióticos contienen dos péptidos en su estructura principal, en general los péptidos de esta clase tienen una estructura anfifílica helicoidal, permitiéndoles orientarse e insertarse en la membrana de la célula. El modo de acción principal se debe a la interacción con la membrana celular, causando la formación de poros y la disipación de protones causando un colapso en el gradiente de la membrana, haciendo susceptible a la célula de perder iones intracelulares (Naidu *et al.*, 2006).

Las bacteriocinas “pediocin-like”, utilizan moléculas ancla para el inicio de la despolarización de la membrana de los géneros sensibles a bacteriocinas de esta clasificación. Las bacteriocinas pediocina o “pediocin-like” utilizan el sistema de fosfotransferasa de la manosa (MAN-pts) como sistema de anclaje a la pared celular de las cepas sensibles (Mortren *et al.*, 2011). El mecanismo de acción de las bacteriocinas de la Clase III actúan directamente sobre la pared celular de las bacterias Gram-positivas causando la lisis celular (Cotter *et al.*, 2005).

Bacteriocinas de uso potencial en los alimentos

BAL	Bacteriocina	Microorganismo Susceptible	Alimento	Referencia
<i>Enterococcus durans</i> 41D	Duracina GI.	<i>Listeria monocytogenes</i> SCOTT A	Queso Artesanal	Du <i>et al.</i> , 2011
<i>Lactobacillus curvata</i>	Curvaticina FS47	<i>Listeria monocytogenes</i>	Carne molida Filetes de Salmon	Naidu <i>et al.</i> , 2006
<i>Lactobacillus sake</i>	Sakacina P	<i>Listeria monocytogenes</i>	Carne molida Filetes de Salmon	Naidu <i>et al.</i> , 2006
<i>Enterococcus</i>	Enterocina AS-48	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Bacillus cereus</i>	Jugo de lechuga Puré y sopas de vegetales	Settanni y Corsetti, 2008 Grande <i>et al.</i> , 2007
<i>Lactobacillus sake</i>	Sakacina	<i>Listeria monocytogenes</i>	Carne	Garriga <i>et al.</i> , 2002
<i>Lactococcus lactis</i>	Lacticina 3147	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538	Leche y suero de leche	Morgan <i>et al.</i> , 2000
<i>Enterococcus faecalis</i>	Enterocina 226 NWC	<i>Listeria monocytogenes</i>	Queso Mozzarella	Villani <i>et al.</i> , 1993

Tabla 1: Bacteriocinas propuestas con estatus QPS y cuya cepa productora es del tipo GRAS.

Sin embargo, se han encontrado estudios sobre el espectro de acción de *Lactobacillus plantarum* BS que puede actuar ante bacterias Gram-Negativas. Esto permite considerar la

acción de las bacteriocinas ante un espectro más grande de microorganismos de deterioro presente en la industria alimentaria (Rojas y Vargas, 2008).

Relación fuente de carbono con producción o biosíntesis de compuestos bioactivos antagónicos

Un aspecto importante en la biogénesis de algunos péptidos o moléculas con actividad antagónica es cómo se relacionan con los nutrientes esenciales para la biosíntesis de dichos compuestos; algunos géneros bacterianos como *Streptomyces* han logrado desarrollar rutas metabólicas en las que no es necesario presentar con una fuente nutricional de carbono y nitrógeno para realizar la biosíntesis de sus compuestos con actividad antagónica contra cepas competidoras o sensibles a dichos compuestos; la cepa *S. parvulus* es capaz de sintetizar una sustancia antagónica (actinomicina D) cuando se agregan compuestos esenciales para la síntesis de esqueletos carbonados precursores de dicho compuesto, estos compuestos derivan de la ruta de ciclo de ácidos tricarboxílicos dentro del metabolismo bacteriano (Inbar y Lapidot, 1991). Es por ello que en algunos compuestos con tal característica de “actinomicina-like” pueden ser sintetizados en medios de cultivo que no presenten gran complejidad en fuente de nitrógeno dado que para la síntesis de aminoácidos requeridos en la estructura de la actinomicina D para la biosíntesis el género *Streptomyces* puede utilizar amonio como fuente de nitrógeno, sin embargo el requerimiento nutricional especial con respecto a la fuente de carbono es la necesidad de incorporar un azúcar capaz de activar el ciclo de ácidos tricarboxílicos tales como manitol, fructosa y glucosa (Inbar y Lapidot, 1991), con el fin de poder brindar a la cepa productora los precursores requeridos en la biosíntesis de la sustancia inhibitoria..

Dentro de la biogénesis de bacteriocinas se ha demostrado que al menos se debe tener un grupo de cuatro genes en el genoma bacteriano para la síntesis de dichos compuestos, hablando específicamente de la biosíntesis de las bacteriocinas de la clase IIa. Estos genes incluyen; un gen estructural que codifica a un precursor, un gen de inmunidad o resistencia el cual codifica a la proteína que le brindara inmunidad para la bacteriocina sintetizada, genes codificadores de transportadores de unión a ATP y un gen de codificación de proteínas accesorias para la translocación de la bacteriocina con actividad (Cui y Zhang *et al.*, 2012).

Relación con otras rutas metabólicas o sistemas genéticos y sustancias antagónicas

La biosíntesis de bacteriocinas de la clase IIa está regulada por sistemas de *quorum sensing* (QS); siendo uno de los principales mecanismos de monitoreo ambiental de las colonias bacterianas, el cual ayuda a una respuesta de la colonia en global, a cambios en el número de bacterias o cambios en el número de especies presentes en el quorum. (Cui y Zhang *et al.*, 2012).

Los QS que regula la biosíntesis de las bacteriocinas de la clase IIa están compuestos por tres productos génicos; un péptido inductor, una proteína quinasa asociada a membrana (HPK) y un regulador de respuesta citoplasmático (RR). (Cui y Zhang *et al.*, 2012).

Los genes de producción de bacteriocinas y los genes de inmunidad normalmente están presentes en el mismo operón. Las bacterias productoras de bacteriocinas se protegen a sí mismas del péptido bioactivo con actividad inhibitoria que ellas mismas producen (Cui y Zhang *et al.*, 2012).

La secuencia líder de muchas de las bacteriocinas contiene dos residuos de glicina altamente conservados, teniendo la función hipotética de ser señal de reconocimiento para el procesamiento y secreción de la proteína madura. Esta secuencia líder del tipo glicina doble es removida por transportadores del tipo ABC dependientes de ATP al momento de ser translocadas al espacio extracelular (Cui y Zhang *et al.*, 2012).

Una preocupación acerca del uso de bacteriocinas para la preservación de alimentos es la selección de cepas resistentes. En estudios realizados con BAL han mostrado la generación de cepas resistentes a la actividad de bacteriocinas después de haber expuesto la cepa sensible a 25 ciclos de crecimiento sucesivo en presencia de la bacteriocina (Riley y Wertz, 2002a).

El tratamiento con una combinación de bacteriocinas, por ejemplo nisina y bacteriocina de clase IIa podrían reducir teóricamente la incidencia de resistencia (Dykes y Hastings, 1997).

Un problema adicional es si la resistencia a una clase de bacteriocina LAB puede resultar en una resistencia a otra clase de bacteriocina (Bouttefroy y Milliere, 2000).

Bacteriocinas como metabolitos secundarios

Las bacteriocinas son consideradas como productos del metabolismo secundario (enlazado a una ruta primaria de obtención de energía o metabolismo de nutrientes) en la finalización del crecimiento logarítmico del crecimiento microbiano.

Los metabolitos secundarios propiamente dichos son moléculas específicas o conjuntos específicos de moléculas muy parecidas (microheterogeneidad molecular), cuyo peso molecular no sobrepasa a los 1.5 KDa o, en muy pocos casos, los 2 KDa. Sin embargo, se ha señalado que los polisacáridos extracelulares, los pigmentos y las toxinas tienen muchas características comunes con los metabolitos secundarios. Entre otras sustancias de alto peso molecular que pueden ser incluidas dentro del concepto de metabolito secundario se encuentra el γ -poli-D-glutamato capsular de *Bacillus anthracis* y *B. subtilis*, la estreptolisina S de los estreptococos del grupo A, la neurotoxina de *Shigella dysenteriae*, el factor de permeabilidad vascular de *Vibrio cholerae* y algunas bacteriocinas.

La producción de enzimas extracelulares está incluida en el metabolismo primario. Sin embargo, algunos exoenzimas degradativas solo se producen una vez terminada la telofase. Que requieren el cese del crecimiento balanceado y se consideran en la categoría de metabolito secundario. A pesar de ser una ruta constitutiva las bacteriocinas recaen en esta categoría de macromolécula por ser resultado de una derivación de los procesos metabólicos de las cepas productoras, a pesar de ser sus mecanismos de acción para sustentar su superioridad en el co-crecimiento con bacterias competidoras sensibles. (Parés y Juárez, 2002).

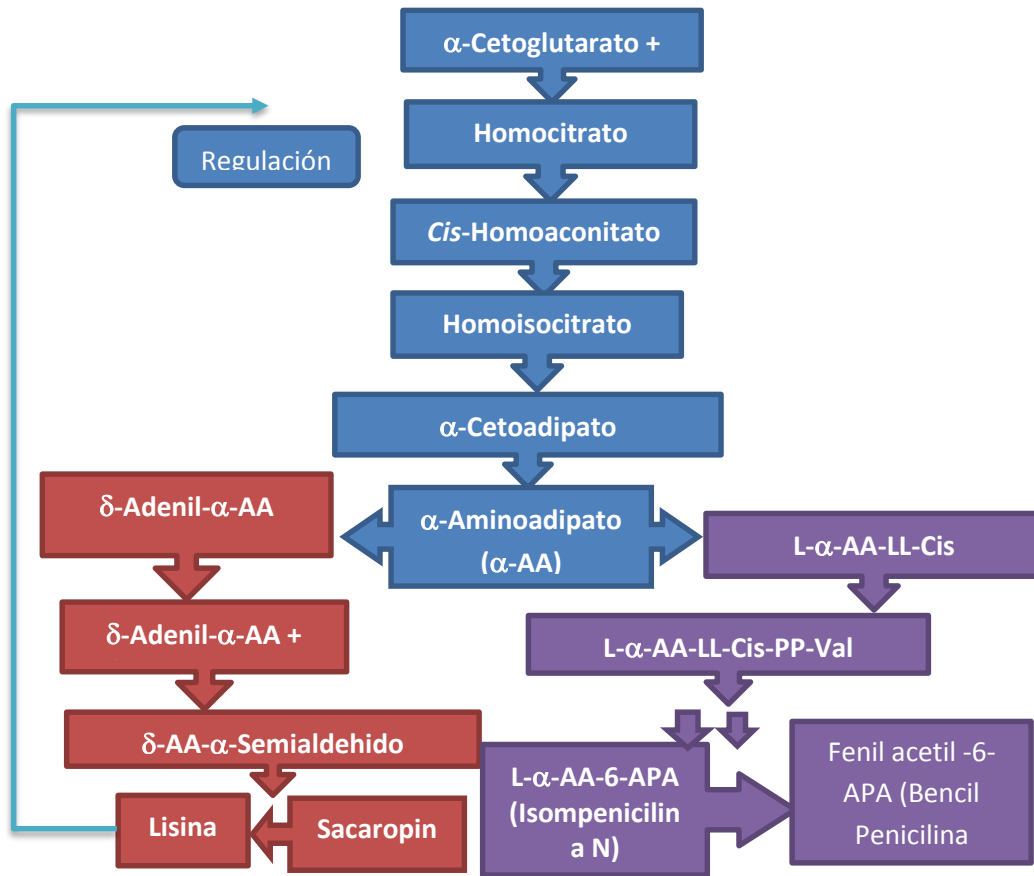


Fig 2: Vía de biosíntesis de lisina y de la bencilpenicilina. *Penicillium chrysogenum*, relación biosíntesis de sustancias antagonicas. Derivación de los procesos metabólicos.

Sustancias con actividad antagonica; estrategia de supervivencia bacteriana

Las sustancias con actividad antagonica se encuentran ampliamente dispersas en los procariontes, sin embargo cada una de estas sustancias inhibitorias tienen su modo de acción dentro de las cepas y especies sensibles a la sustancia. Las bacteriocinas de espectro reducido producidas por diversas bacterias como por ejemplo *Lactobacillus lactis* (Riley y Wertz, 2002a) han sido muy estudiadas, sin embargo, los microorganismos con capacidad antagonista se han usado como modelos de estudio para caracterizar otras sustancias

inhibitorias; por ejemplo antibióticos de amplio espectro como el cloranfenicol producido por *Streptomyces venezuelae*, la penicilina producida por *Penicillium notatum*, la kanamicina por *S. kanamicinaceae*, la tetraciclina por *Streptomyces aureofaciens*, entre otros. La naturaleza química de estas sustancias inhibitorias es muy diversa (Fig. 6).

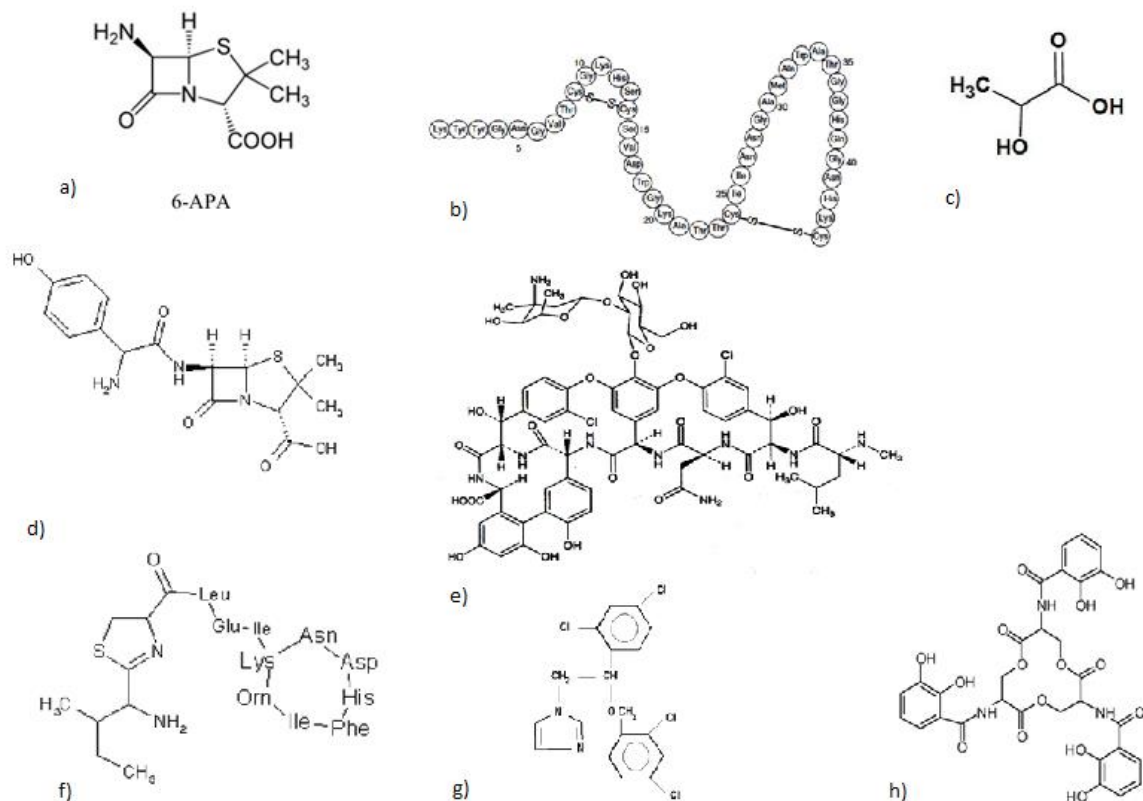


Fig. 3. Ejemplo estructuras químicas consideradas sustancias inhibitorias y que presentan diversos espectros de inhibición: a) Penicilina, b) Pediocina PA-1, c) Ácido láctico, d) Amoxicilina, e) Vancomicina, f) Bacitracina A, g) Miconazol y h) Enterobactina.

Estrategias de supervivencia bacteriana: Mecanismos de inhibición

La estrategia de los microorganismos para sobrevivir no consiste únicamente en su adaptación a los factores ambientales físicos y químicos, o en sus relaciones con los organismos pluricelulares, pues hay diversas especies de microorganismos libres que compiten por el alimento y el hábitat. La forma en que compiten con ellos es un ataque directo a procesos metabólicos vitales. Distintas especies fúngicas y bacterianas secretan sustancias que intoxican específicamente determinados procesos metabólicos de otras especies. La gran importancia de estas sustancias inhibitorias se basa en su especificidad. Atacan de forma específica los procesos metabólicos de las bacterias sensibles, siendo inocuos para otros géneros u organismos (Tabla 2). Los mecanismos de acción son variados

y dependen en gran medida del tipo de ruta metabólica interferida y los receptores por los cuales pueden llegar a introducirse en los organismos sensibles.

Modo de acción de algunos antibióticos	
<i>A</i>	Impiden la síntesis de la pared celular, matan las bacterias durante la división celular. Actúan principalmente sobre las bacterias Grampositivas: Penicilina, cefalosporina, enduracidina, prasinomicina, bacitracina.
<i>B</i>	Influyen en el transporte a través de la membrana plasmática: Polipéptidos (nefrotóxicos, neurotóxicos): polimixinas, gramicidina, tirocidina, valinomicina. Polienos (activos frente a los hongos, nefrotóxico): amfotericina, nistatina, candicina.
<i>C</i>	Inhiben la replicación del DNA: fleomicina, bleomicina, mitomicina, porfiromicina.
<i>D</i>	Inhiben la transcripción: actinomicina, cromomicina, rifampicina, cordicepina, estreptolidina.
<i>E</i>	Inhiben la traducción: Puomicina (determina ruptura en la cadena, tanto en procariontes como en eucariontes)

Tabla 2. Mecanismo de acción; generales de inhibición por sustancias antagonicas.

Otra forma de inhibición ocurre evitando la transcripción o duplicación del ADN de las cepas sensibles a este tipo de compuestos químicos, que conlleva a la muerte celular (Monroy-Dosta *et al.*, 2009), este es un mecanismo secundario de los péptidos que presentan una actividad antagonica contra algunos genero procariontes y eucariontes (Keller *et al.*, 2010); como el caso de la actinomicina C obtenida a partir de cepas productoras del genero *Streptomyces* (Keller *et al.*, 2010)

La actinomicina es un cromopéptido lactona producido en varias cepas de *Strpetomyces* (Fig. 4) y consiste en un cromóforo fenoxazinona (actinocin) con dos anillos pentapéptidos lactonas con una unión amida (Inbar y Lapidot, 1991). La cadena lateral de pentapéptidos presentada en la estructura de actinomicina D, nos indica una forma de estabilización de la molécula cuando interactúa con dsDNA al unirse la región del pentapéptido por un enlace de hidrogeno a regiones de guanina dentro de dsDNA y así asociando el anillo tricíclico de fexazona con mayor estabilidad a los residuos de guanina o adenina en la cadena opuesta de DNA, haciendo un modo de unión a dsDNA con mayor estabilidad en DNA de doble cadena, por lo que se menciona un efecto inhibitorio potenciado con respecto a DNA de una sola cadena (ssDNA) (Paramanathan *et al.*, 2012).

La actinomicina D (Fig. 5) forma complejos con los restos desoxiguanosinicos del DNA, bloqueando su función como molde. Por lo tanto, la actinomicina D inhibe tanto la DNA polimerasa como la RNA polimerasa dependiente de DNA, afectando procesos metabólicos como la replicación y transcripción del DNA por ATPasa dependiente de DNA (Ngoc Quang *et al.*, 2011).

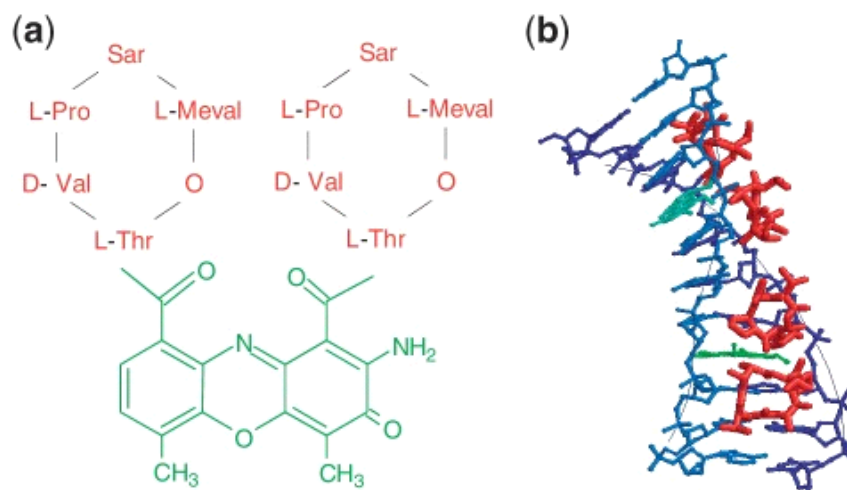


Fig. 4. Mecanismo de acción de actinomicina D por intercalamiento con la cadena de dsADN. (Figura tomada de Paramanathan *et al.*, 2012); a: estructura de Actinomicina D, b: unión de la actinomicina D a dsDNA donde la región en verde corresponde al núcleo de actinomicina D unido a dsDNA en el surco menor. Ejemplo de sustancias antagónicas producidas, con actividad conocida, producidas por género *Streptomyces*.

Relevancia Bioquímica en la síntesis de sustancias inhibitorias: actinomicina producida por el género *Streptomyces*

La ruta biosintética de la actinomicina en las cepas de *Streptomyces* está desarrollada de forma detallada, describiendo cómo es que se modifican los precursores de dos moléculas de aróil pentapéptido lactona (ácido 4-Metil-3-Hidroxiantranílico “4-MHA”); este compuesto es derivado del triptófano (Keller *et al.*, 2010).

