

UNIVERSIDAD DE LAS AMÉRICAS-PUEBLA

Escuela de Ciencias

Departamento de Ciencias Químico-Biológicas



Título de tesis

“Aislamiento de bacteriocinas de bacterias asociadas a escamas de pez *Epinephelus striatus*”

Tesis que, para completar los requisitos del Programa de Honores presenta el estudiante

Miguel Ángel Solís Balandra

167048

Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo

Director de tesis: Dr. José Luis Sánchez Salas

UNIVERSIDAD DE LAS AMÉRICAS-PUEBLA

Escuela de Ciencias

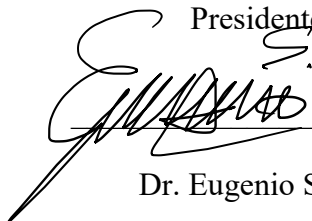
Departamento de Ciencias Químico-Biológicas

Tesis presentada por Miguel Ángel Solís Balandra.

Para completar los requisitos del Programa de Honores.

Aceptada por el Departamento de Ciencias Químico-Biológicas.

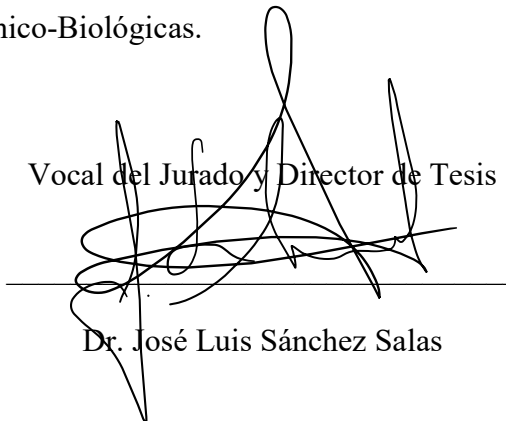
Presidente del Jurado



Dr. Eugenio Sánchez Arreola

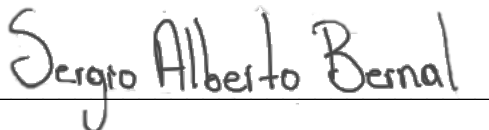
Secretario del Jurado

Vocal del Jurado y Director de Tesis

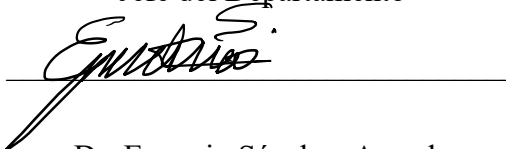


Dr. José Luis Sánchez Salas

Jefe del Departamento



Dr. Sergio Alberto Bernal Chávez



Dr. Eugenio Sánchez Arreola

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer en un inicio al decanato de investigación y postgrado de la Universidad de las Américas Puebla, por la oportunidad de formar parte del proGrama de honores y tener la dicha de llevar a cabo este proyecto de investigación.

Adicionalmente debo un agradecimiento a la Universidad de las Américas Puebla por brindarme todas las facilidades necesarias, así como financiamiento y materiales para la realización de este proyecto en las instalaciones del Laboratorio de Investigación en Microbiología Clínica y Biotecnología, el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, el Laboratorio de Análisis Instrumental, entre otros.

Extiendo el agradecimiento al Dr. José Luis Sánchez Salas, no solo por ser el mentor a cargo de este proyecto de investigación, si no por guiarme a lo largo de toda la carrera, haberme apoyado en un sinfín de decisiones, resuelto cada una de mis dudas, haberme compartido su conocimiento, así como por todos los momentos divertidos y risas que compartimos.

Finalmente me es importante reconocer y agradecer el apoyo brindando hacia mí por el departamento de Becas de la universidad, gracias a recibir una beca académica me fue posible realizar mis estudios, y por ende mi proyecto de investigación en la universidad.

OTROS AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primera instancia a mi familia, haciendo énfasis en mis padres, quienes en todo momento me apoyaron en cada decisión que tome desde un inicio, así como realizaron el gran esfuerzo tanto emocional como económico de permitirme salir de mi ciudad natal para ir a estudiar a un estado diferente al mío, un esfuerzo en conjunto que agradezco desde el fondo de mi alma.

Me gustaría dar un agradecimiento más que especial a mi compañera de vida durante toda esta etapa, Karla, con quien he compartido una infinidad de experiencias a lo largo de toda la universidad y quien me brindo un mundo de apoyo en todo momento, así como me apoyo en cuestiones personales y académicas cada que lo necesité.

Tengo que remarcar mis agradecimientos a todos y cada uno de los docentes que formaron parte de mi formación académica y profesional, desde niveles básicos hasta el nivel profesional, a quienes debo todo el conocimiento adquirido, y en muchos casos, memorias agradables y muchas vivencias increíbles.

Por otro lado, me encantaría resaltar el apoyo a mi formación profesional a los químicos del laboratorio de análisis clínicos del Centro de Salud Urbano de Comitán, a la química Sandra Cantoral, la química Christy, al químico Roberto, el Bioterero Jorge y a la trabajadora social Maggi. A todos les agradezco una infinidad todo lo enseñado y haberme permitido trabajar con ustedes por poco más de un semestre durante la pandemia.

