

8 DISCUSIÓN

Gracias a la identificación de las cepas productoras de bacteriocinas por el método de goteo, fue posible elegir las bacterias que tenían el mayor potencial de producir un péptido antimicrobiano efectivo ante la mayoría de las cepas de *P. aeruginosa*. A pesar de que también se probó el efecto contra bacterias de otros géneros como *E. cloacae*, éstas no tuvieron efecto por lo que se decidió utilizar solo bacterias de la misma especie. Una vez separadas las bacterias en sensibles y productoras, se estandarizó el cultivo en caldo nutritivo a 38°C por 48 horas, esto quiere decir que la producción de la bacteriocina se recogió hasta que el crecimiento alcanzó su fase estacionaria, en contraste con lo hecho por (Naz et al., 2015) quienes cultivaron en caldo BHI a 29°C en cultivo nocturno y mantuvieron la OD₆₀₀ a 0.01y cada hora colectaron una muestra la cual fue centrifugada y utilizada para realizar pruebas de actividad antimicrobiana. Con esto, lograron estandarizar la manera en la cual la producción de bacteriocina alcanzaba su máxima expresión y utilizarla para las pruebas futuras.

Por otro lado, en las pruebas de inhibición por disco se obtuvo un halo de inhibición considerable para poder seguir adelante con el proyecto, ya que los 10µL agregados a los discos eran del extracto crudo liofilizado y filtrado. A pesar de estar un poco más puro y libre de bacterias como se pudo comprobar en la prueba de Concentración Mínima Inhibitoria al tener los controles del extracto con caldo sin crecimiento, aún tenía muchos componentes que interaccionaban con las bacterias y disminuían la actividad de la bacteriocina.

Sin embargo, al hacerle los diferentes tratamientos, en muchas bacterias su actividad disminuyó. Por lo que lo más normal sería pensar que el péptido antimicrobiano se perdió

en dichos tratamientos, cosa que no es posible debido a que todas las fracciones y desechos de todos los procesos se utilizaron en los experimentos de actividad antimicrobiano sugiriendo que el método no fue el más correcto ya que la concentración y difusión del compuesto no se alcanzaron en el agar Mueller-Hinton. (Goh & Philip, 2015) sugieren realizar esta prueba por pocillo de difusión y depositando 50 μ L del extracto, esto aumentaría la difusión del sobrenadante en la placa con agar y su cantidad es 5 veces mayor que los discos de papel filtro.

En cuanto a los procesos de purificación de la bacteriocina, la columna de separación empezó teniendo muy buenos resultados. Sin embargo, ésta se tapó y los productos dejaron de salir puros, por lo que se optó por seguir la extracción y purificación en vaso de precipitado por agitación, esto pudo haber provocado una pérdida del producto durante las centrifugaciones o atrapadas en la membrana de fibra de vidrio que se utilizó para la filtración. De cualquier manera, se obtuvo resultados positivos al lavar la columna con agua destilada después del tratamiento con SSI y 0.1% de Tween 80 y durante el tratamiento con SSI pH8 y 0.1% de Tween 80. Esto es un indicativo de que se obtuvo la máxima efectividad de unión al receptor con el primer tratamiento y de separación y aislamiento con el segundo. Esto sería una pauta para futuras investigaciones usando este tipo de bacteriocinas y procedimientos.

El tratamiento con precipitación con sulfato de amonio, disminuyó la capacidad antibacterial de la bacteriocina. A pesar de usar parte de los procedimientos descritos por (Goh & Philip, 2015; Naz et al., 2015), el rendimiento bajó en la mayoría de las bacterias que habían sido sensibles y aumentó en las que no habían sido tan sensibles usando la columna de separación. La cepa D que había sido la más sensible a otro tratamiento, casi

no mostró inhibición en este caso, y cepas como K y 3, entre otras mostraron mayor inhibición en este tratamiento con sulfato de amonio. La única que fue sensible a todos los procesos fue *K. pneumoniae*. Esto podría indicar que los compuestos que actuaban como inhibidores del crecimiento eran diferentes para las cepas bacterianas sensibles. Esto se podría comprobar utilizando SDS-PAGE y haciendo pruebas de sensibilidad con cada proteína que se separe en el gel (Al-Shammary et al., 2013) o variando la solución con las que se realiza la diálisis, ya que esta pudo influir en la separación de las sales y la actividad de la bacteriocina. Se podría usar agua destilada estéril como en este caso, pero variando con buffer EDTA o con buffer fosfato y medir su actividad en los tres casos. (Abdi-Ali et al., 2004)

A pesar de que los resultados salieron variados y que probablemente haya habido presencia de dos moléculas diferentes, es un trabajo que realizando algunas correcciones y utilizando técnicas de biología molecular podría tener mejores resultados que los presentados actualmente. Ya que actualmente se conocen las secuencias genéticas de las piocinas que se presentan en *P. aeruginosa* con mayor frecuencia, se podría utilizar vectores como *E. coli* con plásmidos especiales para expresar las piocinas y tenerlas purificadas y con acciones mayores a las presentadas. (McCaughey et al., 2016)

Este tipo de técnicas moleculares cada vez son más sencillas de aplicar gracias a los nuevos descubrimientos en las bases moleculares, genéticas y bioquímicas de las bacterias pertenecientes a *Pseudomonas*. Se están creando protocolos encargados de hacer inserción o eliminación de genes en *P. aeruginosa* que podrían ayudar en el avance del entendimiento de la bacteria y producción de bacteriocinas, como el método propuesto por (Huang & Wilks, 2017), en el que directamente se utiliza PCR para

amplificar los extremos del gen a eliminar y fusionados por un plásmido suicida especial que por recombinación homóloga y electroporación se crean mutantes de *P. aeruginosa*. Finalmente, el trabajo realizado en esta investigación da la pauta para la aplicación de nuevos métodos tanto de biología molecular como de proteómica y cromatografía y tener un producto mucho más puro, pero más importante que sea reproducible y pueda extraerse con mayor facilidad para la producción de fármacos efectivos contra bacterias patógenas como las son *Pseudomonas aeruginosa*.