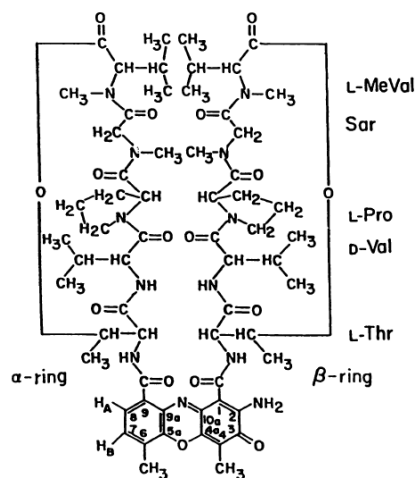


Fig. 5. Estructura molecular de la actinomicina producida por los géneros *Streptomyces* (Inbar y Lapidot, 1991).

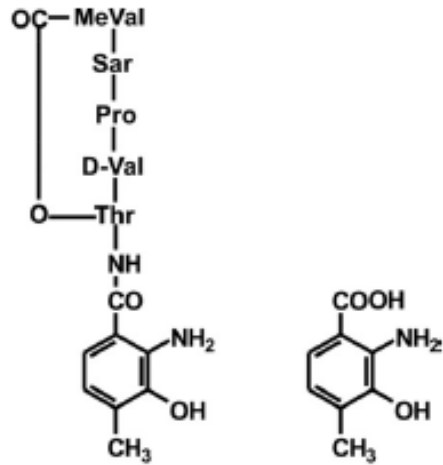


Fig. 6. Estructura del 4-MHA pentapéptido lactona (lado izquierdo) precursor del esqueleto carbonado de media estructura química de actinomicina C, estructura de ácido 4-Metil-3-Hidroxiantranílico 4-MHA (lado derecho) (Keller *et al.*, 2010).

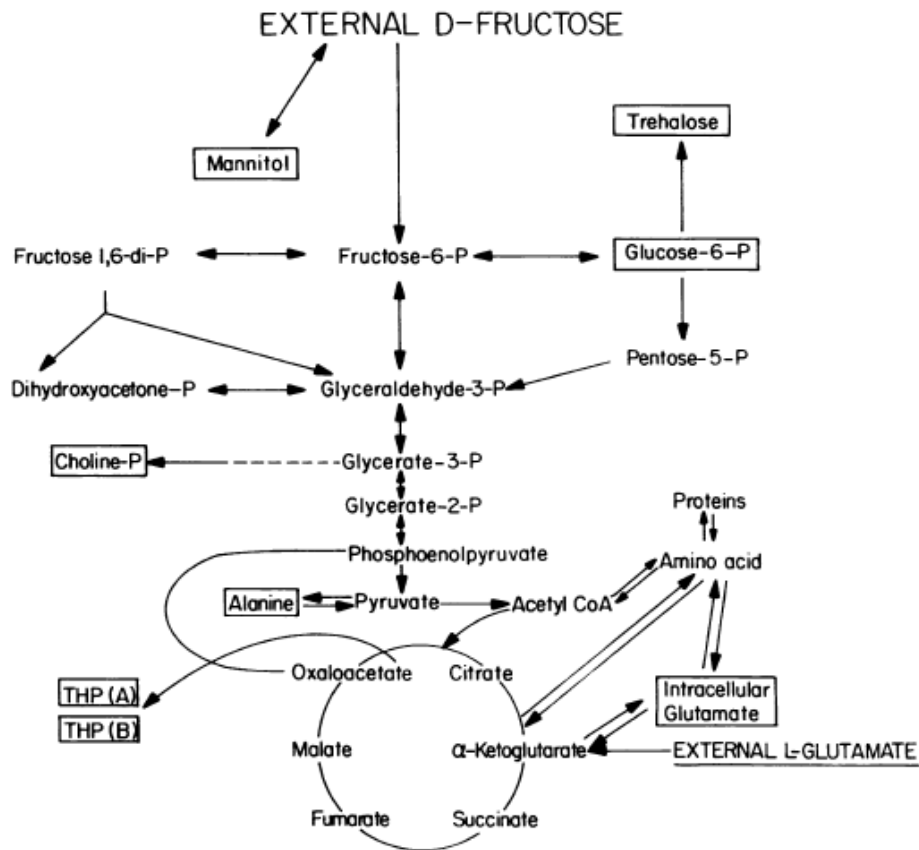


Fig. 7. Síntesis de precursores para la ruta biosintética de actinomicina D producida por *Streptomyces parvulus* y los eventos relevantes para la producción de dichos compuestos en el metabolismo del carbono de la *S. parvulus* (Inbar y Lapidot, 1991). Ejemplo de relación fuente de carbono producción de sustancia antagónica.

Esto logra recalcar la importancia de brindar a la cepas productoras de sustancias inhibitorias los nutrientes necesarios para que su ruta biosintética se vea comprometida o truncada por falta de algún compuesto requerido para la formación de los precursores estructurales de la sustancia antagónica o que la biosíntesis de dicha sustancia resulte ser un coste energético muy elevado el cual la cepa productora ya no pueda sustentar dicha biosíntesis por falta de nutrientes (Madigan *et al.*, 2011).

Las cepas productoras de actinomicina C (en sus diversos isómeros), por lo menos en el género *Streptomyces*, presentan una actividad enzimática específica en las siguientes enzimas.

- Isoformas específicas de triptófano oxigenasas
- Kynuranina formidasa
- Kynuraninasa activa

Procesos biotecnológicos: Estrategias de identificación de cepas productoras de bacteriocinas

Actualmente, gracias a las nuevas técnicas de identificación de bacteriocinas, se han logrado identificar gran número de cepas productoras de este tipo de compuestos bioactivos. Więckowic y cols. 2011 logró identificar gran número de cepas potencialmente productoras de bacteriocinas gracias a sus ensayos de PCR con cebadores diseñados para identificar secuencias consenso de bacteriocinas del tipo IIa. Dirix y cols. (2003) identificó cerca de 50 bacteriocinas novedosas por la identificación de la región líder de doble glicina identificada en las bacteriocinas de la clase IIa (Cui y Zhang *et al.*, 2012).

El termino bacteriocina ya no solo están correlacionados con las bacterias ácido lácticas si no que, gracias a los ensayos de Dirix y cols. (2004) se han logrado identificar cerca de 120 péptidos “bacteriocin-like” o bacteriocinas de Gram-negativas que cumplen con las características estructurales y de actividad antagónica con las que se clasificaban a las bacteriocinas de los géneros bacterianos BAL (bacterias ácido lácticas) (Cui y Zhang *et al.*, 2012).

La detección de cepas productoras de bacteriocinas es muy importante pues permite hacer estudios que establezcan su potencial en el manejo y control de procesos infecciosos en especies animales, así como su uso en la industria alimentaria, sin embargo es un protocolo con altos inconvenientes para la obtención y purificación de las bacteriocinas o sustancias (compuestos) con actividad antagónica contra ciertos géneros bacterianos u organismos procariontes (Monroy-Dosta *et al.*, 2009).

Las sustancias de tipo inhibitorio pueden ser usadas como estrategia para realizar un control biológico efectivo, por ejemplo en la enfermedad de marchitamiento por *Fusarium*, ha

surgido una alternativa en el control biológico de este fitopatógeno (Piña-Suarez *et al.*, 2011). Para este propósito algunas cepas bacterianas colonizadoras de raíz con actividad benéfica en el crecimiento vegetal han sido objeto de estudio para la búsqueda de sustancias inhibitorias, entre las cuales están cepas de los géneros: *Pseudomonas* (*Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *P. aureofaciens*); *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. polymyxa* y *B. cereus*), algunas cepas de *Fusarium* no patógenas, cepas del género *Actinobacter*.

El género *Streptomyces*, que ha sido caracterizado ampliamente como un género candidato para su uso en procesos de biocontrol por su capacidad de producción de antibióticos (Kanini *et al.*, 2013), además produce lisis de la pared fúngica, es altamente competitiva por nutrientes dentro de habitats altamente competitivos (Taechowisan *et al.*, 2009).

Producción y purificación de bacteriocinas

En el sistema de producción de antibiótico por parte de los géneros de *Streptomyces* se ha logrado determinar que existe una modificación de su actividad antifúngica dependiente de factores como; nutrientes utilizados para el crecimiento de *Streptomyces*, pH y temperatura. Se observa que una forma de obtener un sistema óptimo se tiene al utilizar medios de crecimiento con glucosa como fuente de carbono y peptona como fuente de nitrógeno; la temperatura de incubación ideal es de aproximadamente 28°C, y con una condición de pH de 8 (Kanini *et al.*, 2013). Por esta razón es importante determinar las condiciones óptimas de cultivo para cada cepa productora de sustancias inhibitorias o antagonicas, como se observó en el estudio de Kanini y cols. (2013), un cambio en la composición del medio puede alterar la capacidad de producción del metabolito con actividad antagonica puede verse comprometida de tal manera que esta misma cepa antagonica ya no sea capaz de producir el bioproducto con la cual ejercía un control biológico sobre cepas del género fúngico *Fusarium*.

Es importante determinar las características ideales de producción para cada una de las moléculas o metabolitos con actividad antagonica, tales como las condiciones o requerimientos nutricionales necesarios de cada cepa productora. Las condiciones de producción son específicas para cada organismo productor (Pascual *et al.*, 2008), así como particulares son los procesos de extracción purificación (Quesada-Chanto, 2013).

Procesos Biotecnológicos: Extracción de sustancias inhibitorias

Se ha tomado un largo tiempo el poder caracterizar completamente a las pocas sustancias inhibitorias con importancia en el desarrollo humano, que se conocen hasta este momento; estas sustancias pueden ir desde sustancias sencillas como lo son el ácido láctico hasta sustancias de alta complejidad como lo son los sideróforos producidos como la enterobactina y la aerobactina, pasando por sustancias ya conocidas como tetraciclinas, nisina, o los β -lactámicos (Muñoz-Rojas *et al.*, 2004). Por otro lado, debido a la diversidad en composición o estructuras químicas se ha vuelto una tarea complicada el estandarizar un

método para la posible purificación y caracterización de tantas sustancias diferentes, por lo que se deja a la imaginación del investigador el plantear un método para la extracción, purificación y caracterización de las sustancias inhibitorias que se deseen investigar (Sawa *et al.*, 2008; Hervé-Grépinet, 2009; Muñoz-Rojas, 2004). Una posible similitud que comparten todas estas sustancias antagónicas, y que puede ser el punto de partida para proponer un método de extracción y purificación, es que todas ellas son sustancias orgánicas, lo que nos abre las posibilidades de poder utilizar como primera instancia, como una purificación primaria, aun así debido a su complejidad estructural, es posible que no todas las sustancias inhibitorias puedan ser exitosamente extraídas o disueltas por el mismo disolvente. De la misma forma al separar la sustancia se deben de realizar ensayos para poder determinar sus variantes fisicoquímicas, como temperatura, pH y concentraciones óptimas para su acción inhibitoria, tiempo de vida media o si no tiene un efecto sinérgico o de competitividad con alguna otra sustancia, termolabilidad o fotoreactividad, determinar sus condiciones óptimas de almacenamiento, entre otras (Valcárcel-Cases, 1988; Sawa *et al.*, 2008).

Para delimitar el tamaño molecular de las sustancias inhibitorias, se pueden usar hojas de membranas de diálisis con poros de tamaños diferentes (12000, 6000, 3500 y 3000 Da), colocadas en el medio de cultivo y la cepa de interés sobre las membranas de diálisis, posteriormente se removerá y se determinará la actividad antagónica, con esto se puede conocer si la sustancia antagónica es capaz o no de atravesar la membrana después de colocar una cepa indicadora (Muñoz-Rojas *et al.*, 2005). La centrifugación con filtros de nitrocelulosa de tamaño de poro que va desde 3 a 50 KDa es otra de las metodologías utilizadas para la determinación de tamaño de molécula y para la disminución de contaminantes, o sustancias no deseables en la solución (Machuca-Sánchez y Hervás-Torres, 2014). En casos especiales donde la molécula inhibitoria sea de naturaleza proteica se puede optar por el uso de geles de acrilamida con marcadores para conocer el tamaño aproximado de la molécula (Muñoz-Rojas *et al.*, 2005).

Sistemas de extracción de sustancias y compuestos orgánicos de interés biotecnológico.

El proceso de extracción se puede resumir en los siguientes pasos, tomando en cuenta que las operaciones unitarias deben ser adaptadas especialmente para el producto a obtener

- A. Desintegración del microorganismo o células: Si el bioproducto de interés es intracelular es necesario la desintegración de la membrana o pared celular para que el bioproducto de interés se libere al medio y así poder continuar con los siguientes pasos.
 - i. Utilizar pH extremos con un tiempo de 20 min
 - ii. Realizar procesos de sonicación
 - iii. Utilizar enzimas digestivas

- iv. Procesos de prensado o a presión
- v. Utilizar agentes químicos degradadores de membrana; disolventes orgánicos para desestabilización de membranas y pared celulares.
- vi. Utilizar sistemas de ruptura de membrana celular.

B. Clarificación del medio: Separación de la biomasa o restos celulares no deseados o que no cuentan con el bioproducto de interés del resto del medio de cultivo

- i. Filtración: Sistema en el que se interviene la implementación de una membrana, con un tamaño de poro conocido, separación de la biomasa por restricción física. (Quesada-Chanto, 2013)

Este sistema se puede realizar de dos maneras a través de:

- Filtros profundos: matriz filamentososa, lana de vidrio, algodón o papel filtro. El gradiente de filtración se observa en la matriz filtrante quedando atrapadas las impurezas en distintas profundidades de la matriz. El tamaño de poro puede variar a lo largo de la matriz filtrante
- Filtros absolutos: en este tipo de filtros las partículas a filtrar son más grandes del tamaño de poro, igual que en los sistemas de filtros profundo. En este sistema las impurezas o partículas que se desean remover del medio que contiene al bioproducto de interés quedan retenidas sobre la superficie de las membranas utilizadas como sistemas filtrantes, un ejemplo de ello son los filtros hechos de biopolímeros como la nitrocelulosa (Fig. 8).

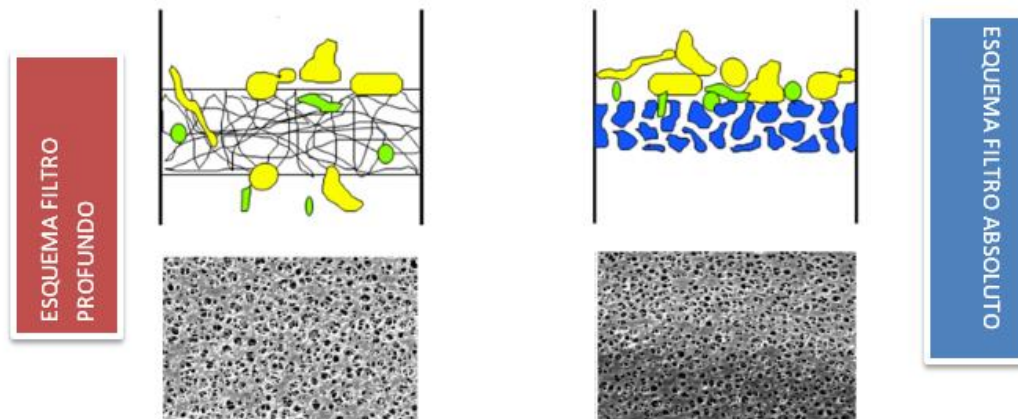


Fig. 8: En la parte izquierda de la imagen, representamos un sistema filtrante del tipo profundo, en la que las impurezas de los sistemas a filtrar se ven retenidos dentro de la matriz porosa de la que está constituido el filtro; de la parte derecha se observa los sistemas filtrantes absolutos, en los que el tamaño de poro de la matriz filtrante impide que las impurezas penetren en el poro; haciendo que la torta de material que se desea filtrar se empaquete en la parte superior del filtro.

- ii. Precipitación: Este es el proceso por el cual las partículas suspendidas en cualquier tipo de disolución y por efecto de la gravedad son depositadas en el fondo del recipiente, se puede modificar por la incorporación de floculantes químicos. Que pueden alterar las características químicas del producto de interés. (Machuca-Sánchez y Hervás-Torres, 2014).
 - iii. Centrifugación: Consiste en la separación de dos fases de densidad semejante creando un campo de fuerza centrífuga mediante rotación. (Costa-López *et al.*, 1991), una limitante de la centrifugación es la necesidad de calcular un valor aproximado del factor Svedgber o tasa de sedimentación de partícula.
- C. Concentración del producto: Remoción de moléculas contaminantes o metabolitos secundarios (Concentración del producto), nutrientes no utilizados en el crecimiento celular, es decir la eliminación de toda biomolécula no removida en la etapa de clarificación. Se comienza a eliminar factores externos que afecten la concentración del metabolito de interés por medio de la disminución del excedente de disolvente o medio de cultivo. (Ibarz y Barbosa-Cánovas, 2005)
- D. Purificación del producto: En este paso se desea la eliminación de todo metabolito o nutriente aun remanente en el medio. Para esta etapa se utiliza un sistema de extracción por disolventes orgánicos, en los que el bioproducto se trata de concentrar y separar de las impurezas a través de su traslado de una fase acuosa (medio de cultivo o producción) a una fase orgánica (la cual está representada por el disolvente orgánico utilizado en el proceso de extracción); antibióticos como las bacitracina, tetraciclinas, actinomicina C y algunas penicilinas son extraídas por este proceso (Quesada-Chanto, 2013).

Esquema general de producción y purificación de bioproductos de interés tomado de Quesada-Chanto 2013

Producción y purificación de bacteriocinas (sustancias inhibitorias/ bioactividad antagónica)

En un proceso de extracción se consideran los siguientes puntos para el desarrollo de un proceso particular de extracción (Xing *et al.*, 2011):

- Concentración que se desea alcanzar; la cantidad de producto (metabolito de interés) alcanzado por unidad de volumen o por unidad de peso de producto final obtenido junto con impurezas remanente del proceso de producción o purificación.
- Presencia de subproductos; contaminantes o presencia de productos no deseados.

- Impurezas del medio; aquellos nutrientes no utilizados por el microorganismo para su crecimiento o en la biosíntesis del metabolito de interés
- Estabilidad química y física del bioproducto de interés; para determinar si el proceso de extracción o purificación se puede llevar a cabo por separaciones físicas o de intercambio iónico, de reparto (extracción) por disolventes, etc.
- Grado de pureza necesario; saber el número de pasos u operaciones unitarias involucradas en el método de extracción para llegar al grado de pureza ideal que se requiera del producto sin comprometer su integridad química o afectar alguna característica como su tiempo de vida media de almacenaje.
- Naturaleza del producto; indica principalmente si el bioproducto es excretado por la célula o microorganismo, o está ubicado en el espacio citoplasmático. Un ejemplo es que los antibióticos (tetraciclinas, bacitracinas, penicilinas, lantibióticos, etc.) son bioproductos extracelulares que necesitan de un proceso de extracción o purificación diferente al utilizado para la obtención de enzimas digestivas de levaduras (Quesada-Chanto, 2013; Páez-Hernández *et al.*, 1997).

Aunque son variadas las formas de extracción y obtención de un bioproducto y el tipo de operación unitaria depende del producto en sí; se puede realizar un esquema general o global para guiar los procesos de extracción de sustancias/metabolitos activos de interés (Xing *et al.*, 2011).

La aplicación de esta metodología global en un esquema práctico para la obtención de bacteriocinas puede realizarse tomando en cuenta en primer lugar. La detección de cepas productoras de bacteriocinas para establecer el potencial en el manejo y control de procesos infecciosos en muchas especies de animales así como su uso en la industria de alimentos, principalmente. Sin embargo para esto se requiere de varios pasos metodológicos para identificar, producir y purificar dichas sustancias. (Monroy-Dosta *et al.*, 2009).

- Estudios de producción: la producción de algunas bacteriocinas (sustancias inhibitorias) puede ser favorable bajo ciertas condiciones de crecimiento, parámetros como la temperatura y el pH nos pueden alterar los rangos de producción de una sustancia inhibitoria producida por algún microorganismo (Chang *et al.*, 2007).
- La composición del medio de crecimiento. En general los medios complejos que contienen una fuente rica de nitrógeno son óptimos para el aumento de producción de bacteriocinas (sustancia inhibitorias de naturaleza proteica) fuentes de carbono, nitrógeno y otros nutrientes adecuadas para la óptima producción de la sustancia inhibitoria (Kawai, 2003).

- Una vez establecida la producción ideal de sustancia inhibitoria de interés se remueven las células por centrifugación y se precipitan las proteínas con la adición de sulfato de amonio. Los métodos más comunes son la precipitación con sulfato de amonio seguido de una cromatografía HPLC (Svetoslav *et al.*, 2004) esto cuando ya se conoce la naturaleza proteica de la sustancia inhibitoria.
- Para comprobar las características químicas de las sustancias inhibitorias producidas y extraídas se tratan las muestras obtenidas con proteasas (proteínasa K, Pronasa E, etc.) o con otras enzimas (α -amilasa, Lipasa A, lisozima, aminopeptidasa, DNAsa y RNAsa); después se determina el tamaño del compuesto producido mediante ultrafiltración o detectar actividad en geles desnaturalizantes (Tiwari y Srivastava, 2008)
- Se determina el rango de acción inhibitorio de la sustancia extraída haciendo diferentes pruebas de inhibición *in vitro*, se han descrito dos formas de realizar estos ensayos, una es el antagonismo directo y otra el indirecto: la primera técnica consiste en hacer crecer la cepa productora de la sustancia inhibidora junto a una cepa indicadora o sensible, posterior a la incubación se observa la formación de halos de inhibición. La segunda técnica consiste en hacer crecer en primer lugar la cepa productora de la sustancia inhibidora, de esta forma se permite que libere la sustancia, la cepa ensayada como productora es retirada y solo entonces se siembra la cepa contra la cual se desea observar el efecto antagónico (Monroy-Dosta *et al.*, 2009).

Estos pasos se adaptan a las necesidades individuales de cada uno de los bioproductos que se desean purificar o extraer del medio en que son producidos, tratando de eliminar la mayor cantidad de productos secundarios que no presentan un valor o de nutrientes no utilizados en el sistema. (Xing *et al.*, 2011). Un ejemplo de este proceso lo brindan Xing y cols. (2011), en su protocolo de extracción de ácido cafeico de *Elshotzia splendens*, con un proceso de extracción líquido-líquido. La elección del disolvente ideal dependerá de cada caso en particular, por lo que no se puede hacer mención de un disolvente ideal o universal para realizar los procesos de extracción (sistemas líquido-líquido o sistemas sólido-líquido) (Quesada-Chanto, 2013) pues el disolvente depende de las características moleculares de cada uno de los compuestos a extraer, así como algunas propiedades relativas al proceso de extracción.