Asimismo, debo agradecer de manera amplia a la plantilla de trabajo del laboratorio de Microbiología médica de laboratorios Aries-Exakta, a la bióloga Erika, la química Cony, la química Leslie, la química Xóchitl, la ingeniera en biotecnología Jackie, el químico Aron los químicos Mayola y César además de a todos los trabajadores que coincidí dentro de las

instalaciones con quienes pude aprender acerca de los retos profesionales y pude llevar mis prácticas profesionales por poco más de medio año en un ambiente sumamente ameno pero a su vez serio y profesional. Además de haber formado una amistad con el equipo de trabajo a quienes les estaré siempre agradecido por el apoyo a mi formación ya apoyo personal en muchas situaciones que viví.

Finalmente tengo que agradecer enormemente a todos los amigos que logre hacer a lo largo de la carrera, tanto a los Amigpidos, a Team parasite, mis amigos del lab, y una infinidad más que no podría plasmar el nombre de todos en este texto o se haría eterno, me siento sumamente afortunado de haber podido coincidir con tanta gente y poder haber hecho tantos amigos en estos años, me resulta increíble todas las experiencias que pude reunir con todos.

1 ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	III
OTROS AGRADECIMIENTOS	IV
1 ÍNDICE	VI
2 ABREVIACIONES	VIII
3 LISTA DE FIGURAS	1
4 LISTA DE TABLAS	2
5 SUMMARY	3
6 RESUMEN	5
7 INTRODUCCIÓN	7
7.1 BACTERIOCINAS	9
7.1.1 CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIOCINAS	9
7.1.2 MECANISMOS DE ACCIÓN DE ACCIÓN	12
8 ANTECEDENTES	14
9 JUSTIFICACIÓN	15
10 HIPÓTESIS	16
11 OBJETIVOS	17
12 MATERIALES Y MÉTODOS	18
12.1 CEPAS RECUPERADAS DE ESCAMAS DE <i>EPINEPHELUS STRIATUS</i>	18
12.2 IDENTIFICACIÓN BACTERIANA	18
12.2.1 AISLAMIENTO DE COLONIAS DE INTERÉS	18
12.2.2 IDENTIFICACIÓN MEDIANTE MÉTODOS CONVENCIONALES	19
12.2.3 IDENTIFICACIÓN MEDIANTE MÉTODOS MOLECULARES	20
12.3 DETECCIÓN DE POSIBLE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	22

12.4	PRUEBAS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL BIOPRODUCTO	23
12.4.1	PRUEBAS DE PRECIPITACIÓN POR GRADIENTE DE PH.	23
12.4.2	PRUEBAS DE FRACCIONAMIENTO DE SOLVENTES.	23
13	RESULTADOS	25
13.1	AISLAMIENTO DE COLONIAS DE INTERÉS	25
13.1.1	RESULTADOS DE LA IDENTIFICACIÓN MEDIANTE MÉTODOS CONVENCIONALES	25
13.1.2	RESULTADOS AL MOMENTO DE LA IDENTIFICACIÓN MEDIANTE MÉTODOS MOLECULARES	28
13.2	PRUEBAS DE EFECTO ANTIMICROBIANO Y ESPECTRO DE ACTIVIDAD.	28
13.3	PURIFICACIÓN DEL BIOPRODUCTO	30
14	DISCUSIÓN	31
15	CONCLUSIONES	34
16	BIBLIOGRAFÍA	36
17	APÉNDICES	39
17.1	DIRECTRICES DE LA AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY PARA EL MÉTODO DE ESTRÍA EN PLACA.	39
17.2	INSERTO ONEPCR ULTRA.	39
17.3	INSERTO AXYPREP DNA GEL EXTRACTION KIT.	39
17.4	SECUENCIA <i>PRIMERS</i> 27F Y 1492R (PÁLKOVÁ ET AL., 2021).	39

2 ABREVIACIONES

OMS	Organización Mundial de la Salud
RAM	Resistencia Antimicrobiana
ESKAPE	<i>Enterobacter spp, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumonie, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aureginosa y Enterococcus faecium.</i>
LAB	Bacterias ácido lácticas (Lactic-acid bacteria)
kDa	Kilodaltones.
pH	Potencial de hidrogeno
ASM	American Society for Microbiology
CFS	Sobrenadante libre de células (Cell-Free supernatant)
PCR	Reacción de cadena de polimerasa
HCl	Ácido Clorhídrico
NaOH	Hidróxido de sodio
Bp	Pares de bases