Sistemas de extracción líquido-líquido o líquido-sólido

Fundamentos y generalidades de procesos de extracción líquido-líquido

El fundamento básico de la extracción líquido-líquido es la separación de algún compuesto de interés dentro de una disolución, por ser miscible o no dentro de una gama de disolventes que pueden ser utilizados y que además puedan ser capaces de no disolver a otras sustancias presentes en la disolución; impurezas. En base a eso a la solución obtenida del crecimiento microbiano en un cultivo por lote se le somete a la presencia de un volumen de disolvente, capaz de separar la solución inicial en más de una fase, las cuales tendrán diferentes concentraciones de la sustancia de interés con base a la afinidad que tiene la sustancia con respecto al disolvente o a la fase acuosa de cultivo (Abrego-Garrués *et al.*, 2010). Este diferencial de concentración se puede llevar a cabo gracias a que gran parte del cultivo no es miscible dentro del disolvente utilizado creando una interface en la que ambas partes, el cultivo y el disolvente puro están en contacto directo pero no se mezclan en solución, creando una región de tensión, similar a la membrana celular, que actúa como barrera para la migración de sustancias. Esta tensión creada entre ambas fases es alterada por la aplicación mecánica de agitación, haciendo que ambas fases, disolvente y cultivo, entren en contacto íntimo haciendo que se dé la transmisión de sustancias por afinidad con respecto a las sustancias en solución y el disolvente empleado (Villegas-Casares *et al.*, 2006).

Este tipo de métodos se utilizan ampliamente en la industria, siendo uno de las formas de transferencia de masa más estudiada dentro de las operaciones unitarias, y es una alternativa muy utilizada y ampliamente confiable para la extracción de sustancias termolábiles o con puntos de ebullición similares a las de la solución original y que por lo tanto no pueden ser sometidas a procesos tales como la destilación o evaporación/condensación, por medio de la aplicación de calor (Hermida Bun, 2000; Valcárcel-Cases *et al.*, 1988).

Fundamentos de la extracción.

Hoy en día la extracción con disolventes orgánicos es uno de los procesos más efectivos y económicos para purificar, concentrar, separar y purificar compuestos orgánicos de alto interés biotecnológico (Páez-Hernández *et al.*, 1997). Compuestos de interés que en ocasiones son provenientes de operaciones de fermentación bacteriológica. La extracción se basa en el principio por el cual un soluto puede distribuirse en cierta proporción entre dos disolventes inmiscibles entre sí (normalmente uno es agua; fase acuosa), o una matriz sólida (fase sólida); y en un disolvente orgánico (Ullauri, 2010).

Ventajas de la extracción como modelo de separación de compuestos de interés:

- I. Tienen una cinética rápida; pero para ello es requisito lograr un buen contacto entre ambas fases del procesos, con este fin es necesario realizar una agitación intensa, evitando la emulsificación total del disolvente orgánico (extracción líquido-líquido) (Páez-Hernández *et al.*, 1997). En la lixiviado, el tiempo de contacto (asegurar una inmersión total de la fase sólida en el disolvente), la agitación (Ullauri, 2010). Se tiene que evitar que el disolvente se quede colectado en la matriz porosa de la fase sólida (Quesada-Chanto, 2013).
- II. Son altamente selectivos si se logra escoger el disolvente o disolventes ideales para el compuesto de interés.
- III. Si se logran controlar factores externos como; pH, temperatura y fuerzas iónicas que afecten la extracción pueden obtenerse altos rendimientos en los procesos de extracción y concentración.
- IV. Son extracciones que logran en algunos casos estabilizar al compuesto de interés (Páez-Hernández *et al.*, 1997) o no comprometer la estabilidad química (Quesada-Chanto, 2013).

La recuperación (extracción) abarca técnicas muy variadas y no hay operaciones únicas o universales para la extracción de todos los compuestos, ni siquiera secuencias ideales de procesos para la recuperación de compuesto (Quesada-Chanto, 2013). Las operaciones unitarias individuales deben de combinarse en forma de un proceso lineal de extracción, para la extracción con mayores rendimientos posibles para cada sistema en particular (Proceso ideal individual) (Ullauri, 2010).

Procesos de reparto (extracción)

Los procesos de extracción más utilizados para las sustancias inhibitorias son: reparto simple y extracción por solvatación (Páez-Hernández *et al.*, 1997).

Reparto simple: también denominada extracción por distribución física

En el reparto simple el soluto A que se encuentra disuelto en una fase cual denominada fase 1 se distribuye a una fase 2 (inmiscible o parcialmente miscible en la fase 1) sin cambiar su estructura química (Páez-Hernández *et al.*, 1997). En este tipo de reparto de soluto A, el proceso de extracción o reparto entre ambas fases depende de factores como la solubilidad entre una u otra fase, es decir que en el equilibrio de reparto de A en ambas fases no se observa explícitamente una dependencia con alguna otra especie

Extracción por solvatación

Este tipo de extracción involucra la coordinación de moléculas del disolvente (S) directamente al átomo central de las especies químicas a extraer, o bien indirectamente a la coordinación con las moléculas de agua, dando paso a la formación de especies solubles en la segunda fase/fase orgánica.

En este tipo de extracciones se deben tomar en cuenta algunas características de la interacción disolvente/sustancia a extraer.

Tomando en cuenta un equilibrio tal



Los factores que afectan la recuperación de la especie L en el proceso de reparto simple son, el coeficiente de reparto $(K_D)_L = \frac{[\bar{L}]}{[L]}$ y la relación de volúmenes $(r) \bar{V}/V = r$ utilizados de cada fase, igualmente algunas características individuales que puede presentar la especie L son factores importantes en los proceso de reparto simple. (Páez-Hernández *et al.*, 1997)

"Si se tiene una mezcla de sustancias L y C la separación de especies en un proceso de reparto simple implica que una de las especies se quede o se conserve en mayor parte en la fase 1 y la mayor parte de la especie contraria, o de interés, se ubique o transporte a la fase 2"

Procesos de extracción para sustancias orgánicas

El número mínimo de componentes presentes en la extracción son tres (extractor (disolvente orgánico como etil acetato, cloroformo, entre otros), mezcla (medio de cultivo sin células suspendidas en el que se encuentran embebidas sustancias con bioactividad de interés y otros productos del metabolismo microbiano (Quesada-Chanto, 2013), componente a extraer (sustancias con bioactividad de interés) un problema importante lo constituye la selección del disolvente del extractor (Costa-López, 1985).

Debido al poco conocimiento que se tiene de la estabilidad de las sustancias inhibitorias producidas por bacterias, la caracterización inicial se podría lograr mediante una extracción del resto de sustancias, por ejemplo mediante la extracción líquido-líquido (Muñoz-Rojas *et al.*, 2005). El proceso de extracción líquido-líquido es ampliamente utilizado para la purificación de sustancias producidas y contenidas en medios líquidos; en los cuales la sustancia de interés se encuentra disuelta de manera homogénea junto con un número de sustancias adicionales en la solución, que podrían ser considerados como impurezas. Para poder realizar una separación inicial de la sustancia se tienen que pensar en sus

características fisicoquímicas como pH de precipitación, si se trata de una proteína, de su polaridad, para determinar si los disolventes polares o apolares pueden extraer a dicha sustancia, su afinidad por ciertos radicales de disolventes, como lo sería la quelación de sus radicales libres por disolventes que puedan atrapar a la sustancia y de tal forma hacer precipitar. La termolabilidad de la sustancia de interés, para determinar si algún otro método de extracción utilizando calentamiento puede ser de utilidad para realizar la purificación parcial de la sustancia (Villegas Casares *et al.*, 2006).

La lixiviación: proceso de extracción alternativo

Método de separación fundamentalmente parecido a la extracción líquido-líquido, pero que en este método una de las fases es sólida y debido a que lo que se busca es la disolución de la sustancia de interés en la fase del disolvente o acuosa (Costa-López, 1985). Este método se ha empleado en la extracción de clorofila de plantas mediante disolventes en frío, uno de los más implementados es el método Arnon descrito por Bruinsma en 1982, una extracción de clorofila implementado acetona 80% (Rodríguez-Mendoza *et al.*, 1998).

Una forma de extracción de estos compuestos con actividad inhibitoria es la obtención de extractos líquidos derivados de medios de cultivo en los que se crece a *S. chrysomallus* y se extrae el producto de interés por medio de un disolvente orgánico; acetato de etilo (Keller *et al.*, 2010).

La extracción por disolventes orgánicos es una forma rápida de poder depurar una muestra de compuestos no deseados por la selectividad del proceso, sin embargo la complejidad del método o proceso de extracción radica en que es necesario realizar ensayos previos para determinar el disolvente ideal a utilizar en un sistema de extracción.

Antecedentes

Relevancia de *Sphingomonas* sp. DS-204

Biorremediación

Durante mucho tiempo en la producción agrícola se han utilizado muchos productos sintéticos o de producción humana utilizados como pesticidas, sin embargo al ser sustancias que no se presentan comúnmente en la naturaleza existen muy pocas, o ninguna manera de degradar a estos compuestos y que al final resultan perjudiciales para el ambiente, así como dentro de la cadena alimentaria. Por lo tanto se considera la remediación de suelos contaminados para la remoción estos compuestos xenobióticos (Kuiper *et al.*, 2004). Un ejemplo de estos compuestos es el lindano, un pesticida organoclorado (hexaclorociclohexano), este compuesto ha comenzado a formar parte vital en el aspecto de salud (ya que presenta un potencial carcinogénico; toxicidad en el desarrollo) y ecología (recalcitrante y bioacumulable), particularmente en sitios donde se utilizan de manera inadecuada o sus condiciones de almacenamiento no son las adecuadas (Walker *et al.*,

1999). Este compuesto recalcitrante es un contaminante de los suelos, su solubilidad en yacimientos acuíferos puede llegar a propagarse en grandes extensiones de agua y suelos, conllevando a la bioacumulación de en especies a niveles tóxicos. La degradación del lindano o la disminución de su concentración en suelos se le atribuye a la actividad microbiana, en especial a varias cepas de la especie *Sphingomonas* sp. Una bacteria presente de forma natural en la rizósfera de muchas plantas (Böltner *et al.*, 2008). Las cepas de *Sphingomonas* están ampliamente distribuidas en ambientes acuáticos y terrestres, este género bacteriano ha podido ser aislado de ambientes tan diversos como ríos contaminados con compuestos antropogénicos (xenotóxicos), de material de desecho clínico e inclusive como colonizadores de plantas (Basta *et al.*, 2004). Recientemente el estudio del género *Sphingomonas* se ha vuelto una prioridad en la biotecnología de la biorremediación para obtener formas de degradación de xenobióticos, tales como: el lindano, bifenilos clorados, pentaclorofenol, ácido naftalenosulfónico, tolueno, naftaleno, xileno e hidrocarburos poliaromáticos, alquilfenoles y fenantreno (Böltner *et al.*, 2008, Fuiji *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2002; Tao *et al.*, 2009; Kolvenbach y Corvini, 2012).

Por lo anterior muchas cepas del género *Sphingomonas* se han utilizado para la biorremediación, rizorremediación, de suelos contaminados con esta clase de compuestos. Entre las cepas utilizadas podemos contar a *Sphingomonas wittichi* RW1 (Hong *et al.*, 2002), *Sphingomonas* sp. UT26, *Sphingomonas cloacae* (Fuiji *et al.*, 2003), *Sphingomonas* sp. TTNP3 (Kolvenbach y Corvini, 2012), *Sphingomonas* sp. GY2B (Tao *et al.*, 2009), en la biorremediación de aguas residuales contaminadas por nonilfenol, *Sphingomonas* sp. DS-204 en la biorremediación de suelos contaminados con lindano (Böltner *et al.*, 2008).

Dentro del árbol filogenético confeccionado por Böltner en el año 2008, en su estudio de rizorremediación de lindano (γ -HCH) por cepas de *Sphingomonas* colonizadoras de raíz, se determinó que la relación más estrecha que tiene *Sphingomonas* sp. DS-204, es con la cepas *S. herbicidovorans* AB042233 (género bacteriano capas de mineralizar y degradar compuestos xenotóxicos y herbicidas (Zipper *et al.*, 1996; Basta *et al.*, 2004), seguida la relación filogenética con *S. paucimobilis* X94100 o EPA505 (cepa correlacionada a la degradación de xenobióticos, compuestos hidrocarbonados policíclicos aromáticos (PAH, siglas en inglés) (Viñas-Sabaté *et al.*, 2005; Kanaly *et al.*, 2000), estando un tanto más alejada de *Sphingomonas* sp OF-178, cepa considerada en la agricultura como una posible promotora del crecimiento en plantas (Morales-García *et al.*, 2008) (cuya relación más próxima es con *Sphingomonas taejonensis* AF131297).

Sin embargo ambas cepas tanto OF-178, así como DS-204 han demostrado contener los genes responsables de expresar las enzimas para la degradación de lindano en su isómero γ -HCH (genes linA, linB, linC, linD, linR (regulador transcripcional)), *Sphingomonas* sp. DS-204 no presentó una capacidad de rizorremediación tan similar como el rendimiento en degradación de lindano en su variedad de isómeros, como los presentaron las cepas *Sphingomonas* ANS-PL0 o *Sphingomonas* GOF-203 (Böltner *et al.*, 2008). Aunque se ha

presentado en diversidad de estudios a *Sphingomonas* sp. DS-204 como una posible cepa promotora del crecimiento en plantas, su capacidad de promoción de crecimiento supera los índices de promoción de crecimiento que otras cepas del género *Sphingomonas* han presentado en plantas del maíz (*Sphingomonas* sp. OF-178) (Morales-García *et al.*, 2008) o alfalfa, con respecto a otros géneros microbianos promotores de crecimiento y germinación de semillas (Xelhuantzi-Flores, 2013). *Sphingomonas* sp. DS-204 sobresale por su capacidad en control biológico de cepas fúngicas patógenas para plantas (Vera-Gaona, comunicación personal) sino también en el control de bacterias rizosféricas, debido a su capacidad de colonización y excreción de sustancias inhibitorias (Aguilera-Martínez, 2009). Esta capacidad inhibitoria que presenta *Sphingomonas* sp. DS-204 se observó mediante ensayos de agar en doble capa e inhibición simultánea. *Sphingomonas* sp. DS-204 es capaz de inhibir el crecimiento de distintas bacterias rizosféricas entre las que destacamos bacterias de los géneros *Acetobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Acetobacter* y *Bradyrhizobium* (Aguilera-Martínez, 2009), por lo que es una cepa altamente competitiva en los hábitats donde se desarrolla (Aguilera-Méndez, 2009). Por ejemplo en las rizósferas de maíz la cepa resultó ser altamente competitiva dominando en etapas tempranas del crecimiento de la planta, independientemente del tipo de suelo y microflora presente (Morales-García *et al.*, 2008).

***Sphingomonas* sp. DS-204 como alternativa en control biológico**

La capacidad de *Sphingomonas* sp. DS-204 para eliminar a microorganismos perjudiciales para el crecimiento de plantas en la rizósfera fue evaluado (Vera-Gaona *et al.*, 2013); inhibiendo el crecimiento de algunos patógenos de plantas tanto de hongos del género *Fusarium* y *Penicillium* como de bacterias del género *Pantoea*, por lo que se está explorando su potencial para un control biológico efectivo en plantas de interés agrícola como el maíz (Vera-Gaona, 2013) y la papa (Muñoz-Rojas; comunicación personal).

De forma independiente se ha explorado la capacidad de *Sphingomonas* sp. DS-204 para inhibir el crecimiento de una gama elevada de cepas patógenas para el humano, entre las que se destacan: *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus vulgaris*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* (Aguilera-Méndez, 2009). Haciendo un estudio más profundo de la capacidad de *Sphingomonas* sp. DS-204 se encontró que esta cepa es capaz de inhibir el crecimiento de cepas multiresistentes a antibióticos del género *Staphylococcus* (Martínez-Lazalde; comunicación personal).

El inicio de la caracterización química de la sustancia o sustancias inhibitorias es de gran interés debido al rango tan amplio de inhibición con que cuenta esta cepa bacteriana. En la actualidad no se han descrito sustancias inhibitorias producidas por miembros del género *Sphingomonas*, por lo que se infiere que estas sustancias podrían tener características novedosas, en función del conocimiento que hay a la fecha sobre este campo. No obstante la capacidad natural de bacterias del género *Sphingomonas* para resistir a tóxicos como el

lindano y otros compuestos xenotóxicos (Imai *et al.*, 1991; Schmidt *et al.*, 1992; Khan *et al.*, 1996; Mueller *et al.*, 1990). Y a antibióticos como la estreptomicina (Vanbroekhoven *et al.*, 2004) nos sugiere que la bacteria es capaz de contender contra moléculas tóxicas, lo que fortalece la idea de que la bacterias produce moléculas tóxicas para otros microorganismos sin comprometer su crecimiento.

Justificación

Existe una complejidad y variabilidad en la naturaleza química de las sustancias con actividad antagónicas y cada cepa es capaz de producir por lo menos un tipo de estas sustancias (Riley y Wertz, 2002), en el creciente campo de aplicación de este tipo de sustancias (en la industria de alimentos para evitar el crecimiento de patógenos, en la agricultura como biocontrol o su aplicación como nuevos antibióticos en la industria farmacéutica) es importante poder conocer las características fisicoquímicas y bioquímicas de estas sustancias para determinar su empleo adecuado en las diversas áreas del desarrollo humano, tales como la clínica o el desarrollo de biotecnológica agrícola.

La creciente resistencia a los antimicrobianos de muchas cepas patógenas de interés clínico, han inducido a la búsqueda de nuevas sustancias capaces de inhibir este tipo de cepas. En otro contexto el interés del desarrollo agrícola del país y de los beneficios que pueden tener extrapolar esta capacidad inhibitoria hacia la producción agrícola, se pueden disminuir el nivel de posibles poblaciones microbianas perjudiciales en la rizósfera de las plantas e incrementar las poblaciones benéficas.

La determinación de las propiedades fisicoquímicas de la (o las) sustancia (s) inhibitoria (s) producida (s) por *Sphingomonas* sp. DS-204 y sus características bioquímicas, ayudarían a determinar los posibles panoramas y sistemas en los que se podrían implementar, proyectando beneficios de esta sustancia, para la disminución de los niveles de poblaciones microbianas perjudiciales en áreas como la clínica y agricultura, entre otras. Por esta razón en el trabajo presente se planteó iniciar la exploración de las condiciones de purificación y almacenamiento ideales, así como caracterizar parámetros fisicoquímicos de la sustancia inhibitoria con posibles aplicaciones tecnológicas posteriores.

Objetivo General:

- ✚ Extraer y caracterizar parcialmente una sustancia inhibitoria producida por *Sphingomonas* sp. DS-204

Objetivos particulares:

- ❖ Establecer un método con altos rendimientos para la extracción y concentración de una sustancia inhibitoria producida por *Sphingomonas* sp. DS-204.
- ❖ Caracterizar parámetros fisicoquímicos de una sustancia inhibitoria producida por *Sphingomonas* sp. DS-204, para evaluar la estabilidad de la sustancia.
- ❖ Evaluar parámetros biológicos para la caracterización parcial de la sustancia inhibitoria producida por *Sphingomonas* sp. DS-204.

Materiales y métodos.

Corroboración de la actividad antagónica de *Sphingomonas* sp. DS-204

La detección de la sustancia inhibitoria producida por *Sphingomonas* sp. DS-204, se realizó mediante las metodologías de agar en doble capa (Muñoz-Rojas *et al.*, 2005) e inhibición simultánea (Aguilera-Méndez, 2009), usando las cepas descritas como sensibles (tabla 3).

Extracción de la sustancia inhibitoria

Las metodologías de elección para la extracción de una sustancia inhibitoria se basan en la precipitación mediante sulfato de amonio (Muñoz-Rojas, 2004) o la extracción por disolvente usando un sobrenadante obtenido a partir de un crecimiento bacteriano (Muñoz-Rojas *et al.*, 2005). En este trabajo, la cepa de *Sphingomonas* sp. DS-204 se creció en agitación constante en 100 ml de LB (en matraces de 250 ml) a partir de un pre-inóculo “overnight”. Una vez que la cepa alcanzó su crecimiento máximo ($8.474 \pm 0.155 \log_{10} \text{UFC/ml}$), las células fueron centrifugadas a 4 °C a 5000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante fue separado por decantación y usado para realizar extracciones por disolvente usando matraces de separación. Para ello el sobrenadante fue colocado con el disolvente a explorar (Ver tabla 4) en una proporción (1:2), se agitó vigorosamente y se dejó en reposo durante 20 minutos para que los componentes se separaran. Cada fase (acuosa, disolvente e interfase) fueron separadas y ensayadas en su capacidad para inhibir el crecimiento de una cepa sensible, mediante ensayos de agar en doble capa en acuerdo a Muñoz-Rojas y col., 2005.

Comprobación de la actividad antagónica de *Sphingomonas* sp. DS-204.

La detección de la sustancia inhibitoria producida por *Sphingomonas* sp. DS-204, se realizó mediante las metodologías de agar en doble capa (Muñoz-Rojas *et al.*, 2005) e inhibición simultánea (Aguilera-Méndez, 2009), usando las cepas descritas como sensibles (tabla 3).

Bacterias usadas como indicadoras	Características de las cepas indicadoras	Bacteria usada como productora
3MRh6	Cepas con actividad metilotrónica que han sido probadas como sensibles ante la sustancia inhibitoria producida por <i>Sphingomonas</i> sp. DS-204	<i>Sphingomonas</i> sp. DS-204
3Mrh6R		
Epi Ep 4		
RhpF3		
End Ep 3		
2Mend3		
Epi Ep 5		
4Me Pi 7		
End Pf 7		

Tabla 3. Bacterias y cepas utilizadas en los protocolos de trabajo para la determinación de la sustancia inhibitoria.

Extracción por metodología de Lixiviación en frío

Un método alternativo para obtener un extracto de sustancia inhibitoria a partir de cultivos en placa de la cepa *Sphingomonas* sp. DS-204 fue la lixiviación en frío. Este método se desarrolló en dos fases, en la primera se comprobó que la sustancia inhibitoria es capaz de pasar a través de una membrana de nitrocelulosa de 22 μm . Para ello 500 μl de *Sphingomonas* sp. DS-204 fueron colocados sobre una membrana de nitrocelulosa sobre una placa de medio gelificado LB o medio mínimo MM9-fuente de carbono variable. Después de 24 horas se observó una colonia grande sobre la membrana, que fue retirada de la placa. Entonces se depositó una segunda capa de agar que contenía la bacteria sensible 3Mrh6R; esta cepa se utilizó porque presentaba un halo de inhibición nítido, de diámetro considerable (1 cm) y por su fenotipo de color naranja que ayudaba como contraste para delimitar los halos de inhibición en los medios de cultivos. Para la lectura, las placas se incubaron durante 24 horas. En el experimento se incluyeron placas con membranas sin bacteria productora como control negativo. Posteriormente se evaluó la factibilidad de extraer la sustancia inhibitoria. Para esto, se cortó la zona de agar donde presuntamente fue depositada la sustancia inhibitoria, esta muestra de agar-sustancia inhibitoria se colocó en 10 ml de etanol frío contenido en tubos Falcon. Los tubos fueron colocados para su extracción de las sustancias afines al etanol a 4 °C durante 24 horas (maceración), para posteriormente someter el extracto a centrifugación a 523 g durante 12 minutos. El extracto obtenido como sobrenadante fue decantado en tubos Falcon estériles y guardados a 4 °C. En el ensayo se incluyeron controles negativos de medios donde no se colocó la cepa productora y el procedimiento de extracción fue el mismo. El poder inhibitorio de los extractos fue determinado mediante ensayos de unidades arbitrarias (UAs) (Muñoz-Rojas *et al.*, 2005).

Determinación de unidades arbitrarias de los extractos (actividad antagónica)

Los extractos obtenidos en las diferentes fases de investigación fueron sometidos a diluciones seriadas 1:2 en etanol estéril (filtrado). Las diluciones obtenidas fueron ensayadas en su capacidad de inhibir a la cepa sensible 3Mrh6R. Para esto 300 μl de cada dilución fueron colocados en una placa, se dejó evaporar el disolvente y una segunda capa de cepa sensible fue colocada. Después de 24 horas de crecimiento se observó la dilución más alta que presentó inhibición. El recíproco de la dilución más alta con inhibición sobre la cepa sensible corresponde al valor de la UA, que tiene que ser justado para obtener el valor de UAs/ml en función de cuantos microlitros (μl) fueron usados para observar la inhibición.

Extracción adicional líquido-líquido

Después de obtener un extracto por la metodología de lixiviación en frío, este extracto fue sometido a extracción con disolventes en una forma de extracción líquido-líquido. Para

ello, se tomó un volumen de 3 ml del extracto con actividad confirmada y se sometió a contacto directo con un volumen igual de disolventes con índices de polaridad diferentes al etanol y agua para determinar en cuál de las fases se observaba que migraba la actividad inhibitoria.

Como control previo cada uno de los disolventes fue colocado en placas (500-1000 μ l), se permitió la evaporación y se les adicionó una segunda capa conteniendo una cepa sensible (método de agar en doble capa); los disolventes que presentaron algún efecto antagónico fueron descartados y solo se utilizaron los que probaron no tener actividad inhibitoria o una actividad inhibitoria muy débil, para asegurar que la actividad inhibitoria observada es debida a la extracción de una sustancia inhibitoria y no debida a la actividad propia del disolvente.

Después de realizar una agitación mecánica cada 5 minutos durante un tiempo total de 20 minutos se dejaron separar las fases en frío a 4 °C durante un tiempo de 24 horas, posterior a ello se determinó, por medio de la metodología de agar en doble capa, cuál de las fases presentaba actividad.

Características de Disolventes.

Además de no reaccionar con la muestra y poseer alta pureza, el punto de ebullición del disolvente debe de ser bajo para facilitar su eliminación total o parcial, esto igualmente para no tener que someter a la muestra a calentamiento para evitar degradación de la sustancias por calor. En un buen sistema de extracción la solubilidad diferencial permite la solvatación completa del analito, en tanto que los demás componentes de la muestra permanecen prácticamente insolubles (Villegas-Casares, 2006). Desafortunadamente para los sistemas que involucran estructuras biológicas se pueden considerar como sistemas reales más que ideales, por lo que siempre se tiene que tomar en consideración al momento de seleccionar el disolvente, o la mezcla de ellos, a utilizar. Si el disolvente orgánico empleado es más denso que el agua, después de la separación de las fases, se ubicará en la parte inferior del recipiente. En la extracción líquido-líquido el disolvente orgánico debe tener baja solubilidad en agua o de preferencia ser inmisible en agua (Villegas-Casares, 2006).

Detección de actividad antagónica de *Sphingomonas* sp. DS-204

Los tiempos de crecimiento de *Sphingomonas* sp. DS-204 en el que presenta una mayor actividad antagónica fue determinado en medio LB. Se evaluó la cantidad mínima necesaria de cultivo (medido en volumen) de *Sphingomonas* sp. DS-204 para poder obtener una actividad inhibitoria considerable. Se realizaron estudios de cinética microbiana por medio de goteo en placa para la determinación de \log_{10} UFC/ml, a cada hora durante un lapso de 36 horas para la determinación de la curva de crecimiento individual a *Sphingomonas* sp. DS-204.

En filtros de nitrocelulosa Millipore con tamaño de poro de 0.22 μm se colocaron pre-inóculos de la fase de crecimiento en la que se mostraba mayor actividad inhibitoria variando la cantidad en volumen del pre-inóculo. Estas observaciones se realizaron para determinar el volumen ideal que se puede colocar en cada filtro sin que la esterilidad del medio que rodea al filtro Millipore se viera comprometido por el crecimiento de *Sphingomonas* sp. DS-204, así mismo poder observar el volumen máximo que se puede colocar sin comprometer la integridad del agar o del filtro. Los volúmenes a probar fueron desde 50 μl , 100 μl , 200 μl , 250 μl , 500 μl , 750 μl , 1000 μl , de un pre-inóculo de *Sphingomonas* sp DS-204 crecido hasta su fase estacionaria en medio líquido para luego ser colocado en un medio semisólido de LB (se modificó la concentración de agar del medio de cultivo hasta una concentración de 8 g/L de agar en la formulación del medio de cultivo) en una relación de 1/10 de medio fresco por pre-inóculo, posteriormente esté preparado en medio semisólido se colocó en cajas Petri estériles con medio de cultivo, en estado sólido, óptimo para la biosíntesis de sustancia inhibitoria. (Esta metodología se probó con todos los medios de cultivo utilizados en el presente estudio hasta obtener el que mostrara mayor UA/ml), se dejó crecer hasta alcanzar la fase de su cinética de crecimiento donde se mostraron mayor cantidad de sustancia inhibitoria en los extractos obtenidos por lixiviación en frío. Al obtener el volumen óptimo de pre-inóculo ideal para la producción de la sustancia inhibitoria, se procedió a realizar el estudio de la fase ideal de crecimiento en que se obtendría una mayor cantidad de sustancia inhibitoria.

Se colocó el volumen ideal de pre-inóculo en medio semisólido de *Sphingomonas* sp DS-204 crecido hasta su fase estacionaria en medio líquido para luego ser colocado en un medio semisólido de LB (8 g/L de agar) en una relación de 1/10 de medio fresco por pre-inóculo, posteriormente esté preparado en medio semisólido se colocó en cajas Petri estériles con medio de cultivo en estado sólido, óptimo para la biosíntesis de sustancia inhibitoria.

Purificación

Después de una extracción efectiva de la sustancia inhibitoria por disolventes, la actividad del concentrado se evaluó mediante ensayos de UAs (Muñoz-Rojas *et al.*, 2005). Para la purificación se realizó la filtración del extracto por medio de centrifugación y filtros de nitrocelulosa de 50 KDa de tamaño de poro.

Tamaño de molécula

Para adquirir conocimiento del tipo de sustancia inhibitoria que produce *Sphingomonas* sp. DS-204, se realizaron los siguientes ensayos: primero se determinó el tamaño aproximado de la sustancia inhibitoria, colocando un volumen de 10 ml del concentrado en tubos Millipore con membranas de nitrocelulosa de distintos tamaños de poro de 50, 30, 10 y 3 KDa, siguiendo las recomendaciones del fabricante, se hizo una centrifugación de la muestra a 523.6 g a una temperatura de 6 $^{\circ}\text{C}$, durante un tiempo de 15 minutos.

Estabilidad al pH

Para esta prueba se prepararon buffers de fosfato con una concentración de 0.01 M de H_3PO_4 , NaH_2PO_4 y Na_2PO_4 , utilizando la ecuación de Henderson–Hasselbalch, se realizaron buffers de pH que abarcaron los pH de 3 a 9. Se colocó un volumen de 500 μl de buffer en contacto con el mismo volumen de extracto y se dejó en incubación durante 2 horas a una temperatura de 30 $^{\circ}\text{C}$, posteriormente se realizó la determinación de las UA/ml de cada uno de las condiciones.

Estabilidad a temperatura

La metodología desarrollada para esta condición fue la siguiente: Se tomó 1ml de extracto en etanol con actividad inhibitoria probada, se colocó en tubos eppendorf estériles la muestra y se sometió en baño María, refrigeración y congelación a las distintas temperaturas de -2, -4, 4, 30, 60, 70, 80 y 100 $^{\circ}\text{C}$ durante un tiempo de 80 minutos. Después de este tiempo los extractos fueron determinados en su actividad inhibitoria (UAs).

Estabilidad en almacenamiento

Se tomaron alícuotas de 5 ml de un extracto en etanol y se sometieron a condiciones de almacenamiento a -20, 4 y 30 $^{\circ}\text{C}$. Las muestras se dejaron resguardadas bajo estas condiciones y en cada semana se determinó la actividad inhibitoria por medio de la metodología de UAs/ml. El monitoreo se llevó a cabo hasta observar que en 2 de las tres condiciones se perdía la actividad inhibitoria.

Parámetros biológicos

Tiempo de crecimiento bacteriano para la extracción óptima de la sustancia inhibitoria

En medio LB se realizó el crecimiento de *Sphingomonas* sp. DS-204, durante 36 horas de crecimiento, cada 6 horas se realizó la metodología de lixiviación en frío para extraer la sustancia inhibitoria y se determinó su actividad inhibitoria (UA/ml).

Fuentes de carbono

En esta condición se determinó si la fuente de carbono en la que crece *Sphingomonas* sp. DS-204 influye en la producción de sustancias inhibitorias. Se desarrollaron medios mínimos (MM9) con diversas fuentes de carbono (xilosa, manitol, citrato de sodio, glucosa, fructosa, mio-inositol, lactosa), donde las bacterias fueron crecidas sobre una membrana de celulosa durante 30 h. Utilizando la metodología de lixiviación en frío se determinaron las UAs/ml de cada uno de los medios en donde se creció a *Sphingomonas* sp. DS-204. De los extractos obtenidos se tomaron alícuotas de 500 μl para determinar la actividad inhibitoria en UAs. Igualmente se utilizó el medio comercial Mac Conkey (con lactosa

como fuente de carbono) para determinar la influencia de su fuente de carbono en producción de la sustancia inhibitoria.

Ensayos extracción líquido-líquido, con extracto obtenido en sólido-líquido.

Del extracto obtenido por la metodología de lixiviación en frío, se sometió un volumen de 5 ml del extracto a 5 ml de distintos disolventes. Las fases generadas fueron exploradas en su capacidad de producir inhibición mediante el método de UAs.

Tabla 4. Listado de disolventes utilizados en la industria química y la biotecnológica para extracción de diversas sustancias orgánicas.

<i>Disolvente</i>	Características de polaridad
<i>Pentano</i>	Compuestos apolares y poco polares
<i>n-hexano</i>	Compuestos apolares y poco polares
<i>Ciclohexano</i>	Compuestos apolares y poco polares
<i>Tolueno</i>	Compuestos de polaridad baja o moderada
<i>Benceno</i>	Compuestos con polaridad baja o moderada
<i>Diétiléter</i>	Compuestos de polaridad moderada
<i>Diclorometano</i>	Compuestos de polaridad baja
<i>Etilacetato</i>	Compuestos polares
<i>Acetona</i>	Compuestos muy polares
<i>Metanol</i>	Compuestos muy polares y sólidos
<i>Etanol</i>	Compuestos muy polares y sólidos
<i>Ácido Acético</i>	Compuestos orgánicos
<i>Cloroformo</i>	Alcaloides

En esta tabla se enlistan los disolventes iniciales que se someterán a prueba (solos o en mezclas) (Ibarz y Barbosa-Cánovas, 2005) para la extracción de la sustancia inhibitoria producida por *Sphingomonas* sp. DS-204.

Ensayo de tiempo y temperatura de extracción.

Se realizaron ensayos para evaluar el tiempo y la temperatura adecuados de contacto que debía tener la muestra con los disolventes. Para ello, los disolventes estuvieron en contacto con “el agar que contiene la sustancia inhibitoria” durante 40 min y durante 24 horas bajo dos temperaturas exploradas: ambiente y a temperatura de refrigeración (4 oC).

Ensayos extracción líquido-líquido, con extracto obtenido en sólido-líquido.

Del extracto obtenido por la metodología de lixiviación en frío, se sometió un volumen de 5ml del extracto a 5ml de distintos disolventes. Las fases generadas fueron exploradas en su capacidad de producir inhibición mediante el método de UAs.

Tratamiento con proteasa de *Bacillus licheniformis*.

Tomando se colocó una alícuota de 600 µl de extracto y se le adicionaron 500 µl de proteasa de *Bacillus licheniformis* (producto de Sigma-Aldrich), con una actividad de 2.4 U/g, con un tamaño de aproximadamente 24 KDa (Sigma-Aldrich). Se dejó incubando por 30 minutos a temperatura ambiente. Para realizar la separación de la sustancia inhibitoria de la proteasa de *Bacillus licheniformis* sin someter a un proceso de inactivación por calor, se sometió la alícuota a un proceso de centrifugación con tubos de Millipore con filtro de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 24 KDa para su separación, en la parte superior se retuvo la proteasa. Posteriormente se midió la actividad inhibitoria presente en el extracto después del tratamiento con proteasas. Como control se tomaron tanto el proceso de centrifugación de con filtros de nitrocelulosa del extracto obtenido por lixiviación en frío y un control de proteasa de *Bacillus licheniformis* sin extracto

Cuantificación de proteínas por método Bradford

Se colocó 1ml del reactivo de Bradford (Bradford, 1976) a 5X en un tubo de ensaye con 3.9 ml de agua destilada. Después de adicionaron 100 µl de extracto obtenido por el método de lixiviación en frío, se utilizaron los extractos obtenidos por los disolventes: cloroformo y etanol. Se midió la absorbancia en espectrofotómetro a $\lambda=595\text{nm}$. Se interpolaron con una curva patrón Se determinó el valor de concentración de proteína en cada uno de los extractos.

Determinación de picos por espectrofotometría de gases masas

El extracto obtenido por lixiviación en frío fue inyectado en un cromatógrafo gases masas; el cromatograma e identificación de productos presentes fueron registrados. Un extracto obtenido a partir de muestras sin bacterias productoras, fue incluido para descartar productos derivados del medio de cultivo.

Los análisis se realizaron en un cromatógrafo de gases 7890 Agilente Technologies acoplado a espectrómetro de masas. Se inyectó 1 µl de cada extracto bajo las siguientes condiciones cromatográficas: uso de una columna DB-5MS, de 0.5um*30m*0.25um DI,

temperatura de inyector 180 °C, temperatura del detector 220 °C, con una rampa que inicia 56 °C/ 1 min, 10 °C/ 1 min, 196 °C/ 1 min, 20 °C/ 1 min, 260 °C/ 1 min. Flujo de Helio a 1,7 ml/min; gas de arrastre: “make up” de 12,3ml/min Una vez obtenido el cromatograma se realizó la identificación de los compuestos con una biblioteca NIST08.

Resultados

Corroboración de la actividad antagónica de *Sphingomonas* sp. DS-204

Se corroboró que la cepa *Sphingomonas* sp. DS-204 fue inhibitoria contra las cepas ensayadas (ej. cepas metilotróficas 3Mrh6R, RhpF3, Epi Ep 4 y 2Mend3) (tabla 3). Se observó que la cepa 3Mrh6R y fue una cepa moderadamente sensible por lo que se decidió utilizarla para experimentos posteriores. Con esta cepa en particular se registraron halos de inhibición de 0.4 (± 0.052) cm de diámetro mediante la metodología de agar en doble capa y 0.5 cm de diámetro mediante la metodología de inhibición simultánea.

Extracción de la sustancia inhibitoria a partir de medio líquido.

Para conseguir extraer la sustancia inhibitoria a partir de medio líquido y usando varios disolventes (cloroformo, pentano, etil acetato, tolueno y benceno), nos enfrentamos a dos problemas importantes en el modelo de estudio. Primero, del crecimiento de *Sphingomonas* sp. DS-204 hasta fase estacionaria, fue imposible obtener un sobrenadante libre de bacterias mediante centrifugación. En este procedimiento se tenían bacterias en suspensión y su presencia producían halos de inhibición en ensayos de actividad por el crecimiento activo y por la actividad del sobrenadante obtenido. Cuando el sobrenadante obtenido es sometido a extracción por disolvente, las fases obtenidas (acuosa, interfase y fase de solvente) no tienen actividad. Realizando varios ensayos modificando las condiciones de extracción como la temperatura y disolventes (no mostrado) sin lograr la extracción de la sustancia inhibitoria, se propuso un sistema de extracción sucesiva.

Se utilizó un sistema de saturación con cloroformo como solvente extractor para sobrenadantes de cultivos en lote, obtenidos de un crecimiento de 24 h en agitación a 30 °C y centrifugados a 523.6 x g para la eliminación del pellet bacteriano. Se logró obtener un concentrado de la sustancia inhibitoria. Para ello se utilizaron un total de 5 cultivos en lote con un volumen de 50 ml que se hicieron entrar en contacto con un volumen igual de solvente extractor. En cada paso se utilizó un sobrenadante de un lote de cultivo nuevo de *Sphingomonas* sp. DS-204, en cada ronda se descartó la fase acuosa y el volumen del disolvente utilizado se recirculaba a un siguiente embudo de separación con 50 ml de cultivo libre de pellet bacteriano (Fig. 9).

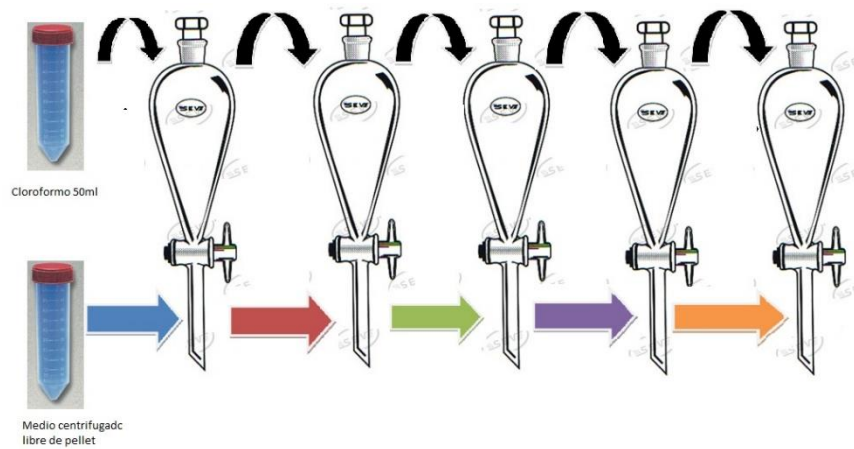


Fig. 9. En la imagen se indica que el color de las flechas en negro el volumen original de 50 ml de cloroformo se utilizó en los 5 embudos de separación, recirculando el cloroformo. Las flechas de colores del medio de cultivo libre de pellet bacteriano indican que en cada paso se utilizó medio “nuevo” para hacer contacto con el cloroformo de la fase anterior.

Las condiciones de extracción fueron en frío a 4 °C durante un tiempo de 20 min con agitación vigorosa y dejando reposar hasta observar la separación de las fases. Sin embargo el rendimiento fue muy bajo, llegando a la conclusión de que en medio líquido no se produce adecuadamente a la sustancia inhibitoria. Razón por la que se planteó una forma alternativa de extracción. En casos excepcionales se observaron halos de inhibición grandes causados por células activas que soportaron la actividad del disolvente y no debido a la actividad de la sustancia extraída.

Método de extracción por lixiviación en frío.

Este método mostró los mejores rendimientos de extracción de la sustancia inhibitoria producida por *Sphingomonas* sp. DS-204. Para estandarizar este método se ensayaron algunas variables.

a) Volumen de inóculo bacteriano

Se probaron distintos volúmenes de un inóculo de *Sphingomonas* sp. DS-204 sobre los filtros de nitrocelulosa (0.22 μm) en medio agar-agua a punto de gelificar para obtener el volumen ideal para el fácil manejo de las muestras y evitar la contaminación del medio circundante al filtro de nitrocelulosa. El volumen se determinó por el radio de los filtros o el área total que estos podían cubrir, para filtros de diámetro de 142 mm el volumen máximo óptimo observado fue de 500 a 750 μl del agar agua a punto de gelificar inoculado con *Sphingomonas* sp. DS-204.

b) Concentración de agar

En cuanto a la concentración de agar, se probaron 3 condiciones en la concentración de agar de las placas de LB (4, 8 y 16 g/l) para el crecimiento de *Sphingomonas* sp. DS-204,

observando que la producción de la sustancia inhibitoria fue más favorable en una concentración de agar de 16 g/l en la formulación de los medios (Fig. 10). Para observar la capacidad inhibitoria se utilizó la metodología de agar en doble capa.

c) Relación masa agar-volumen disolvente

Se observó que la extracción de la sustancia inhibitoria fue mejor en una relación de 3 g/ml. Las UAs observadas en 3 g/ml fue de 1706.6 UA/ml a un tiempo de crecimiento de 24 horas; 60% superior que la observada a 0.5 g/ml.