3 LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Clasificación de las bacteriocinas (Sharma et al., 2021).....	10
Figura 2: Micrografías donde se demuestra la presencia de algunas colonias de microorganismos en las escamas de pez <i>Epinephelus striatus</i>	14
Figura 3: Pruebas antimicrobianas frente <i>Candida albicans</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	14
Figura 4: Esquema de realización del método de estría en placa por la ASM.	18
Figura 5: Corridas de PCR del material genético de las cepas.....	21
Figura 6: Cámara de electroforesis utilizada.....	22
Figura 7: Prueba de precipitación mediante gradiente de pH.	23
Figura 8: Medios de cultivo inoculados con aislados bacterianos de LB1, LB2 y LB4.	25
Figura 9: Microscopías de la tinción de Gram de las cepas.....	25
Figura 10: Prueba de oxidasa en las tres cepas.....	26
Figura 11: Prueba de catalasa en las tres cepas.....	26
Figura 12: Realización de pila de pruebas bioquímicas de selección primaria en LB1 donde a) Agar TSI, b) Agar LIA, c) O/F (Glucosa) y d) Medio MIO.....	26
Figura 13: Realización de pila de pruebas bioquímicas de selección primaria en LB2 donde a) Agar TSI, b) Agar LIA, c) O/F (Glucosa) y d) Medio MIO.....	26
Figura 14: Realización de pila de pruebas bioquímicas de selección primaria en LB2 donde a) Agar TSI, b) Agar LIA, c) O/F (Glucosa) y d) Medio MIO.....	26
Figura 15: Geles de agarosa posterior a la electroforesis y tinción con bromuro de etidio.	28
Figura 16: Pruebas de efecto antimicrobiano preliminares frente a: a) <i>Candida albicans</i> , b) <i>Enterobacter cloacae</i> , c) <i>Salmonella enterica</i> , d) <i>Pseudomonas aureginosa</i>	28

4 LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Resultados de las múltiples pruebas de identificación llevadas a cabo.....	27
Tabla 2 : Resultados de los antibiogramas preliminares.	29

5 SUMMARY

Currently, one of the greatest challenges for global public health corresponds to antimicrobial resistance, a phenomenon in which microorganisms that were previously susceptible to an antimicrobial compound develop mutations and mechanisms that allow them to survive its effects.

This phenomenon has caused the appearance of multi-resistant microorganisms (resistant to two or more antibiotics), such as the famous ESKAPE group designated by the WHO, which cause more lethal pathologies and more expensive treatment. However, these resistant microorganisms also generate losses in the food sector, where microorganisms known as deteriorators have generated resistance to the most commonly used disinfectant agents to eliminate them from the surface of equipment used in food preparation and in the food itself.

Faced with this problem, the need arises for the search and development of new antimicrobials, therefore in this work one of the most innovative alternatives today will be explored, the so-called "bacteriocins", which are produced by various bacterial genera from unconventional sources, as it could be from the marine ecosystem, hoping to recover a biocompound effective in inhibiting the growth of microorganisms of medical interest.

In accordance with the above, this work explores the possibility of production of a bacteriocin of biotechnological interest by three working strains isolated from *Epinephelus striatus* fish scales, seeking in the first instance the identification of these strains, to later carry out tests. antimicrobial effect through the use of culture supernatants of the strains, seeking an inhibition effect against pathogenic microorganisms of interest.

After carrying out the tests, a mild antimicrobial activity was determined against various pathogenic strains such as *Candida albicans*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* among others. In addition to having the possibility of discovery of a new bacterial genus. This opens up in the future the possibility of carrying out a specific identification using molecular methods, as well as a future isolation of the biocompounds produced by the strains, to be able to carry out synergistic activity tests with other bioactive substances.

6 RESUMEN

En la actualidad, uno de los mayores retos para la salud pública mundial corresponde a la resistencia antimicrobiana, fenómeno en el cual microorganismos que previamente era susceptibles a un compuesto antimicrobiano desarrollan mutaciones y mecanismos que les permiten sobrevivir a sus efectos.

Este fenómeno ha causado la aparición de microorganismos multi resistentes (resistentes a dos o más antibióticos), como lo puede ser el famoso grupo ESKAPE designado por la OMS, los cuales causan patologías más letales y con un tratamiento más costoso. Sin embargo, estos microorganismos resistentes, también generan pérdidas en el sector alimentario, donde microorganismos conocidos como deterioradores han generado resistencia frente a los agentes desinfectantes más usados para eliminarlos de la superficie de equipos utilizados en la preparación de alimentos y en el mismo alimento.

Frente a esta problemática es que se plantea la necesidad de la búsqueda y desarrollo de nuevos antimicrobianos y en este trabajo se explorara una de las alternativas más novedosas de la actualidad, las denominadas “bacteriocinas”, las cuales son producidas por diversos géneros bacterianos de fuentes poco convencionales, como lo podría ser del ecosistema marino, esperando recuperar un biocompuesto eficaces en inhibir el crecimiento de microorganismos de interés médico.

De acuerdo con lo anterior, en este trabajo se explora la posibilidad de producción de una bacteriocina de interés biotecnológico por parte de tres cepas de trabajo aisladas de escamas de pez *Epinephelus striatus*, buscando en primera instancia la identificación de estas cepas, para posteriormente realizar pruebas de efecto antimicrobiano mediante el uso de

sobrenadantes de cultivos de las cepas, buscando un efecto de inhibición frente a microorganismos patógenos de interés.