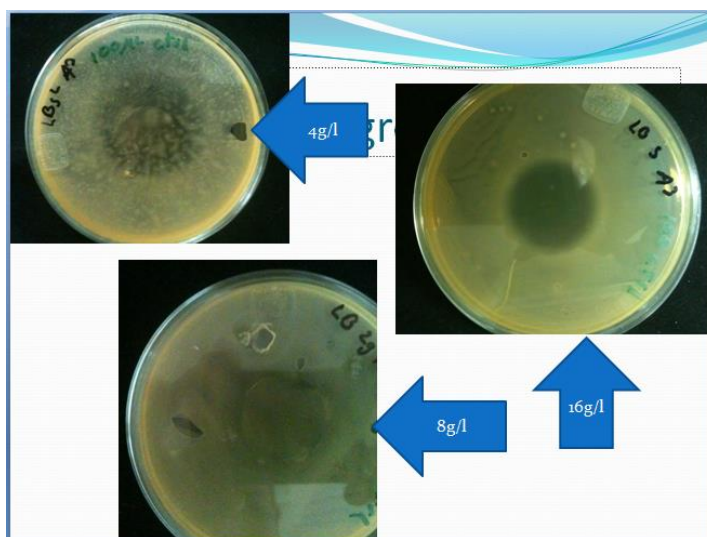


Fig. 10. Variación de la concentración de agar en la composición del medio de crecimiento de *Sphingomonas* sp. DS-204, a 16 g/l de agar se observaron halos de inhibición más nítidos.

d) Selección de disolvente para extracción en frío.

Se observó que algunos disolventes: tolueno, cloroformo y etanol fueron capaces de extraer la o las sustancias inhibitorias contenidas en el agar (Fig. 19). Sin embargo, los disolventes orgánicos como el tolueno, benceno y cloroformo, entre otros, no son recomendables para utilizarlos frente a filtros de nitrocelulosa, además de que son tóxicos. Además algunos disolventes como el tolueno y el benceno fueron descartados ya que mostraron actividad inhibitoria remanente aun después de haber sido evaporados de la placa; lo que sugiere que estos componentes no se evaporan al 100% y algo de disolvente se queda retenido y que afecta al crecimiento de la cepa sensible (Fig. 11). Por lo que el disolvente seleccionado para la extracción de la sustancia inhibitoria fue el etanol absoluto.

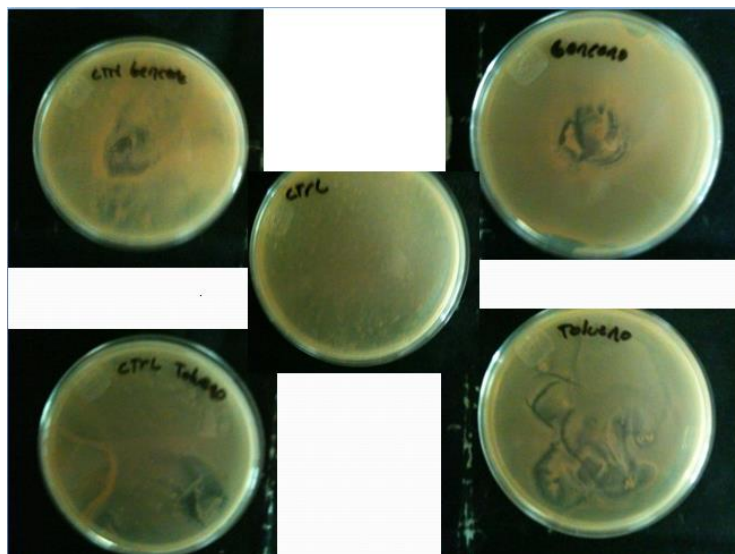


Fig. 11. Actividad inhibitoria de disolventes benceno y tolueno debido a la actividad remanente (izquierda). Actividad inhibitoria de extracto más disolvente (derecha). Control sin disolvente ni extracto de sustancia inhibitoria (centro).

e) Tiempo y temperatura de contacto con disolventes

Se observó que cuando el disolvente está en contacto durante 40 min ninguno de los disolventes fue capaz de extraer la actividad inhibitoria del agar independientemente de la temperatura explorada y el disolvente usado (tabla 5).

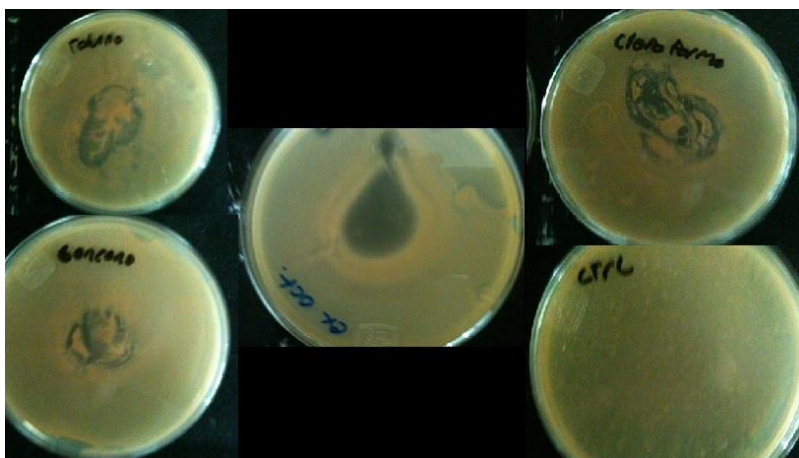


Fig. 12. Extracción con disolventes orgánicos de la sustancia inhibitoria producida por *Sphingomonas* sp. DS-204. En el centro de la figura se observa el sistema de lixiviación en frío con etanol como disolvente elegido, que se compara de manera cualitativa con los extractos obtenidos con tolueno (Esquina superior izquierda), cloroformo (Esquina superior derecha), benceno (esquina inferior izquierda) y el crecimiento normal de la cepa sensible sin tener contacto con la sustancia inhibitoria (Esquina inferior derecha), se realizaron controles similares para cada disolvente, datos no mostrados, para descartar que el disolvente en por sí mismo ejerciera una actividad inhibitoria en las cepas probadas como sensibles a la metabolito bioactivo producido por *Sphingomonas* sp. DS-204.

Disolventes utilizados en el ensayo
Benceno (Ben)
Etil Acetato (Et Ace)
Pentano (Pent)
Ciclo Hexano (C. Hex.)
Tolueno (Tol)
Cloro Metano (M Cl)
Etanol Absoluto (Et Abs)

Tabla 5. Lista de disolventes usados para explorar la capacidad de extraer la sustancia inhibitoria producida por *Sphingomonas* sp. DS-204.

Bajo condiciones de extracción de 24 h a una temperatura de refrigeración de 4 °C la extracción fue más efectiva y algunos ejemplos se muestran en la Fig. 12. Los disolventes que mejor extrajeron a la sustancia inhibitoria a partir del agar fueron el etanol absoluto y el cloroformo (el etil acetato presentó una extracción muy similar a estos dos disolventes; debido a complicaciones en su manejo no se optó por utilizar); por lo que fueron considerados como ideales para realizar la extracción de la sustancia de interés (Fig. 13). Con los datos en conjunto se propuso la metodología de “Lixiviación en frío” con las características detalladas en materiales y métodos y cuyo esquema propuesto se muestra en la Fig. 15.

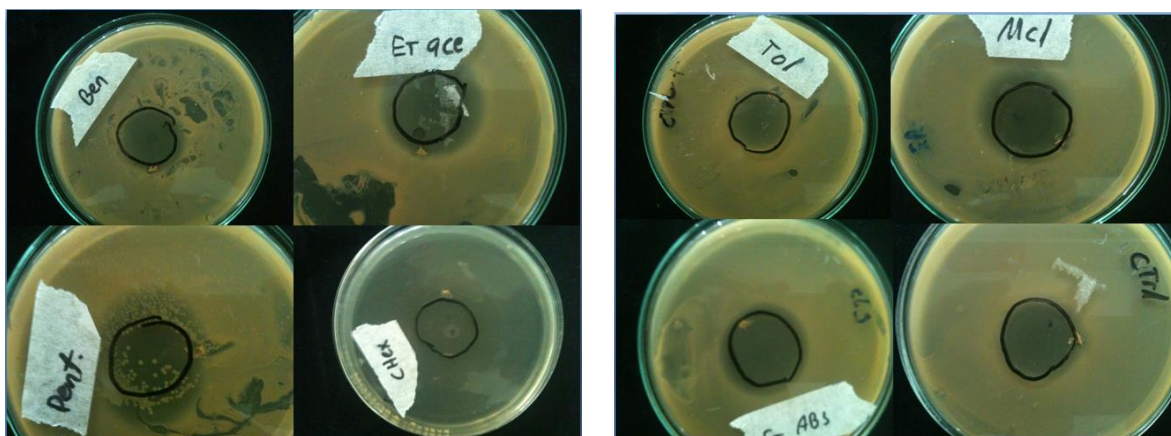


Fig. 13. Primera aproximación de extracción sólido líquido para la metodología lixivación en frío; aquí se observa como una gama de disolventes orgánicos puede extraer a la sustancia inhibitoria. Algunos disolventes presentaron actividad residual en los medios de crecimiento para las bacterias sensibles del extracto obtenido, para la metodología de inhibición en doble capa, por lo que su uso (disolvente orgánico) se vio limitado, Ciclohexano (CHex) fue uno de los disolventes descartados por este inconveniente. Tomando como control el halo de inhibición creado por el crecimiento de *Sphingomonas* sp. DS-204 (Inhibición en doble capa)



Fig 14. Extracto en etanol obtenido por la metodología de lixiviación en frío probado contra la cepa sensible 3Mrh6R.

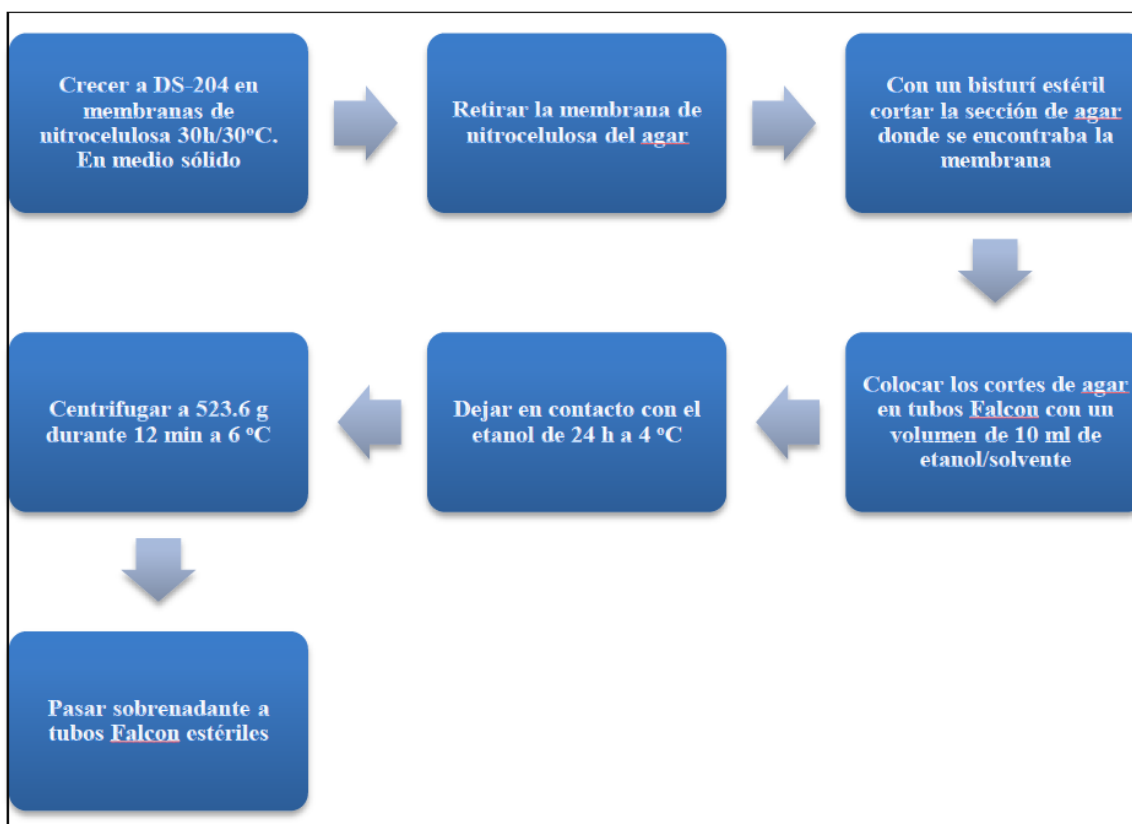


Fig. 15. Esquema para la extracción de la sustancia inhibitoria mediante el método de “lixiviación en frío”.

Determinación de la estabilidad de la sustancia inhibitoria extraída.

Ensayo estabilidad a temperatura.

La sustancia inhibitoria es estable en el rango de -4 °C a 60 °C donde la actividad se mantiene en 1706.6 UAs (tabla 6). Bajo las condiciones exploradas se observó que la sustancia inhibitoria es afectada a -20 °C y a temperaturas mayores a 70 °C; siendo muy afectada a los 100 °C donde se pierde la actividad inhibitoria (tabla 6).

Efecto de la temperatura sobre la actividad antagónica	
Temp (°C)	UA/ml
-20	853.3 [±] 16.3
-4	1706.6 [±] 0
4	1706.6 [±] 0
30	1706.6 [±] 0
60	1706.6 [±] 40.8
70	853.31 [±] 24.48
80	426.6 [±] 16.3
100	0 [±] 0

Tabla 6. Efecto de la temperatura sobre la actividad inhibitoria de extractos obtenidos por lixiviación en frío.

Estabilidad a cambios de pH

Se tomaron alícuotas de 500 µl de extractos obtenidos por la metodología de lixiviación en frío y se mezclaron con 500 µl de buffers en diferentes rangos de pH de 3-9; los buffers de pH se obtuvieron a una concentración final de 0.01M. Después de una hora de contacto se realizaron los ensayos de determinación de UAs de todas las muestras (Tabla 7). La actividad inhibitoria se mantuvo elevada entre pHs 6 a 8 y disminuyó a pHs más ácidos o más básicos.

Efecto del pH sobre la actividad antagónica	
pH	UA/ml
3	782.02 [±] 123.515
4	782.21 [±] 123.186
5	1564.43 [±] 246.34
6	1706.66 [±] 0
7	1706.66 [±] 0
8	1706.66 [±] 0
9	1422.22 [±] 492.67

Tabla 7. Valores de pH a los que fue sometido el extracto obtenido por lixiviación en frío de la sustancia inhibitoria producida por *Sphingomonas* sp. DS-204.

Estabilidad en condiciones de almacenamiento

Aquí se exploraron las condiciones a las que se podrían almacenar a los extractos obtenidos por la metodología de lixiviación en frío de la (s) sustancia (s) inhibitoria (s) producida (s) por *Sphingomonas* sp DS-204. Esto asegurará un material estable para su posterior purificación. Para ello, se prepararon alícuotas de 500 μ l del extracto obtenido, se sometieron a tres temperaturas de almacenamiento (-2, 4 y 30°C). Las UAs fueron determinadas cada semana, para cada una de las condiciones (5 réplicas evaluadas en cada tiempo experimental). Se observó el decaimiento de las UA/ml en dos de las condiciones probadas (-20 y 30 °C) (Fig. 16). La mejor condición de almacenamiento ocurrió a 4°C; observando una estabilidad del extracto durante un tiempo de 7 meses (no mostrado) con una actividad de 1706.6 UA/ml.

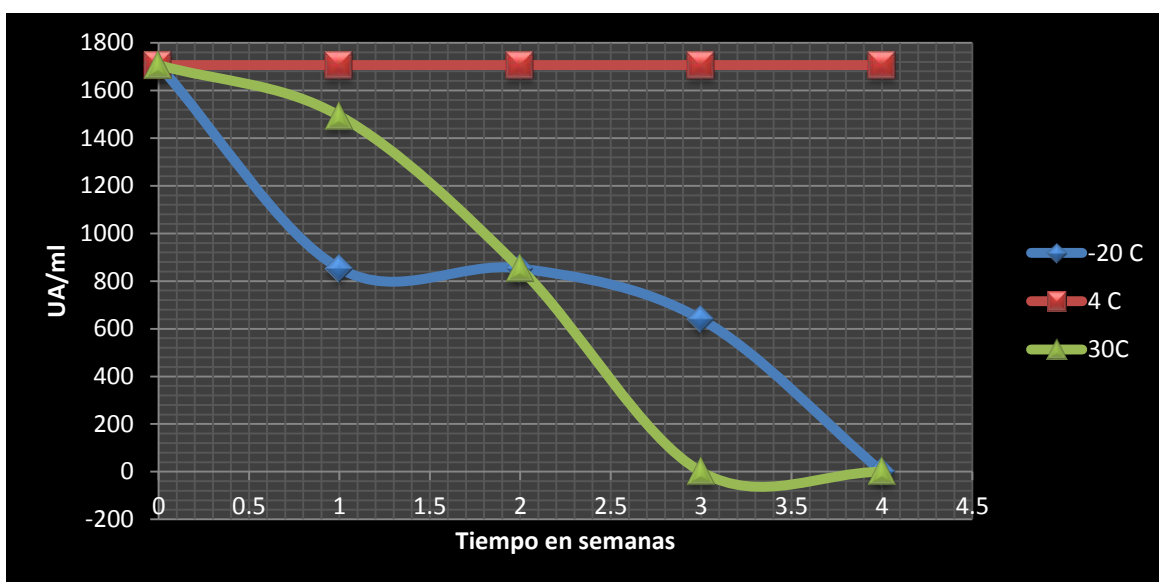


Fig. 16. Actividad inhibitoria (UA/ml) del extracto resguardado bajo diferentes temperaturas de almacenamiento.

Determinación de tamaño de molécula.

La suspensión filtrada fue explorada en su capacidad de producir o no inhibición. Se observó que la sustancia inhibitoria fue capaz de pasar los filtros de un tamaño de 50, 30 y 10 KDa (Fig. 18, 19), sin embargo fue retenida en el filtro de 3 KDa. Adicionalmente, a partir del extracto obtenido por lixiviación en frío se realizó una filtración seriada con los filtros de 10 y 3 KDa. El extracto en etanol al 70% se filtró en tubos Millipore observando nuevamente que la actividad inhibitoria de la sustancia responsable quedaba en la sección superior del tubo (Fig. 17).

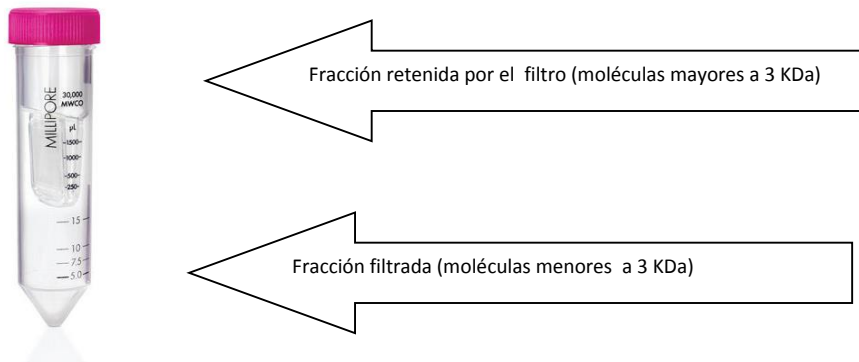


Fig. 17. Esquema de filtración a través de tubos con filtro Millipore de tamaño de poro variado. En esta representación se muestran los tubos Millipore con tamaño de 3KDa. En el cual la sustancia inhibitoria de *Sphingomonas* sp. DS-204 es retenida por la matriz porosa.

En acuerdo con los datos obtenidos de filtración y pruebas de actividad mediante el método de agar en doble capa, el rango de tamaño de la (s) sustancia (s) inhibitoria (s) extraída (s) se encuentra entre 3 a 10 KDa (Fig. 18, 19).



Fig. 18. Se observa actividad inhibitoria de una muestra del extracto filtrado con una membrana de 50 KDa.



Fig. 19. Se observa actividad inhibitoria de una muestra del extracto filtrado con una membrana de 10 KDa.

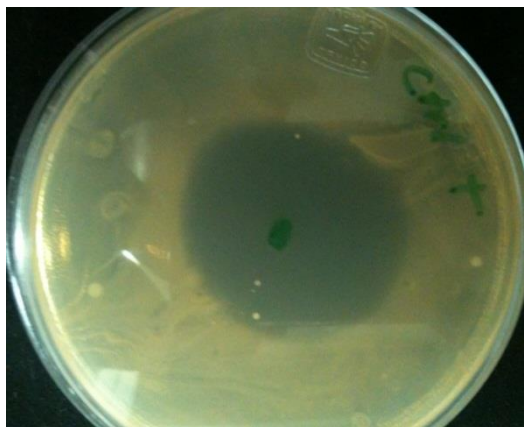


Fig. 20. Control positivo de extracto antes de someterse a filtración.

<i>Tamaño de partícula (KDa)</i>	Parte superior /(UA/ml)	Parte inferior /(UA/ml)
3	I / (1706.66±98.8)	NI/ (0±0)
10	I / (1706.66±98.8)	I / (1706.66±98.8)
30	I / (1706.66±98.8)	I / (1706.66±98.8)
50	I / (1706.66±98.8)	I / (1706.66±98.8)

Tabla 8. Determinación de actividad inhibitoria (UA/ml) del extracto sometido a centrifugación. I significa inhibición, NI significa no inhibición.

Parámetros Biológicos.

Tiempo de crecimiento bacteriano para la extracción óptima de la sustancia inhibitoria

Se observó que la cepa debe crecer sobre la membrana de celulosa durante 30 a 36 horas ya que se obtiene una mayor cantidad de Unidades Arbitrarias (Fig. 21).



Fig. 21. Incremento de la actividad inhibitoria del extracto durante la curva de crecimiento de *Sphingomonas* sp. DS-204; la biosíntesis de la sustancia inhibitoria se observó desde fases tempranas del crecimiento de la cepa.