Tras la realización de las pruebas, se determinó una actividad antimicrobiana leve, frente a diversas cepas patógenas como puede ser *Candida albicans*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* entre otras. Además de tener el hallazgo del posible descubrimiento de un nuevo género bacteriano. Esto abre a futuro la posibilidad de realizar una identificación concreta mediante métodos moleculares, así como de un futuro aislamiento de los biocompuestos producidos por las cepas, para poder realizar pruebas de actividad sinérgica con otras sustancias bioactivas.

7 INTRODUCCIÓN

En la actualidad, uno de los principales retos para para la salud pública mundial corresponde al fenómeno de la resistencia antimicrobiana (RAM). Este fenómeno se define como la capacidad natural de los microorganismos de generar adaptaciones que les permiten sobrevivir en presencia de un antimicrobiano frente al cual previamente eran sensibles (Tang et al., 2023).

Si bien este fenómeno se presenta en todo tipo de microorganismo, como lo pueden ser las bacterias, protozoarios, hongos e inclusive virus, frente a cualquier tipo de compuesto antimicrobiano como lo son los antibióticos, antiparasitarios, desinfectantes y antivirales; de manera general se suele limitar el enfoque a la resistencia que bacterias suelen generar frente a antibióticos (Salam et al., 2023).

Las bacterias poseen varios mecanismos que les permite presentar resistencia frente a los antimicrobianos usados para eliminarlas, estos mecanismos se pueden clasificar a grandes rasgos en tres grupos en base a su origen: Resistencia intrínseca, resistencia adquirida o resistencia adaptativa (Christaki et al., 2020).

Dentro de los mecanismos de resistencia intrínseca, se encuentran aquellos relacionados a condiciones propias del microorganismo, como lo podría ser la falta de pared celular en especies de *Mycoplasma* que les confieren resistencia a los antibióticos β -lactámicos. Por otro lado, dentro de los mecanismos de resistencia adquirida o adaptativa, se encuentran: La inactivación enzimática del antimicrobiano (visto en bacterias productoras de β -lactamasas), reducción de la permeabilidad celular, reducción de la concentración intracelular del antimicrobiano (mediante la expresión de bombas de eflujo) así como la modificación de la diana terapéutica. (Abushaheen et al., 2020)

De acuerdo con estimaciones de la Organización Mundial de la Salud, la RAM ha sido directamente responsable de aproximadamente 1.27 millones de decesos a nivel mundial solamente en el año 2019, así como influyó de manera importante en la mortalidad de 4.95 millones de personas asociadas con esos microorganismos (World Health Organization: WHO, 2023). Estas cifras, lejos de ser buenas, son bajas comparadas con el estimado de 10 millones de muertes que se pronostican para el año 2050 atribuibles directamente a la RAM (Walsh et al., 2023).

Durante el año 2017, la misma organización mundial de la salud publicó una lista de patógenos frente a los cuales era necesario el desarrollo de nuevos antimicrobianos. Dentro de esta lista, se colocaron patógenos en el grupo de alta prioridad que han desarrollado resistencia frente a los antibióticos más novedosos a una velocidad mayor que el resto, el grupo consiste de *Enterobacter spp*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecium*, teniéndose el acrónimo ESKAPE para referirse a este grupo de patógenos, los cuales han sido capaces de transmitir y desarrollar múltiples mecanismos de resistencia que los convierten en un riesgo mayor para la población, ya que son capaces de causar patologías más graves, costosas y más difíciles de tratar, atribuyéndosele un impacto económico de aproximadamente 4.7 billones de dólares anuales en gastos extra de tratamiento y prevención en los Estados Unidos solamente (De Oliveira et al., 2020).

Debido a esta problemática, existe la necesidad la búsqueda y desarrollo de nuevos y mejores compuestos antimicrobianos que sirvan para hacer frente a la cada vez más creciente RAM. La búsqueda de nuevos antimicrobianos hoy en día abarca tanto el desarrollo de nuevas moléculas, así como la adaptación y recuperación de moléculas ya usadas. Es dentro del primer rubro donde diversas investigaciones se han centrado en el uso de sustancias

antimicrobianas producidas por los mismos microorganismos, dentro de los cuales podemos encontrar ácidos grasos, enzimas líticas, metabolitos tóxicos como el etanol y el enfoque de esta investigación, las bacteriocinas (Darbandi et al., 2021).

7.1 BACTERIOCINAS

El término bacteriocina engloba a múltiples compuestos de naturaleza peptídica producidos por diversos géneros bacterianos con el objetivo de competir frente a microorganismos competidores dentro de un nicho ecológico (Meade et al., 2020).

Estas biomoléculas son producidas tanto por bacterias Gram positivas como Gram negativas y han sido reconocidas como factores reguladores importantes de la composición de diversos microbiomas (Heilbronner et al., 2021), reconociéndose la posibilidad de que todos los microorganismos puedan llevar a cabo la producción de al menos un tipo de bacteriocina (Meade et al., 2020).

Estos compuestos, generalmente producidos a nivel ribosomal, tienen un amplio potencial tanto médico como biotecnológico, ya que exhiben buenos efectos antimicrobianos frente a microorganismos, tanto patógenos como a microorganismos conocidos como deterioradores, a niveles de concentración relativamente bajos y con características tanto farmacológicas como fisicoquímicas (Negash & Tsehai, 2020).

7.1.1 CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIOCINAS

Dentro de la clasificación que se les ha dado a estas biomoléculas, está basada de acuerdo a diversos criterios, dentro de los que se puede tener el a) microorganismo productor, b) su peso molecular, c) la presencia de aminoácidos específicos en su estructura, d) su origen genético, termo-estabilidad y e) su espectro de acción (Sharma et al., 2021).

Es importante resaltar que el sistema de clasificación de estas biomoléculas sigue en activa revisión, siendo desarrollado a la par del aumento del conocimiento de estas biomoléculas (Negash & Tsehai, 2020).

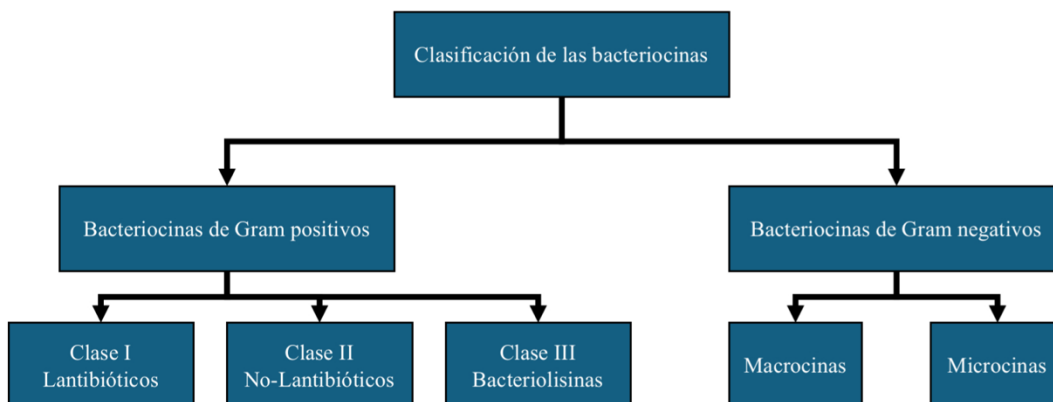


Figura 1: Clasificación de las bacteriocinas (Sharma et al., 2021).

7.1.1.1 Bacteriocinas de Gram positivos

Estas bacteriocinas provienen de géneros bacterianos como lo pueden ser de cepas de *Staphylococcus* o géneros pertenecientes a las bacterias ácido-lácticas (LAB por sus siglas en inglés) (Sharma et al., 2021). Las bacteriocinas de Gram positivos se subclasifican en tres clases:

7.1.1.1.1 Clase I (Lantibióticos)

Este tipo de bacteriocinas deben su nombre debido a la alta proporción del aminoácido *lantionina* o de sus derivados en la estructura del péptido. En general son moléculas con un peso molecular menor a 5 kDa, termoestables y que además presentan modificaciones postraduccionales (Zimina et al., 2020).

7.1.1.1.2 Clase II (No-Lantibióticos)

Las bacteriocinas de esta clase son moléculas de tamaño molecular menor a 10 kDa subdivididas en 4 subclases, sin embargo, todas las subclases comparten la característica de tener mínimas, o incluso nulas modificaciones postraducción y carecer del aminoácido lantionina en su estructura (Zimina et al., 2020).

7.1.1.1.3 Clase III

Las bacteriocinas de este grupo son naturaleza proteica con estructura similar a las bacteriolisinas de peso molecular relativamente alto, siendo mayor a los 30 kDa, el hecho de poseer estructura terciaria necesaria para llevar a cabo su actividad las convierte en termolábiles (Zimina et al., 2020).

7.1.1.2 Bacteriocinas de Gram negativos

Por otro lado, la clasificación de las bacteriocinas que provienen de aislados bacterianos Gram negativos como lo podrían ser *Escherichia coli* y otras especies de enterobacterias, queda limitada a dos grupos principales, esto debido a la poca información que se tiene hasta el momento de estas bacteriocinas (Sharma et al., 2021).

7.1.1.2.1 Colicinas

Las colicinas son biomoléculas de peso molecular que va de los 30 a los 80 kDa, en su mayoría producidas por cepas de *E. coli* que posean un plásmido denominado plásmido colicinogénico (Negash & Tsehai, 2020).

7.1.1.2.2 Microcinas

Las microcinas, como su nombre lo indica corresponden a pépticos de bajo peso molecular que puede variar de 1 a 10 kDa poseyendo a su vez una estructura molecular altamente estable, siendo resistentes a variaciones de pH, temperatura y a proteasas. Estas bacteriocinas

se encuentran codificadas en el DNA genómico bacteriano a diferencia de las colicinas (Negash & Tsehai, 2020).