Efecto de la fuente de carbono en la producción de la sustancia inhibitoria producida por *Sphingomonas* sp DS-204

Se exploró el crecimiento de la cepa *Sphingomonas* sp. DS-204 en medio MM9 sólido con diferentes fuentes de carbono (xilosa, manitol, citrato de sodio, glucosa, fructosa, mio inositol, lactosa), para conocer si en alguna condición se produce mejor la sustancia inhibitoria. El método para la obtención de la sustancia inhibitoria fue la extracción en frío se observó que en los medios MM9 glucosa, MM9 fructosa y MM9 manitol, así como en el medio Mac Conkey se obtuvieron las 1706.66 UA/ml observadas en el crecimiento en LB a las 24 horas. El crecimiento de *Sphingomonas* sp. DS-204 fue parecido en todos los medios, sin embargo la producción de la sustancia inhibitoria fue afectada por la fuente de carbono y no por la cantidad de bacterias presentes en los medios utilizados para la extracción; como se puede observar en la tabla 9 todas las fuentes de carbono probadas tienen un crecimiento parecido entre ellas, inclusive con respecto a medios ricos como el Mac Conkey.

Fuente de carbono	Log ₁₀ (UFC/ml)	UA obtenidas
<i>Xilosa</i>	8.474±0.155	213.33±0
<i>Manitol</i>	8.843±0.106	1706.66±0
<i>Citrato de Sodio</i>	8.717±0.167	213.333±0
<i>Glucosa</i>	8.906±0.067	1706.66±0
<i>Fructosa</i>	8.04±0.2610	1706.66±0
<i>Mio inositol</i>	8.43±0.6821	0±0
<i>Mac Conkey (lactosa)</i>	9.381±0.034	1706.66±0

Tabla 9. Determinación de unidades arbitrarias de extractos obtenidos por la metodología de lixiviación en frío a partir de crecimientos de *Sphingomonas* sp. DS-204 en MM-9 con diversas fuentes de carbono tiempo de crecimiento de 24 horas.

Ensayos extracción líquido-líquido, con extracto obtenido en sólido-líquido

Con este experimento se determinó que la naturaleza hasta ahora observada de la sustancia inhibitoria es parcialmente hidrofílica debido a que los disolventes menos polares no extrajeron la sustancia inhibitoria de forma total (tabla 10).

<i>Disolvente</i>	Índice de polaridad	Densidad (g/ml)	Fase superior/(^{UA}/ml)	Fase inferior/(^{UA}/ml)
<i>Pentano</i>	0.0	0.626	NI/0	IP ^P /1706.66
<i>Tolueno</i>	2.3	0.867	IP ^{PC} /426.6	IP ^{PC} /213.33
<i>Cloroformo</i>	4.1	1.498	IP ^P /320	IP ^P /1280
<i>Benceno</i>	3.0	0.879	IP ^P /213.33	IP ^C /492.8
<i>Etil Acetato</i>	4.4	0.894	IP/426.6	IP ^C /426.6

Tabla 10. Extracción líquido-líquido, utilizando como Fase 1 a extracto obtenido por metodología de lixiviación en frío utilizando como disolvente primario el etanol. NI: No inhibición, CP: Crecimiento Parcial, IP: Inhibición Parcial, I: inhibición, ^P: Periférico, ^C: Central. La fase superior e inferior varía en cada ensayo con respecto a las densidades de cada solvente.

Tratamiento con proteasa de *Bacillus licheniformis*.

El tratamiento de un extracto de sustancia inhibitoria con proteasas mostró que la actividad de la sustancia inhibitoria disminuye su capacidad de antagonizar casi a la décima parte de su potencia lo cual correspondió aproximadamente al 10.83% (tabla 11). Lo cual podría indicar que la naturaleza química de la sustancia es de tipo protéico o parcialmente protéico. El volumen probado en el ensayo de agar en doble capa fue de 300µl.

<i>Ensayo</i>	UA/ml
<i>Proteasa</i>	173.33 ± 40
<i>Sin proteasa</i>	1600 ± 106.6

Tabla 11. Determinación de UAs/ml obtenidas en los distintos momentos cuando se adicionada la proteasa y si adicionar proteasa; el ensayo de obtención de datos se describe en metodología.

Cuantificación de proteínas por método Bradford

Los disolventes que presentaron mejor capacidad de extracción de la sustancia inhibitoria fueron el etanol y el cloroformo, utilizando los extractos de estos dos disolventes con mejor capacidad de extracción de la sustancia inhibitoria producida por *Sphingomonas* sp DS-204 se realizó la cuantificación de proteínas por método Bradford (Tabla 12). La concentración de proteínas fue mayor en extractos de cloroformo.

<i>Muestra</i>	Concentración de proteínas
<i>Cloroformo</i>	0.2167 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
<i>Etanol</i>	0.2925 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Tabla 12. Determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford.

Determinación del peso molecular de la sustancia inhibitoria mediante el método de electroforesis.

La electroforesis del extracto obtenido por la metodología de lixiviación en frío, con actividad inhibitoria corroborada, se sometió a una electroforesis con geles de acrilamida al 16% usando un marcador (Amersham ECL Rainbow Markers; Low-Range). Se observaron bandas de tamaños diversos (Fig. 22), la presencia de una banda tenue alrededor de 3.5 KDa, podría corresponder a la sustancia de interés, pudiéndola catalogar como una sustancia con características proteicas de aproximadamente 3.5 KDa.

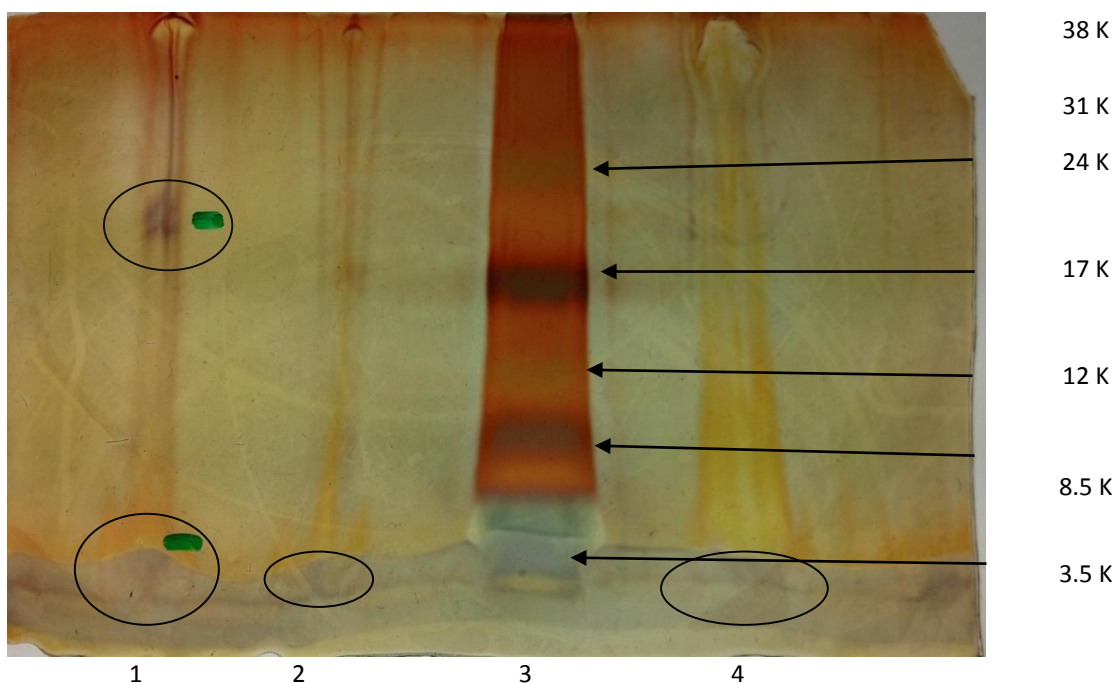


Fig. 22. Gel de electroforesis, con la banda tenue obtenida de tamaño aproximado de 3.5 KDa y una banda superior de peso aproximado de 24 KDa. Carril 1: Extracto etanólico sin filtrar; carril 2: Extracto etanólico filtrado con filtro Millipore de 10 KDa; carril 3: Marcador de peso molecular Amersham ECL Rainbow Markers; Low-Range; carril 4: extracto en cloroformo.

Análisis cromatográfico del extracto con actividad inhibitoria probada, obtenido por la metodología de lixiviación en frío.

Se determinaron un total 33 compuestos (Fig. 23) en el extracto, tomando especial interés el hecho de encontrar una sustancia con un perfil similar a un compuesto inhibitor conocido (actinomicina D) (Fig. 24). No obstante a pesar de observar esa cantidad de compuestos a partir del extracto no podemos correlacionar si alguno de ellos podría ser la

sustancia responsable de la inhibición, por lo que se incorporan en la siguiente sección aquellos compuestos con actividad antagonica reportada o capacidad inhibitoria.

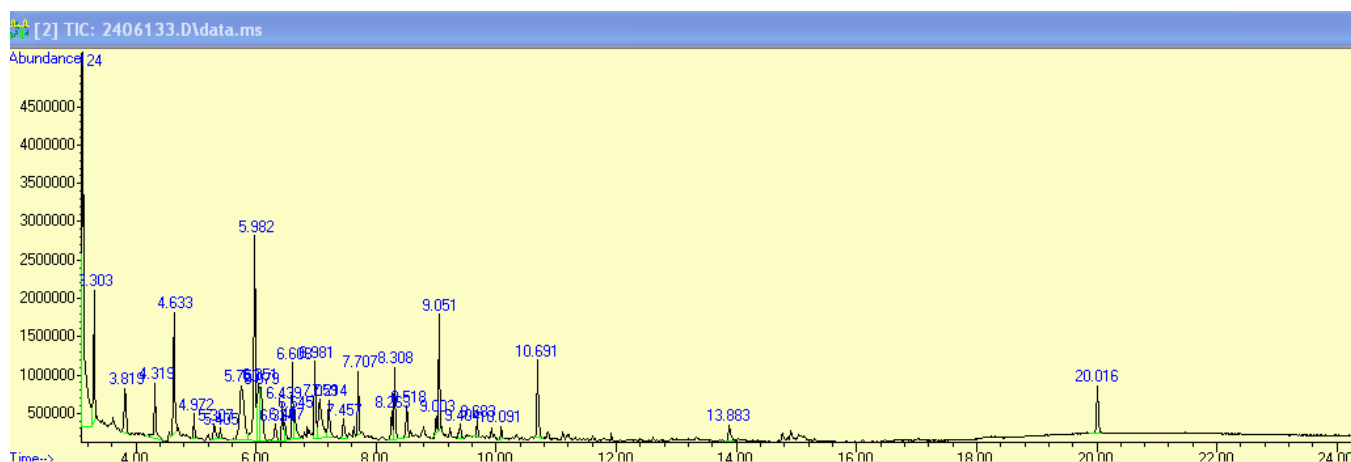


Fig. 23. Análisis global de cromatografía de gases (cromatograma) en la que se desglosan todas las sustancias químicas diferentes encontradas en los extractos obtenidos por metodología de lixiviación en frío del crecimiento de *Sphingomonas* sp. DS-204, aquí se muestran los 33 compuestos en un solo gráfico separados por su tiempo de retención en la columna de cromatografía.

Compuestos de interés obtenidos en la cromatografía biblioteca NIST08: identificación de picos mayoritarios, se muestran los compuestos con los picos de absorción más próximos a los obtenidos en el cromatograma.

Tiempo de retención: 3.301 3.93 C:\Database\NIST08.L

- 2-Propanone, 1-hydroxy- 813 000116-09-6 9
- Ethanamine, 2-methoxy- 886 000109-85-3 9
- Ethanol, 2-nitro-, propionate (éster) 22043 005390-28-3 9

Tiempo de retención: 4.665 4.97 C:\Database\NIST08.L

- 2(5H)-Furanone 1336 000497-23-4 53
- Borane, diethylmethyl- 1369 001115-07-7 53
- 2H-Pyran, 3,4-dihydro- 1413 000110-87-2 53

Tiempo de retención: 5.981 10.40 C:\Database\NIST08.L

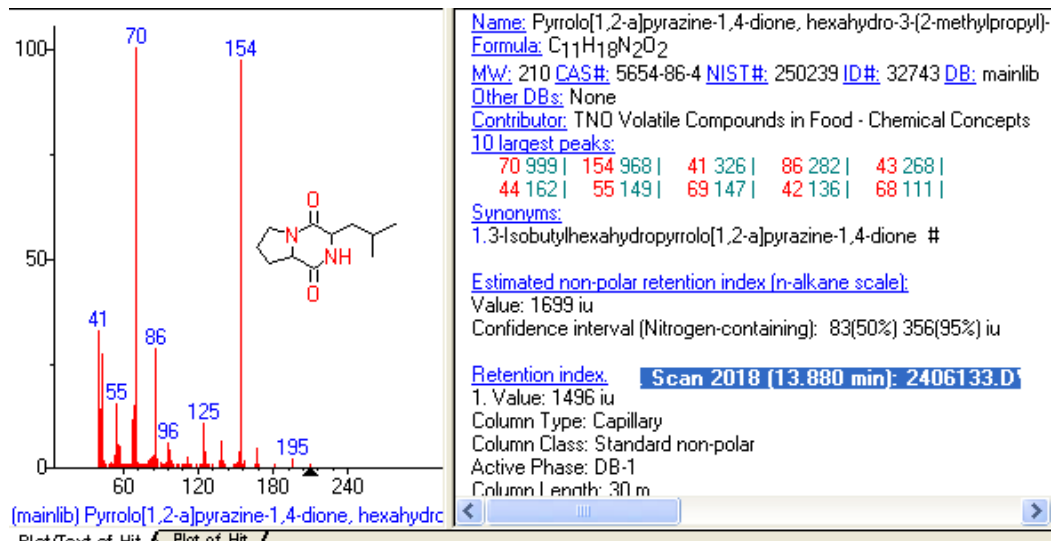
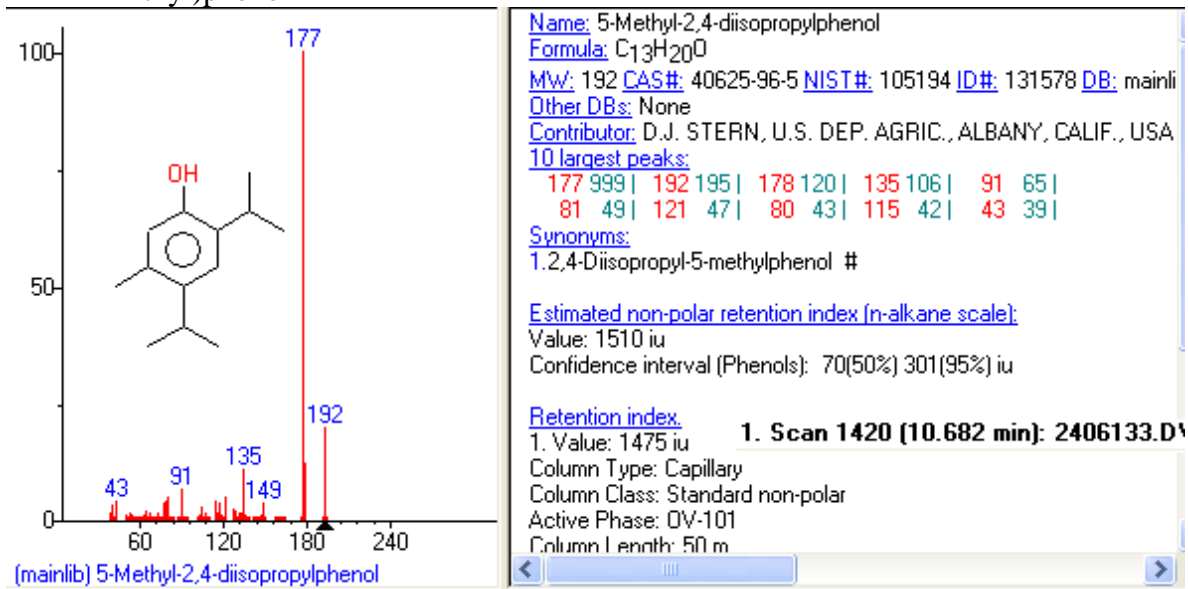
- Cyclotrisiloxane, hexamethyl- 76686 000541-05-9 59
- Cyclotrisiloxane, hexamethyl- 76685 000541-05-9 56
- 1,2-Bis(trimethylsilyl)benzene 76049 017151-09-6 50

Tiempo de retención: 7.061 3.97 C:\Database\NIST08.L

- 2(3H)-Furanone, dihydro-4-hydroxy- 4200 005469-16-9 72
- Urea, trimethyl- 4170 000632-14-4 53
- N'-Isopropylureidoacetic acid 30431 063637-91-2 45

Tiempo de retención: 10.693 3.02 C:\Database\NIST08.L

5-Methyl-2,4-diisopropylphenol 53127 040625-96-5 94
 Octamethyl-1,3-cyclohexadiene 53220 1000110-41-8 74
 2-(1,1-Dimethylethyl)-6-(1-methylethyl)phenol 53143 022791-95-3 59



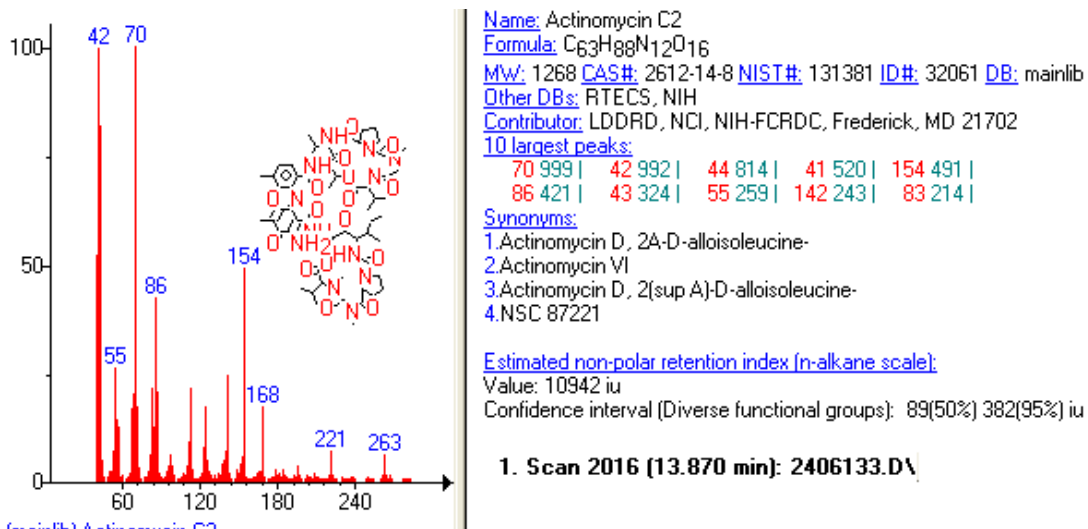


Figura 24. Análisis de los picos del cromatograma para la identificación de compuestos obtenidos del extracto en etanol por metodología de lixiviación en frío; se muestra igualmente los picos de interés de compuestos con los que *Sphingomonas* sp DS-204 podría tener la función de inhibición. En los que se hace mención a algunos compuestos obtenidos del análisis de cromatografía de gases y en los que se destaca una sustancia en particular; actinomicina C2, sustancia con actividad inhibitoria antifúngica ya reconocida. Un lactona similar a la presente en la estructura carbonada de actinomicina C2 fue igualmente identificada Furanona. Compuestos similares a aceites esenciales como el Timol o Carvacrol fueron identificados.

Características de la sustancia inhibitoria extraída de *Sphingomonas* sp. DS-204

Características de la sustancia inhibitoria Rango

Producción	Máxima después de 30hrs
Unidades arbitrarias	1989.33±387.15 UA/ml a 30hrs.
Estabilidad térmica	Estable de -4 a 60°C
Tamaño	Aproximadamente 3.5 KDa
Estabilidad cambios de pH	Estable a rangos de pH de 3-9
Posible naturaleza	Posible naturaleza proteica; regiones proteicas
Sensibilidad a proteasa	Sensible a proteasa de <i>Bacillus licheniformis</i>
Naturaleza polar	Parcialmente hidrofílica IP (índice de polaridad)(4.1-5.2)
Estabilidad de almacenamiento	7 meses a 4°C
Fuentes de carbono en que se produce mayor cantidad de sustancia inhibitoria	MM9 Manitol, Glucosa, Fructosa y medios comerciales LB y Mac Conkey

Tabla 13. Resumen de los parámetros que se han logrado determinar hasta el momento de la sustancia inhibitoria producida por *Sphingomonas* sp. DS-204.

Discusión

Muchas de las bacteriocinas caracterizadas en bacterias ácido lácticas son extraídas de un cultivo líquido (Sawa *et al.*, 2008; Nicolas *et al.*, 2011), sin embargo, en el presente trabajo, para el caso de *Sphingomonas* sp. DS-204, se observó que la sustancia inhibitoria no se produce en medio líquido a pesar de crecer a la bacteria hasta fase estacionaria avanzada. En casos excepcionales se observaron halos de inhibición grandes causados por células activas que soportaron la actividad del disolvente y no debido a la actividad de la sustancia extraída. Razón por la que se planteó una forma alternativa de extracción.

Como alternativa se optó por la utilización de medios sólidos para la producción de la sustancia inhibitoria. Una de las condiciones de producción de metabolitos bioactivos de interés (colocando a *Sphingomonas* sp. DS-204 en un sistema sólido) se puede lograr por medio de la inmovilización de la cepa productora en perlas de alginato (Tao *et al.*, 2009), utilizar tubos de diálisis con un inóculo de *Sphingomonas* sp. DS-204 crecida en medio sólido, a razón de poder imitar las condiciones de crecimiento en un medio sólido. Buscando solo la trasferencia de la sustancia bioactiva al medio líquido y una transferencia de nutrientes a *Sphingomonas* sp. DS-204. Con el objetivo de poder realizar sistemas de extracción líquido-líquido para la purificación parcial de la sustancia inhibitoria.