7.1.2 MECANISMOS DE ACCIÓN

Por el lado de los mecanismos de acción que estas biomoléculas tienen para presentar un efecto antimicrobiano, es importante resaltar que el entendimiento de estos es relativamente escaso en comparación con la diversidad de bacteriocinas descritas hoy en día. Sin embargo, existen grandes exponentes de bacteriocinas tanto de Gram positivos como de Gram negativos cuyo mecanismo de acción es conocido.

7.1.2.1 Mecanismo de acción de los Lantibióticos.

Para el principal grupo de bacteriocinas de Gram positivos, los lantibióticos, se han descrito dos mecanismos de acción principales, los cuales pueden lisar a las células competidoras. Uno de estos inhibe de la síntesis de la pared celular y el otro genera poros. El primer mecanismo, involucra la unión de la bacteriocina a un precursor del peptidoglicano de la pared denominado lípido II, unión que le impide ser incorporado a la síntesis de la pared celular, inhibiendo el crecimiento del microorganismo afectado (Sharma et al., 2021).

Por el otro lado, otro mecanismo mediante el cual los lantibióticos pueden ejercer su acción corresponde a la formación de poros en la membrana celular de las bacterias, esto lo logran de dos maneras, ya sea formando poros transmembranales gracias a su estructura anfipática o formando interacciones electrostáticas con la membrana celular, rompiendo el equilibrio electroquímico y despolarizando la membrana, lo que provoca la formación de poros y escape de solutos del citoplasma (Sharma et al., 2021).

7.1.2.2 Mecanismo de acción de las Colicinas.

Por el lado de las bacteriocinas de bacterias Gram negativas, el grupo más estudiado corresponde a las colicinas, estas cumplen su mecanismo de acción con base en dominios presentes en su estructura, de manera similar a las toxinas generalmente producidas por estos géneros bacterianos (Marković et al., 2022).

La mayoría de las colicinas poseen tres dominios o fracciones, la primera encargada del reconocimiento del antígeno o estructura del microorganismo blanco, de manera similar a la actividad de un anticuerpo, la siguiente corresponde a la fracción de internalización o transporte que favorece la internalización de la bacteriocina al citoplasma de la bacteria afectada y finalmente una fracción efectora con diversos efectos tóxicos descritos hoy en día (Marković et al., 2022).

8 ANTECEDENTES

En trabajos previos realizados por los alumnos Pedro y Samantha (Gutiérrez Arias, 2023), se logró aislar y probar la producción de un(unos) compuesto(s) antimicrobianos por parte de tres cepas, mostrándose en la figura 3 las pruebas de inhibición realizadas, dichas cepas fueron denominadas LB1, LB2 y LB4, siendo observable en la figura 2 la presencia de las colonias en las escamas.

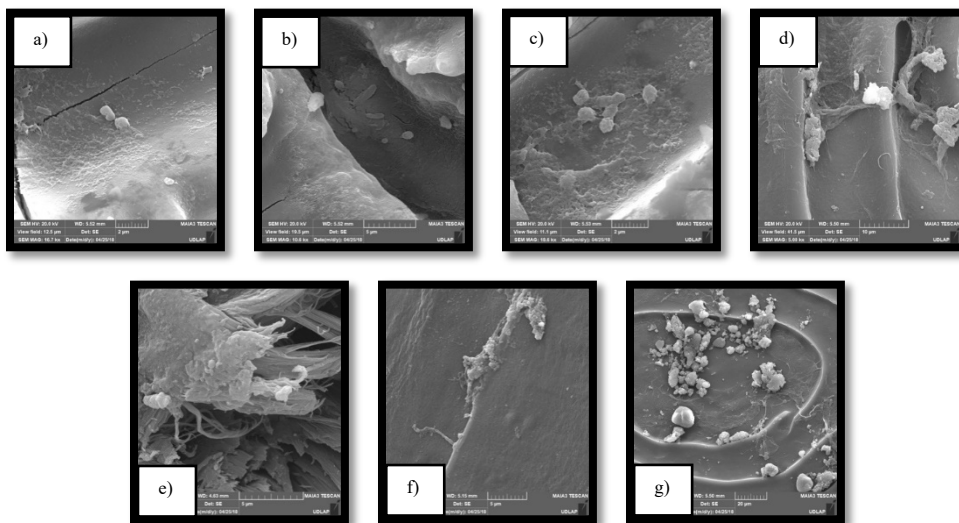


Figura 2: Micrografías donde se demuestra la presencia de algunas colonias de microorganismos en las escamas de pez *Epinephelus striatus*

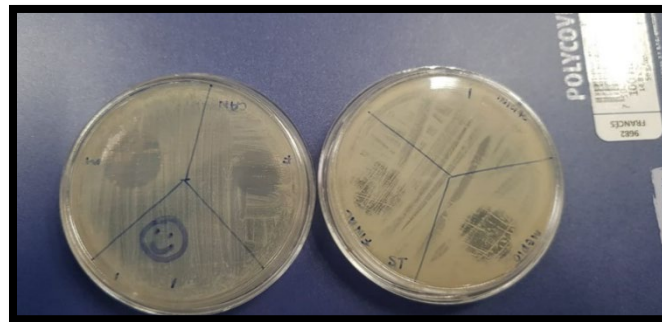


Figura 3: Pruebas antimicrobianas frente *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*.

9 JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo de investigación forma parte de los esfuerzos a nivel mundial para combatir la creciente problemática de la resistencia antimicrobiana, presentando una nueva alternativa poco convencional de posibles fuentes de compuestos antimicrobianos como lo podría ser el microbioma marino.

La relevancia de esta investigación radica en la necesidad cada día mayor del desarrollo y/o descubrimiento de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana que puedan hacer frente a la aparición cada vez más frecuente de microorganismos multi resistentes que generan patologías más complicadas y costosas de tratar, lo que genera un impacto negativo en todos los sectores de la población.

Dentro de este trabajo se analizó la posible actividad inhibitoria que pudieran tener diversos microorganismos aislados de la microbiota de las escamas del pez *E. striatus*.

10 HIPÓTESIS

Las bacterias productoras de actividad antimicrobiana recuperadas de escamas del pez marino *E. striatus* son géneros bacterianos no reportados y producen bacteriocinas.

11 OBJETIVOS

- General:
 - Identificar el género de las bacterias de las cepas aisladas del pez *E. striatus* junto con el aislamiento del(los) compuesto(s) con actividad antimicrobiana.
- Específicos:
 - Identificar el género y especie de los aislamientos bacterianos recuperados por métodos clásicos y moleculares.
 - Determinar el efecto antimicrobiano y el espectro de acción del(de los) posible(s) compuesto(s) antimicrobiano(s) producido por las bacterias aisladas.
 - Establecer una metodología eficaz para la recuperación y purificación del/los compuesto(s) de interés.

12 MATERIALES Y MÉTODOS

12.1 CEPAS RECUPERADAS DE ESCAMAS DE *EPINEPHELUS STRIATUS*

Se usaron para este proyecto tres cepas bacterianas sin identificar recuperadas de las escamas de un pez marino, las cuales se encontraban en el cepario de la universidad bajo el nombre de LB1, LB2 y LB4.

12.2 IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

12.2.1 AISLAMIENTO DE COLONIAS DE INTERÉS

El aislamiento de las colonias de interés se realizó mediante la metodología de estriado en placa, siguiendo las directrices de la *American Society for Microbiology* usando el medio de cultivo Sal y Manitol de manera empírica debido a la alta concentración de sal que este medio ofrece, buscando un ambiente propicio para el crecimiento de bacterias que originalmente habitan en microbioma marino.

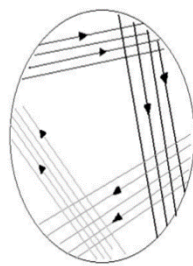


Figura 4: Esquema de realización del método de estriado en placa por la ASM.

La selección de colonias de interés fue gracias a pruebas de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus* realizadas por el estudiante Pedro Alejandro

Teodoro Quiam Hernández (2017), por lo que se recuperaron 3 cepas de interés nombradas LB1, LB2 y LB4 preliminarmente.

Las condiciones de crecimiento determinadas como adecuadas para el crecimiento de las bacterias fueron: Medio Agar Sal y Manitol adicionado con 2% de agar, debido a las leves diferencias en el tiempo de crecimiento entre las tres cepas, se incubaron los medios por un máximo de dos días a 37 °C. Posteriormente fueron almacenadas por un periodo no mayor a un mes en refrigeración a 2 °C.

Los cultivos fueron resembrados cada mes para asegurar la disponibilidad de biomasa y células viables para todas las pruebas y metodologías que se llevaron a cabo.

12.2.2 IDENTIFICACIÓN MEDIANTE MÉTODOS CONVENCIONALES

La identificación bacteriana siguió la metodología convencional basada en pilas de pruebas bioquímicas y tinciones diferenciales para buscar una aproximación al género bacteriano presente en los tres aislados con aparente actividad antimicrobiana.

Siguiendo las directrices de identificación de los criterios de Cowan y Steel (1993), se realizó inicialmente una tinción de Gram siguiendo la metodología general de tinción (disponible en la sección 17.5 de los anexos) para determinar la morfología celular y el tipo de Gram de las bacterias. Adicionalmente se realizó tinción de esporas mediante verde de malaquita y tinción de Ziehl-Neelsen para una mayor precisión en la identificación realizada.

Posteriormente se realizaron las pruebas bioquímicas de Agar TSI, Agar LIA, prueba de O/F con glucosa como sustrato, prueba de Medio MIO, prueba de catalasa y prueba de oxidasa con la finalidad de cubrir las pruebas de selección primaria descritas por Cowan y Steel (1980). Todos los medios de cultivo y pruebas bioquímicas se les realizó prueba de esterilidad incubando los medios sin inocular por un día a 37 °C.