Se implementó el uso de filtros de nitrocelulosa para el crecimiento en medio sólido de *Sphingomonas* sp. DS-204, con el fin de realizar dos pasos para la obtención de compuestos bioactivos de interés; la clarificación del medio de producción y la concentración del producto (Quesada-Chanto, 2013).

Inicialmente la clarificación del medio se realizaba mediante la remoción mecánica de las colonias de *Sphingomonas* sp. DS-204 para posteriormente realizar una inactivación de las células aun presentes en el medio sólido por el uso de cloroformo durante 1 h en campana de extracción; esto fue sustituido por el crecimiento de *Sphingomonas* sp. DS-204 en filtros de nitrocelulosa en contacto con el medio de cultivo en sólido. Evitando el uso de disolventes extras en el proceso de extracción, haciendo que la membrana de nitrocelulosa cumpliera con los pasos de clarificación y filtración de biomasa (Quesada-Chanto, 2013).

En la producción de antibióticos por parte de los géneros de *Streptomyces* se ha logrado determinar que existe una modificación de su actividad antifúngica dependiente de factores como; nutrientes utilizados para el crecimiento de *Streptomyces*, pH y temperatura. Un sistema óptimo con alta actividad antagónica resulta cuando se utilizan medios de crecimiento con glucosa como fuente de carbono y peptona como fuente de nitrógeno, la temperatura de incubación ideal es de aproximadamente 28°C, y con una condición de pH = 8 (Kanini *et al.*, 2013). Es importante poder determinar las condiciones óptimas de cultivo para cada cepa productora de sustancias inhibitorias o antagónicas, como se observó en el estudio de Kanini y colaboradores (2013), un cambio en la composición del medio puede alterar la capacidad de producción del metabolito con actividad antagónica, esta puede

verse comprometida de tal manera que la misma cepa antagonica ya no sea capaz de producir el bioproducto con la cual ejercía un control biológico sobre cepas del genero fúngico *Fusarium*. Es importante poder determinar las características ideales de producción para cada una de las moléculas o metabolitos con actividad antagonica, tales como las condiciones o requerimientos nutricionales necesarios para cada cepa productora.

La producción de algunas sustancias inhibitorias, como las bacteriocinas, se ve favorecida bajo ciertas condiciones, como por ejemplo variando la composición del medio de cultivo. En general los medios de cultivo complejos que contienen una fuente de nitrógeno rica son óptimos para el aumento en la producción de bacteriocinas. Las condiciones de producción son específicas para cada organismo productor (Monroy Dosta. 2009). Las mutacinas D-123.1 y F-59.1 son purificadas de medios de cultivo enriquecidos con extracto de levadura para su producción por *Streptococcus mutans* 59.1 y 123.1 (Nicolas *et al.*, 2011), de la misma manera Lactociclina Q, una bacteriocina producida por *Lactococcus* sp. QU 12, necesita de un medio complejo con fuentes ricas de nitrógeno para la producción de esta bacteriocina (Sawa *et al.*, 2008). Esto se ve relacionado con lo propuesto por Kawai en 2003, donde se menciona que en general los medios complejos que contienen una fuente rica de nitrógeno son óptimos para el aumento de producción de bacteriocinas. La sustancia inhibitoria presente en extractos del presente trabajo, producidos por *Sphingomonas* sp. DS-204, fue producida en medio mínimo donde la cepa creció en un medio de cultivo con una fuente de nitrógeno definida (cloruro de amonio). Lo cual contrasta con los requerimientos nutricionales relacionados con cepas productoras de bacteriocinas para la biosíntesis de su compuesto bioactivo individual. Igualmente se confiere especial interés, el hecho de que no se requiere de una fuente de carbono compleja para la producción de la sustancia inhibitoria, del extracto de DS204, esto concuerda con una de las características de las condiciones de producción de algunas bacteriocinas; derivadas del metabolismo primario de los microorganismos (Monroy Dosta, 2009; Kawai *et al.*, 2003), relacionadas a medios de cultivo o condiciones de crecimiento en donde las fuentes de carbono son azúcares fermentables que son sencillos de incorporarse al metabolismo de los microorganismos (glucosa, fructosa, lactosa, manitol) (Inbar y Lapidot, 1991).

En contraste con lo referido por Kawai (2003), *Sphingomonas* sp. DS-204 es capaz de llevar a cabo la producción de su sustancia inhibitoria en medios mínimos, dando a relucir que el factor importante en la producción de esta sustancia inhibitoria es la fuente de carbono algo similar a lo propuesto para la ruta biosintética de actinomicina por parte del genero *Streptomyces*. Este modelo de producción se ajusta al propuesto por Madigan y cols. (2011). Recalcando la importancia de buscar las condiciones específicas para la producción de sustancias antagonicas.

El incremento exponencial en la concentración de proteínas en las fases de crecimiento de una curva microbiana puede deberse a la secreción de proteínas estructurales o enzimáticas

necesarias en cada fase del crecimiento bacteriano. Éstas podrían ser precursores de los nutrientes presentes en el medio, también pueden tener alguna finalidad distinta a ser implementadas por la célula bacteriana como complejos estructurales, de estabilización o con actividad catalítica, algunos son compuestos peptídicos que participan como subunidades de un sistema de señalización de dos componentes o metabolitos secundarios que ayuden a las células bacterianas a captar señales del ambiente para expresiones genéticas específicas (Madigan *et al.*, 2011). Algunas proteínas también puede tener una finalidad de captación nutricional como lo son los sideróforos, compuestos peptídicos capaces de interactuar con iones metálicos para ser más fácilmente captables por una célula bacteriana y que sean menos afines a captación por otras cepas, dando como fin una ventaja competitiva de la cepa productora en la captación de nutrientes específicos para su crecimiento y desarrollo. Los compuestos peptídicos con actividad antagonica inhiben a ciertas poblaciones bacterianas que compiten con la célula productora por un nutriente en específico, por ejemplo las porinas o bacteriocinas de bacterias tipo ácido lácticas, cuya finalidad es el inhibir a bacterias competidoras por los nutrientes o que tengan un efecto negativo en el hábitad ecológico principal de la bacteria productora.

Los metabolitos bioactivos con actividad antagonica representan un amplio espectro de estructuras químicas y presentan gran variación con respecto a su composición molecular. Las familias de bacteriocinas incluyen una variedad de proteínas en términos de tamaño, modo de acción y mecanismo de inmunidad, muchas de estos péptidos bioactivos presentan una amplia variedad de tamaños moleculares con respecto a sus cadenas de aminoácidos. Muchas de las bacteriocinas producidas por los géneros Gram-negativos, resultan en proteínas de gran tamaño (Riley y Wertz, 2002); las colicinas producidas por *E. coli* pueden variar en tamaño desde 449 a 629 aminoácidos (aa), otras bacteriocinas con actividad de nucleasa involucran un espectro de tamaños aún más amplio que van desde 178 a 777 aa (Riley y Wertz, 2002), en bacterias Gram-Positivas en espectro de los tamaños moleculares de las bacteriocinas va desde un valor menor a 5 KDa (Lantibioticos) (Rodney *et al.*, 2014) hasta moléculas de gran tamaño (Rojas y Vargas, 2007), con pesos moleculares mayores a 30 KDa; bacteriocinas clase III, como la helveticina (37 KDa) producida por *Lactobacillus helveticus* (Giraldo *et al.*, 2010) y lactacina B sintetizada por *Lactobacillus acidophilus* (Barefoot y Klaenhammer, 1984); hasta la mutacina es una bacteriocina de 2.720 KDa producida por *Streptococcus mutans* (Nicolas *et al.*, 2011) debido a esta amplia gama de pesos moleculares se puede considerar que cada bacteriocina es diferente y particular en su manera de acción o producción (Rojas y Vargas, 2007).

Comparando estos valores de tamaño molecular podemos ubicar a la bacteriocina de *Sphingomonas* sp. DS-204 dentro de la clase II perteneciente a bacteriocinas termoestables de tamaño menor a 10 KDa; o dentro de la clase IV por su posible característica de incorporar una región no proteica en su estructura molecular (sección lipídica o glucosídica) según la clasificación de bacteriocinas realizada por Kemperman en 2003.

Al observar la amplia gama de tamaños moleculares de bacteriocinas reportadas podemos determinar que el tamaño más próximo al compuesto con actividad antagónica presente en el medio de cultivo de *Sphingomonas* sp. DS-204 se ubica dentro del rango previsto por estudios previos realizados en este tipo de compuestos proteicos. En el ensayo de electroforesis se observaron dos bandas una de 24 KDa y una de 3.5 KDa correspondientes a dos posibles proteínas que los extractos contenían. En acuerdo a los resultados de tamaño de la sustancia inhibitoria determinada por filtración, se considera que la proteína de 3.5 KDa podría ser la que esté involucrada con la actividad inhibitoria, ya que la proteína grande es retenida en los filtros de 10 KDa. La banda de 3.5 KDa no es muy definida, posiblemente porque contiene una parte proteica y una parte diferente a una proteína (Muñoz-Rojas y Caballero-Mellado *et al.*, 2003); por ejemplo una parte glicosídica, lo cual la podría incluir dentro de la clasificación Clase IV de bacteriocinas de la clasificación de Kemperman.

En acuerdo con los datos de este trabajo el extracto crudo obtenido por lixiviación en frío de *Sphingomonas* sp. DS204, contiene diversas sustancias. Aún desconocemos si alguno de los compuestos encontrados podría ser el responsable de la actividad inhibitoria, no obstante se detectó a una sustancia parecida a actinomicina D (1255.42 g/mol) (Sobell, 1985), la cual podría ser una de las moléculas responsables del antagonismo observado por *Sphingomonas* sp. DS204. Sin embargo, la sustancia inhibitoria del trabajo presente es mayor a 3 KDa y mayor a la actinomicina D, lo que pudiera explicarse solo si el núcleo activo está unido a algún compuesto proteico. El análisis cromatográfico revela una gama de compuestos que están relacionados con actividad antagónica, uno de los cuales es la furanona, compuesto con actividad inhibitoria reportada (Kuehl *et al.*, 2009) que presenta una estructura similar a los compuestos lactonados.

En los experimento con proteasas, se observó una considerable disminución de la bioactividad de inhibición posterior al tratamiento del extracto obtenido por la metodología de lixiviación en frío de la sustancia inhibitoria producida por *Sphingomonas* sp DS-204 con proteasas de *Bacillus licheniformis*. Si se toma en cuenta la actividad inhibitoria por el compuesto determinado como parecido a actinomicina D y la disminución de la actividad inhibitoria posterior al ensayo con proteasa de *Bacillus licheniformis* se puede sugerir que la disminución del 90% de la actividad inhibitoria (aproximadamente) se debe a que un defecto en la estructura pentapeptídica del núcleo de actinomicina puede comprometer su bioactividad al afectar su estructura y estabilidad química. Otra razón podría ser la eliminación por proteólisis del péptido señal que hace de señal para introducir el núcleo con bioactividad inhibitoria hacia el citosol de las cepas sensibles. la eliminación de la cadena lateral del pentapéptido de actinomicina D por acción de proteasas en un suspensión da como resultado la desestabilización de la estructura química de actinomicina D causando que no sea posible una unión estable con dsDNA (Paramanathan *et al.*, 2012) disminuyendo su capacidad inhibitoria; sin embargo no mitigándola en su totalidad ya que

esta molécula de actinomicina D por su región estructural de anillo tricíclico de fenoxazona es capaz de unirse a DNA monocatenario inhibiendo la síntesis de RNA (Keller *et al.*, 2010).

Tomando en cuenta algunos de los compuestos químicos que se determinan en la cromatografía de gases-masa hecha a los extractos de sustancia inhibitoria realizadas del crecimiento de *Sphingomonas* sp. DS-204, se podría inferir que el modo o mecanismo de inhibición que puede llevar a cabo *Sphingomonas* sp. DS-204 contra sus bacterias competidoras es por medio de modificación del pH en los medios de cultivo en los que se co-cultivan la cepa productora (*Sphingomonas* sp. DS-204) y cepa sensible (metilotrónica 3Mrh6R). Sin embargo por medio de las pruebas de crecimiento en medios de cultivo de citrato de Simmons (el azul de bromotimol es el indicador de pH, que vira al color azul en medio alcalino; laboratorios britannia) y agar Mac Conkey podemos determinar que el medio de cultivo después del crecimiento de *Sphingomonas* sp. DS-204 tiene un carácter más alcalino que ácido, por lo que se descarta la producción de ácidos orgánicos para la modificación de pH de los medios de cultivo como mecanismo de acción por el cual *Sphingomonas* sp. DS-204 puede inhibir a las cepas sensibles a su crecimiento por competencia en donde se co-cultivan a *Sphingomonas* sp. DS-204 y sus competidoras que presentan inhibición. Además en un medio con pH controlado en la neutralidad (Medio MESMA) el antagonismo se sigue observando (Aguilera Méndez, 2010).

Una acción combinada de la actinomicina D con algunas otras moléculas segregadas por el metabolismo de *Sphingomonas* sp. DS-204 podrían ser responsables del antagonismo observado, por ejemplo en la combinación con los derivados de ácidos orgánicos débiles (ácido benzoico) que se lograron identificar en la prueba de cromatografía de gases.

El mecanismo de acción por el cual *Sphingomonas* sp. DS-204 podría inhibir a microorganismos competidores, podría estar relacionado a un compuesto protéico alrededor de 3.5 KDa de tipo bacteriocina; cuyo núcleo de acción puede estar íntimamente ligado a un compuesto similar a la actinomicina D, producida por el género bacteria *Streptomyces* (*Streptomyces parvulus*) (Raviña-Rubira, 2008).

Se ha observado que *Sphingomonas* sp. OF178 promueve el crecimiento de plantas (Morales-García *et al.*, 2010). La cepa OF 178 está cercanamente relacionada con la cepa *Sphingomonas* sp. DS-204, (Böltner *et al.*, 2008) por lo que es concebible que esta cepa también promueva el crecimiento de maíz, razón por la que se comenzó a estudiar en primer lugar; la acción que se le puede adjuntar a esta cepa en la promoción de crecimiento vegetal es en ejercer un control biológico de fitopatógenos o microorganismos parasitarios que alteren el índice de crecimiento del tejido vegetal, posiblemente con un mecanismo de inhibición por medio de secreción de sustancias “actinomicin-like”, utilizado en otros géneros bacterianos como *Streptomyces*, para la inhibición de hongos fitopatógenos

Fusarium oxysporum (Kanini *et al.*, 2013). Interesantemente *Sphingomonas* sp. DS204 también inhibe a miembros del género *Fusarium* (Vera-Gaona, comunicación personal).

El análisis cromatográfico también reveló un compuesto como identificado como actinomicina C2 sustancia capaz de ser extraída por Etil-Acetato (Kanini *et al.*, 2013), y cuyo mecanismo de acción es capaz de poder inhibir a una amplia variedad de organismos que presentan regiones ricas en G-C dentro de su genoma, igualmente si combinado la necesidad de una molécula ancla en la pared o periferia dentro de los organismos sensible para realizar el inicio de la inhibición (Morten *et al.*, 2011), nos da una idea de la especificidad del compuesto que se logró determinar del crecimiento de *Sphingomonas* sp. DS-204.

La solubilidad o la implementación de Etil-Acetato como disolvente extractante de actinomicina C, nos da un indicio que el núcleo bioactivo de nuestro compuesto puede ser parecido a este al obtenido de la metodología de lixiviación en frío del medio de crecimiento de *Sphingomonas* sp. DS-204, dado que haciendo un análisis de los disolventes utilizados para realizar extracción (etanol y cloroformo) podemos delimitar que el índice de polaridad de Etil Acetato (4.4) está presente en un punto medio entre el índice de polaridad del etanol (5.2) y el cloroformo (4.1). En condiciones de uso de disolventes éstos pueden ser implementados para su extracción, siendo el incremento de los residuos aminoácidos en la molécula bioactiva de *Sphingomonas* sp. DS-204 la posible razón por la que el Etil Acetato no sea el disolvente ideal para la extracción de dicha sustancia. En esto punto podemos tener un acuerdo que este disolvente se descartó en las primeras fases de experimentación, no por la falta de capacidad de extracción del compuesto activo, sino por la complejidad que presentaría el utilizar un extracto de esta naturaleza polar para los siguientes ensayos que se realizaron para la caracterización del extracto con actividad antagónica, pues este disolvente (Etil Acetato) fue utilizado en los primeros ensayos y con los cuales se logró realizar una extracción de dicha sustancia, sin embargo no se lograba tener un proceso de extracción con condiciones de trabajo ideales como las que se lograron obtener con el proceso de extracción utilizando como disolvente el etanol. Esto llevado a la par de las condiciones de extracción particular para cada sustancia.

Los resultados arrojados con las diversas fuentes de carbono nos dan indicio, tomando como referencia los estudios de Monroy-Dosta y colaboradores (2009) que la importancia de proporcionar a las bacterias productoras de bacteriocinas un medio de crecimiento ideal para la producción de dicha sustancia es imperante, y combinando este estudio con el análisis en los géneros bacterianos *Streptomyces* de Inbar y Lapidot (1991) en el que se nos muestra un estudio inicial de la ruta biosintética de actinomicina, compuesto bioactivo inhibidor de crecimiento, y la necesidad que muestra este *Streptomyces* con respecto a fuentes nutricionales para la producción de dicha sustancia, sugiere una necesidad de una fuente de carbono como los azúcares reductores capaces de pasar por la totalidad del ciclo de ácido tricarbóxico para la formación de todos los esqueletos carbonados precursores

necesarios para la síntesis y ensamblaje de la sustancia inhibitoria actinomicina, cosa que se logró observar en nuestro estudio ya que al realizar los estudios con una diversidad de fuentes de carbono (medios mínimos) y comparándolos con un medio rico en nutrientes y variedad de fuentes de carbono, aquellos medios con fuentes de carbono con azúcares tales como manitol, glucosa, fructosa y lactosa fueron los que demostraron tener una mayor capacidad de sustentación de la biosíntesis de la sustancia inhibitoria en *Sphingomonas* sp. DS-204, pues a pesar de ser restringidos en otras fuentes nutricionales, las fuentes necesarias para los esqueletos carbonados precursores del núcleo bioactivo, estaban presentes en las formulaciones del medio.

Conclusiones

- En el presente trabajo se observó que *Sphingomonas* sp. DS204 produce una (s) sustancia (s) inhibitoria (s) en medio gelificado, pero no en medio líquido.
- La capacidad inhibitoria de *Sphingomonas* sp. DS204 se incrementa en función del tiempo de crecimiento, observando los máximos halos de inhibición en la fase estacionaria tardía (30 a 36 horas).
- Se determinó que *Sphingomonas* sp. DS-204 no necesita de la presencia de cepas susceptibles para realizar la producción de la sustancia inhibitoria.
- *Sphingomonas* sp. DS-204 es capaz de llevar acabo la producción de su sustancia inhibitoria en medios mínimos, siendo la glucosa una de las fuentes de carbono donde se produce.
- Se estandarizó un método para extraer una sustancia inhibitoria producida por *Sphingomonas* sp. DS204 a partir de medios gelificados, ese método fue denominado como lixiviación en frío.
- Se descartó que los sideróforos estén implicados en el antagonismo observado contra cepas sensibles de este trabajo.
- Se determinó que la sustancia inhibitoria producida por *Sphingomonas* sp. DS-204 es de características proteicas, con un peso molecular alrededor de 3.5 KDa.
- La sustancia inhibitoria extraída en este trabajo es de tipo polar.
- La actividad inhibitoria resultó estable a temperaturas de -4 a 60 °C y a pH de 3 a 9.

Anexo

Medios de cultivo utilizados

- Medio LB.

<i>Compuesto</i>	1Lt	500ml	250ml
<i>Peptona de casina</i>	10	5	2.5
<i>Extracto de levadura</i>	5	2.5	1.25
<i>Cloruro de sodio</i>	10	5	2.5
<i>Agar bacteriológico</i>	16	8	4

Tabla 14. Cantidad en gramos de cada uno de los compuestos para la preparación de medios de cultivo. Las cantidades de los compuestos están dadas en gramos para cada volumen de medio a realizar, para las condiciones en medio líquido la preparación no está presente en la composición.

- Medio MM9 (fuente de carbono variable)

<i>Compuesto</i>	1L	500ml	250ml
<i>Citrato férrico</i>	1000 µl	500 µl	250 µl
<i>Goodies</i>	2500µl	125 µl	625 µl
<i>Fuente de carbono [1M]</i>	25ml	12.5ml	6.25ml
<i>10xM9</i>	100ml	50ml	25ml
<i>Sulfato de magnesio penta hidratado</i>	1000 µl	500 µl	250 µl
<i>Agar bacteriológico</i>	16	8	4

Tabla 15. Cantidad en gramos, mililitros o microlitros de cada uno de los compuestos para preparación de medios

Preparación 10xM9

<i>Compuesto/volumen a preparar</i>	1 L	250ml	100ml
<i>Na₂HPO₄</i>	70	17.5	7
<i>KH₂PO₄</i>	30	7.5	3
<i>NaCl</i>	5	1.25	0.5
<i>NH₄Cl</i>	10	2.5	1

Tabla 16. Cantidad en gramos de cada uno de los compuestos de la solución stock

Fuente de carbono 1M

<i>Compuesto/volumen a preparar</i>	30ml	15ml
<i>Glucosa</i>	5.4	2.7
<i>Xilosa</i>	4.5	2.25
<i>Sacarosa</i>	10.2	5.1
<i>Fructosa</i>	5.4	2.7
<i>Mio-inositol</i>	5.4	2.7
<i>Manitol</i>	17.9	8.95
<i>Citrato de sodio</i>	7.74	3.87
<i>Manitol</i>	5.4	2.7

Tabla 17. Cantidad en gramos de cada uno de los compuestos de la solución stock

Preparación solución stock citrato férrico:

Disolver 6 g de citrato férrico en 1 L de agua destilada

Preparación solución stock Sulfato de magnesio penta hidratado:

Disolver 124.24 g en 500 ml de agua destilada

Todas las soluciones stock se deben esterilizar por separado y colocarse en el recipiente con agar-agua antes de la elaboración del medio de cultivo.

Medios comerciales utilizados

Agar Citrato de Simmons

<i>Compuesto/volumen a preparar</i>	1 L	250ml	100ml
<i>Citrato de sodio</i>	2.0	0.5	0.2
<i>NaCl</i>	5.0	1.25	0.5
<i>K₂HPO₄</i>	1.0	0.25	0.1
<i>NH₄H₂PO₄</i>	10	2.5	1
<i>MgSO₄</i>	0.2	0.05	0.02
<i>Azul de bromotimol</i>	0.08	0.02	0.008
<i>Agar Bacteriologico</i>	15.0	3.75	1.5

Tabla 18. Cantidad en gramos de cada uno de los compuestos de la solución para preparación del medio de cultivo

Agar Mac Conkey

<i>Compuesto/volumen a preparar</i>	1 L	250ml	100ml
<i>Peptona de carne</i>	1.5	0.375	0.15
<i>Peptona de gelatina</i>	17.0	4.25	1.7
<i>Triptena</i>	1.5	0.375	0.15
<i>Lactosa</i>	10	2.5	1
<i>Mezcla de sales biliares N°3</i>	1.5	0.375	0.15
<i>NaCl</i>	5.0	1.25	0.5
<i>Rojo neutro</i>	0.03	0.0075	0.003
<i>Cristal Violeta</i>	0.001	0.00025	0.0001
<i>Agar Bacteriologico</i>	13.5	3.375	1.35

Tabla 19. Cantidad en gramos de cada uno de los compuestos de la solución para preparación del medio de cultivo

• **Referencias**

1. Abrego-Garrués J.; Reseau A.; García-Galindo D.; 2010. “Energías renovables; energía de la biomasa” Vol. 1 España. 2010
2. Aguado-Bautista L. A.; Álvarez-Cisneros Y. M.; y Ponce-Aquicira E.; 2010. “Evaluación del efecto antimicrobiana in vitro del extracto crudo de bacteriocina en combinación con conservadores químicos utilizados en la industria cárnica”. *Nacameh*, 4:2, 2010.
3. Aguilera-Méndez N.; 2009. Tesis “Búsqueda de sustancias inhibitorias en *Sphingomonas p.*” Benemérita Universidad Autónoma de Puebla- Centro de Investigación en ciencias microbiológicas 2009.
4. Barefoot S. F.; y Klaenhammer T. R.; 1984. “Purification and Characterization of the *Lactobacillus acidophilus* Bacteriocin Lactacin B†”. *AAC.*, 26:3, 328-334, 1984.
5. Basta T.; Keck; Klein J.; y Stolz A.; 2004. “Detection and Characterization of Conjugative Degradative Plasmids in Xenobiotic-Degrading *Sphingomonas* Strains”. *J. Bacteriol.*, 186:12, 3862-38772, 2004.
6. Bradford M. M.; 1975. “A Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Micrograms of Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding”. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254, 1976.
7. Böltner D.; Godoy P.; Muñoz-Rojas J.; Duque E.; Moreno-Morillas S.; Sánchez L.; y Ramos J. L.; 2008. “Rhizoremediation of lindane by root-colonizing *Sphingomonas*”. *Microb. Biotechnol.*, 1:1, 87-93; 2008.
8. Bouttefroy A.; y Milliére JB.; 2000.”Nisin-Curvaticin 13 Combinations for Avoiding the Regrowth of Bacteriocin Resistant Cells of *Listeria monocytogenes* AATCC 15313”. *Int. J. Food Microbiol.* 65 (2-1), 65-75, 2000.
9. Chan Y. C.; Wu J.L.; Wu H. P.; Tzeng K. C.; y Chuang D. Y.; 2011. “Cloning, purification, and functional characterization of Carocin S2, a ribonuclease bacteriocin produced by *Pectobacterium carotovorum*”. *BMC Microbiology*, 11:99, 2011.
10. Chang J. Y.; Lee H. J.; y Chang H. C.; 2007 “Identification of the Agent from *Lactobacillus plantarum* KFRI464 that Enhances Bacteriocin Production by *Leuconostoc citreum* GJ7”, *J. fo Appl. Microbiol.*, 103, 2504-2515, 2007.
11. Chen H.; y Hoover D.G.; 2003. “Bacteriocins and their food applications”. *CRFSFS*, 2, 82-100, 2003.
12. Cintas L. M.; Casusus P.; y Henandez, P.E.; 2000. “Bacterias Lacticas de origen alimentario; consideraciones taxonómicas y filogenéticas”. *Alimentaria*, 38, 61-70, 2000.
13. Cleveland J.; Montville T. J.; Nes I.F.; y Chikindas M. L.; 2001. “Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation”. *ELSEVIER: Int. J. Food Microbiol.*, 71: 1-20, 2001.
14. Costa-López J.; Cervera-March S.; Cunill-Garcia F.; Esplugas Vidal F.; Mans Teixido C.; y Mata-Alvarez J.; 1991. “Curso de ingeniería química: introducción a

- los procesos, las operaciones unitarias y los fenómenos de transporte”. ED. Reverte, España, 2004. PP 81-83.
15. Cotter P. D.; Hill C.; y Ross R. P.; 2005 “Bacteriocins: Developing Innate Immunity for Food”, *Nat. Rev. Microbiol.*, 3, 777-788, 2005.
 16. Cui Y.; Zhang C.; Wang Y.; Shi J.; Zhang L.; Ding Z.; Qu X.; y Cui H.; 2012. “Class IIA Bacteriocins: Diversity and new developments”. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 16668-16707, 2012.
 17. de Arauz L. J.; Jozola A.E.; Pinheiro G. S.; Mazzola P. G.; Pessoa A.; y Vessoni T.C.; 2007. “Nisin Expression Production from *Lactococcus lactis* in Milk whey Medium”. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 13,194-199, 2008.
 18. de Lorenzo V.; Herrero M.; Jakubzik U.; y Timmis K. N.; 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, 1990
 19. Dirix G.; Monsieur P.; Dombreth B.; Daniels R.; Marchal K.; Vanderleydena J.; y Micielsa J.; 2003. “Peptide Signal Molecules and Bacteriocins in Gram-Negative bacteria: A genome-wide *in silico* screening for peptides containing a double-glycine leader sequence and their cognate transporters.” *ELSEVIER Peptides*, 25, 1425-1440, 2004.
 20. Dykes G. G.; y Hastings J.W.; 1997. “Fitness Cost Associated with Class IIA Bacteriocin Resistance in *Listeria monocytogenes* B73”. *Lett. Appl. Microbiol.*, 26, 5-8, 1998.
 21. Dworkin M.; y Falkow S.; 2006. “The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Vol. 7: Proteobacteria: Delta and Epsilon Subclasses. Deeply Rooting Bacteria”. Ed Springer, Singapur, 2006.
 22. Engelhardt K.; Degnes K. F.; Kemmler M.; Bredholt H.; Fjærvik E.; Klinkenberg G.; Sletta H.; Ellingsen T. E.; y Zotchev B. S.; 2010. “Production of a New Thiopeptide Antibiotic, TP-1161, by a Marine Nocardiosis Species‡”. *Appl. Environ Microbiol.*, 76:15, 4969-4976, 2010.
 23. Fuiji K.; Tanaka T.; Hirakawua T.; y Kikuchi S.; 2003. “Potential of a new biotreatment: *Sphingomonas cloacae* S-3T degrades nonylphenol in industrial wastewater”. *J. Ind MiBiotechnol.*, 30:9, 531-535, 2003.
 24. Garrity M. G.; 2005. “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” 2ª Edition, Vol. 2, Estados Unidos.
 25. Giraldo D. J.; Sánchez-Medina O. F.; y Meléndez A. de P.; 2010 “Evaluación de la producción de bacteriocinas a partir de Lactobacilos y bifidobacterias”. *RVCT*, 1:2, 193-209, 2010.
 26. Hermida Bun J. R.; 2000. “Fundamentos de Ingeniería de procesos agroalimentarios”. Ed. Mundi-Prensa. Colección tecnología de los alimentos. España; 2000.

27. Hervé-Grépinet V.; Réhault-Godbert S.; Labas V.; Magallon T.; Derache C.; Lavergne M.; Gautron J.; Lalmanach A.C; y Nys Y.; 2010. "Purification and Characterization of Avian β -Defensin 11, an Antimicrobial Peptide of the Hen Egg". *Antimicrob Agents Chemother*, 54:10, 2010.
28. Hong H. B.; Chang Y.S.; Nam I.H.; Fortnagel P.; y Schmidt S.; 2002. "Biotransformation of 2,7-dichloro- and 1,2,3,4-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by *Sphingomonas wittichii* RW1". *Appl. Environm Microbiology*, 68:5, 2584-2588, 2002.
29. Ibarz Ribas A.; y Barbosa-Cánovas G. V.; 2005. "Operaciones unitarias en la ingeniería de alimentos". Ed. Mundi-Prensa Libros. España.
30. Inbar L.; y Lapidot A.; 1991. "¹³C Nuclear Magnetic Resonance and Gas Chromatography-Mass Spectrometry Studies of Carbon Metabolism in Actinomycin D Producer *Streptomyces parvulus* by Used ¹³C-Labeled Precursors". *J Bacteriol*, 173:24, 7790-7801, 1991.
31. Jauffrais T.; Kilcoyne J.; Séchet V.; Herrenknecht C.; Truquet P.; Hervé F.; Baptiste Bérard J.; Nulty C.; Taylor S.; Tilmann U.; Miles C. O.; y Hess P.; 2012. "Production and isolation of Azaspiracid-1 and -2 from *Azadinium spinosum* Culture in Pilot Scale Photobioreactors". *Mar. Drugs*, 10, 1360-1382, 2012.
32. Jeorge R.D.; 2003. "Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages". *Poultry Science*, 82:640-647, 2003.
33. Jimenez-Sanchez A.; y Guerrero R.; 1982. "Genética molecular Bacteriana". Ed. Reverte, España, pag. 359.
34. Johnsen A. R.; Hausner M.; Schanell A.; y Wuertz S.; 2000. "Evaluation of Fluorescently Labeled Lectins for Noninvasive Localization of Extracellular Polymeric Substances in *Sphingomonas* Biofilms". *Appl. Environm Microbiol*, 66:8, 3487-3491. 2000.
35. Kanini G. S.; Katsifas E. A.; Savvides L. S.; y Karagouni Hindawi A. D.; 2013. "*Streptomyces rochei* ACTA1551, an Indigenous Greek Isolate Studied as a Potential Biocontrol Agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*". *BioMed Res int*, 2013.
36. Kawai Y.; Arakawa K.; Itoh A.; Saitoh B.; Ishii Y.; Nishimura J.; Kitazawa H.; Itoh T.; y Saito T.; 2003. "Heterologous expression of gassericin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus gasei* LA39". *Anim SCi J.*, 74, 45-51, 2003.
37. Keller U.; Lang M.; Crnovcic I.; Pfenning F.; y Schauwecker F.; 2009. "The Actinomycin Biosynthetic Gene Cluster of *Streptomyces chrysomallus*: a Genetic Hall of Mirrors for Synthesis of a Molecule with Mirror Symmetry". *J Bacteriol*, 192:10, 2583-2595, 2010.
38. Kemperman R.; Kuipers A.; Karsens H.; Nauta A.; Kuipers O.; y Kok J.; 2003. "Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574", *Appl. Environ Microbiol*, 69:3, 1589-1597. 2003.

39. Kjos M.; Nes I. F.; y Diep D. B.; 2010. "Mechanisms of Resistance to Bacteriocins Targeting the Mannose Phosphotransferase System", *Appl and Environm Microbiol*, 77:10, 3335-3342, 2011.
40. Klaenhammer T. R.; 1993. "Genetics of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria", *FEMS Microbiol Rev*; 12, 39-86, 1993.
41. Ko K.; Wang B.; Tai P. C.; y Derby C. D.; 2008. "Identification of Potent Bactericidal Compounds Produced by Escapin, an L-Amino Acid Oxidase in the Ink of the Sea Hare *Aplysia californica*†". *Antimicrobiol Agents Chemother*; 52:12, 4455-4462, 2008.
42. Kuehl R.; Al-Bataineh S.; Gordon O.; Luginbuehl R.; Otto M.; Textor M.; y Landmann R.; 2009. "Furanone at Subinhibitory Concentrations Enhances Staphylococcal Biofilm Formation by *luxS* Repression". *Antimicrobiol. Agents Chemother*; 52:10, 4159-4166, 2009.
43. Leistner L.; 1994. "Futher Developments in the Utilization of Hurdle Technology for Food Preservation" Editorial J. Food eng. Edición 22, 421-432, 1994.
44. López-García A.; 1998 Tesis "Búsqueda de actividades aminopeptidasicas en *Schizosaccharomyces pombe*. Purificación y Caracterización de dos nuevas aminopeptidasas", Benemérita Universidad Autónoma de Puebla- Centro de Investigación en ciencias microbiológicas 1998.
45. Machuca-Sánchez D. I.; y Hervás-Torres M.; 2014. "Operaciones unitarias y Procesos químicos". Editorial ED. IC., España, pp. sección 3.3, 2014.
46. Madigan M. T.; Martinko J. M.; Dunlap P. V.; y Clark D. P.; 2011. "Brock; Biología de los Microorganismos". Editorial Pearson, Addison Wesley, Ed. 12, PP., 641-661, 680-700, 866-892 2011.
47. Monroy-Dosta M. C.; Castro-Barrera T.; Fernández-Perrino F. J.; y Mayorga-Reyes L.; 2009. "Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas". *ContactoS*, 73, 63-72, 2009.
48. Morales-García Y.-E.; Herrera M. C.; y Muñoz-Rojas J.; 2007. "Cloranfenicol, Un antibiótico clásico como alternativa en el presente"
49. Morales-García Y.-E.; Aguilera-Mendez N.; Ramirez-Valverde A.; Fuentes-Ramírez L. E.; Ramos J.L.; y Muñoz-Rojas J.; 2008. "Sustancias inhibitorias producidas por *Sphingomonas* sp. Como estrategia de competencia". *Biotec*, 2008.
50. Muñoz-Rojas J.; Fuentes-Ramírez L. E.; y Caballero-Mellado J.; 2004. "Antagonism among *Gluconoacetobacter diazotrophicus* strains in culture media and in endophytic association". *ELSEIVER, FEMS*, 54, 57-66, 2005.
51. Muñoz-Rojas J.; "Bacteriocinas: una estrategia de competencia microbiana propuesta como alternativa de antibioticos dirigidos para el futuro humano"
52. Naidu A. S; Unal R.; y Tulpinski J.; 2006 "Bacteriocin: Antimicrobial Activity and Applications", *Food Biotechnol.*, 2, 1391-1437, 2006.

53. Nicolas G. G.; LaPointe G.; y Lavoie ILM. C.; 2011. "Production, purification, sequencing and activity spectra of mutacins D-123.1 and F-59.1". *BMC Microbiol*, 11:69, 2011.
54. Nuñez G. A.; Cayré M. E.; Castro M.P.; y Garro O. A.; 2007 "Efectividad y modo de acción de nisina sobre *Lactibacillus fructivorans*". Catedral microbiológica de alimentos, facultad de agroindustrias-UNNE, Argentina, 2007.
55. Ochoa-Márquez J.; 2009. Tesis "Construcción de bancas genómicas de dos cepas clínicas de H. influenzae tipo b y H. influenzae NT como herramienta para la búsqueda de genes de virulencia" Benemérita Universidad Autónoma de Puebla-Centro de Investigación en ciencias microbiológicas 2009.
56. Páez -Hernández M. E.; Ramírez-Silva M.T.; y Hernández-Rojas A.; 1997. "Temas Selectos de extracción Líquido-Líquido para el análisis químico" Universidad Autonoma Metropolitana, PP 2-11, 1997.
57. Pascual L. M.; Daniele M. B; Giordano C; y P'ajaro M.; 2008. "Pufication and Partial Characterization of Novel Bacteriocin L23 Produced by *Lactobacillus fermentum* L23". *Curr Microbiol*, 56, 397- 402, 2008.
58. Paramanathan T.; Vladescu I.; McCauley M. J.; Rouzina I.; y Williams M.C.; 2012. "Force Spectroscopy reveals the DNA structural dynamics that govern the slow binding of Actinomycin D", *Nucleic Acids Res*, 40:11, 4925-4932, 2012.
59. Parés R.; y Juárez A.; 2002 "Bioquímica de los Microorganismos" Ed. Reverte, España, PP. 324-334, 2002.
60. Parret A. H.; Schoofs G.; Proost P.; y De Mot R.; 2002. "Plant Lectin-Like Bacteriocin from a Rhizosphere-Colonizing *Pseudomonas* isolate". *J. Bacteriol*, 185:3, 897-908, 2003.
61. Perez R. H.; Zendo T.; y Sonomoto K.; 2014. "Novel Bacteriocin from lactic acid bacterias (LAB): varios structures and applitacions". *Microb, Cell Fact.* 13(suppl 1), 2014.
62. Piña-Suarez Ma. D. A.; Uribe-Diaz C.; Regalado-Gozález C.; Amaya-Llano S. L.; Castaño-Tostado E.; y García-Almendárez B. E.; 2011. "Producción de Nisina por *Lactococcus lactis* UQ2 Usando Suero Lácteo Suplementado y Evaluación de su Actividad después del secado por Aspersión". Ciencia@UAQ, 2011.
63. Quesada-Chanto A.; 2013. "Principios de Biotecnología Microbiana". Ed. UCR, Edición 1^o, Costa Rica, pp 86-89, 137-149, 280-304, 388, 2013.
64. Riley M. A.; y Wertz J. E.; 2002a. "Bacteriocins: Evolution, Ecology and Application". *Annu. Rev. Microbiol.*, 56:117-37, 2002.
65. Riley M. A.; y Wertz J. E.; 2002b. "Bacteriocin diversity: Ecological and evolutionary perspectives". *Biochimie*, 84:5, 357-364, 2002.
66. Rodriguez-Mendoza Ma. N.; Alcántar-Gozález G.; Aguilar-Satelises A.; Etchevers-Barra J. D.; y Santizó-Rincón J. A.; 1998. "Estimation of Nitrogen and Chlorophyll Status of Tomato with a Portable Chlorophyll Meter". *Terra*, 16-2, 1998.

67. Rojas C.; y Vargas P.; 2007. “Bacteriocinas: sustituto de preservantes tradicionales en la industria alimentaria”. *Tecnología en marcha*, 21:2, 9-16, 2008.
68. Sawa N.; Zendo T.; Kiyofuji J.; Fujita K.; Himeno K.; Nakayama J.; y Sonomoto K.; 2008. “Identification and Characterization of Lactocyclicin Q, a Novel Cyclic Bacteriocin Produced by *Lactococcus* sp. Strain QU 12”. *Applied, Environm, Microbiol*, 75:6, 1552-1558, 2009.
69. Svetoch É. A.; Eruslanov B. V.; Levchuk V. P.; Mitsevich E. V.; Kovalev Lu. N.; Fursova N. K.; Teïmurazov M. G.; Stepanshin Lu. G.; Volodina L. I.; y Diatlov I. A.; 2011. “Antimicrobial activity of bacteriocin S760 produced by *Enterococcus faecium* strain LWP760”. *Antibiot Khimioter*, 56(1-2): 3-9, 2011.
70. Svetoch É. A.; Borzilov A. I.; Eruslanov B. V.; Korobova O. V.; Kombarova T. I.; Levchuk V. P.; Teïmurazov M. G.; Stepanshin Lu. G.; Marinin L. I.; y Diatlov I. A.; 2011. “Efficacy of enterocin S760 in treatment of mice with anthrax infection due to *Bacillus anthracis* M-71”. *Antibiot Khimioter*, 56(9-10): 13-8, 2011.
71. Svetoslav T.; Vaz-Velho M.; y Gibbs P.; 2004. “Comparison of two methods for purification of plantaricin ST31, a bacteriocina produced by *Lactobacillus plantarum* ST31”, *Brazilian J. of Microbiol.*, 35, 157-160, 2004.
72. Taechowisan T.; Chuaychot N.; Chanaphat S.; Wanbanjob A.; y Tantiwachwutikul P.; 2009. “Antagonistic effects of *Streptomyces* sp. SRM1 on colletotrichum musae”. *Biotechnol*, 8:1, 86-92, 2009.
73. Tiwari y Srivastava S.; 2008. “Purification and characterization of plantaricin LR14: a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LR/14”, *Appl, Microbio, Biotech*, 79 (5), 759- 767,2008.
74. Ullauri P. G.; 2010. “Transporte de Masa en Extracción fase Sólido-Líquido” *ReCiTeLA*, 2, 5-10, 2010.
75. Valcárcel-Cases M.; y Gómez-Hens A.; 1988. “Técnicas analíticas de separación” Ed. Revérte. España. 1988.
76. Villegas-Casares W. A.; Acereto-Escoffíé P. O.; y Vargas-Quiñonez M. E.; 2006. “Análisis Ultravioleta-visible, la teoría y la practica en el ejercicio profesional” México, 2006.
77. Wescombe P.A.; y Taggm J. R; 2002. “Purification and characterization of streptin, a type A1 lantibiotic cyclic bacteriocin produced by *Streptococcus pyogenes*”. *Appl, Environ, Microbiol*, 69:5, 2737-2747, 2003.
78. Więckowicz M.; Schmidt M.; Sip, A.; y Grajek W.; 2011. “Development of a PCR-based assay for rapid detection of class IIa bacteriocin genes”. *Lett. Appl. Microbiol*, 52, 281-289, 2011.
79. Xing Y.; Peng H.; Zhang M.; Li X.; Zeng W.; y Yang, X.; 2011. “Caffeic acid product from the highly copper-tolerant plant *Elsholtzia splendens* post-phytoremediation: its extraction, purification and identification”. *JZUSB*, 13:6, 487-493, 2012.

80. Zipper C; Nickel K.; Werner A.; y Kohler H-P. E.; 1996. "Complete Microbial Degradation of both Enantiomers of the Chiral Herbicide Mecoprop [(*RS*)-2-(4-Chloro-2-Methylphenoxy) propionic Acid] in an Enantioselective Manner by *Sphingomonas herbicidovorans* sp. Nov". *Appl, Environm, Microbiol*, 62:12, 4318-4322, 1996.