Posteriormente a la realización de todas las pruebas y tinciones para la identificación bacteriana, se procedió a aplicar los criterios de selección y búsqueda del género bacteriano.

12.2.3 IDENTIFICACIÓN MEDIANTE MÉTODOS MOLECULARES

Para la identificación bacteriana mediante métodos moleculares, se decidió utilizar una metodología usada de manera general para el análisis rápido y preciso de microbiomas, la secuenciación de amplicón del gen del RNA 16S del ribosoma bacteriano previamente reportado (Abellan-Schneyder et al., 2021).

Para esta metodología se recurrió al uso del par de *primers* 27F(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), los cuales son ampliamente reconocidos en la bibliografía (Pálková et al., 2021) por su buena capacidad de realizar una identificación, generando un amplicón que, posterior a una secuenciación y comparación frente a bases de datos, puede llegar a una identificación bacteriana exitosa a nivel de especie.

Para poder llevar a cabo la metodología, se prepararon cultivos frescos de las tres cepas (LB1, LB2, LB4) con dos días de crecimiento en caldo nutritivo adicionado con 5% de NaCl, posterior al periodo de incubación se realizó la centrifugación a 13,000 rpm por 10 minutos, posteriormente, se descartó el sobrenadante y se conservó el paquete celular. Tras esto las células fueron lisadas y su material genético extraído mediante el método fenol-cloroformo, sin embargo, se decidió probar en paralelo la reacción de PCR con un inóculo celular directo sin lisar.

Para realizar la PCR se usó un *kit* comercial llamado OnePCR Ultra® de la marca Bio-Helix™, preparando la mezcla de reacción de acuerdo con el instructivo propio de la marca,

usando 25 μL de reactivo, con 2 μL de los *primers* y muestra de DNA, terminando con un volumen final de 25 μL usando agua estéril.

Posteriormente se amplificaron usando el termociclador de punto final Axygen-Maxygen® (BioRad™) observable en la figura 5, bajo las siguientes condiciones:

- Desnaturalización inicial: 94 °C por 3 minutos.
- Desnaturalización: 94 °C por 30 segundos.
- Alineamiento: 50 °C por 1 minuto.
- Extensión: 72 °C por 2 minutos.
- Extensión final: 72 °C por 5 minutos.
- Ciclos: 35



Figura 5: Corridas de PCR del material genético de las cepas.

Para determinar el éxito de la reacción, se procedió con una electroforesis usando cámaras de voltaje fijo marca Bluegel™, como matriz de separación se ocupó gel de agarosa al 2.5 % preparado con agarosa de la marca SIGMA, el gel se dejó correr por un aproximado de 2.5 h, el proceso se ve montado en la figura 6.



Figura 6: Cámara de electroforesis utilizada.

Posterior a comprobar los resultados satisfactorios, se purificó el amplicón mediante la adaptación del *kit* de purificación AxyPrep DNA Gel Extraction Kit de la marca Axygen, mediante la metodología de columnas de sílice. El material genético purificado fue llevado a un volumen de 30 μ L para su almacenaje y envío a secuenciación.

12.3 DETECCIÓN DE POSIBLE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

La detección de actividad antimicrobiana se realizó siguiendo las directrices dadas en el artículo de Yadav y Tiwari (2023), metodología que es tomada en varias investigaciones como la de Al-Qudah et al. (2023) y se basa el método de difusión en agar mediante varios vehículos usada para la detección de actividad antimicrobiana de bacteriocinas de diversas fuentes, metodología basada en el método de Kirby-Bauer en concordancia con las directrices de CLIA (disponible en los anexos 17.6).

La detección preliminar de actividad antimicrobiana se inició con cultivos frescos en caldo nutritivo adicionado con NaCl al 5%, incubados por dos días a 37°C, posterior a una centrifugación, se recupera el sobrenadante libre de células (CFS), el cual se procedió a liofilizar con la intención de concentrar el bioproducto a usar, posterior a esto se resuspendió el polvo obtenido en agua destilada estéril con la finalidad de obtener una concentración de

100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, posterior al cual se impregno discos de papel filtro para realizar la prueba de sensibilidad. Para el resto de las pruebas de sensibilidad, se siguió una metodología similar.

12.4 PRUEBAS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL BIOPRODUCTO

12.4.1 PRUEBAS DE PRECIPITACIÓN POR GRADIENTE DE pH.

Considerando que muchas bacteriocinas poseen aminoácidos o péptidos, estos pueden cambiar su carga neta a cero y precipitar. Para esto, se modificó el pH (rango de 3 a 7) y por simple visualización ver si producía algún cambio en opacidad indicando cambios en la solubilidad de los productos. En caso de obtener algún precipitado, se centrifuga y los precipitados se resuspendieron en 100 μL , se neutraliza el pH con HCl al 0.1N o NaOH al 0.1 N y se prueban de manera directa o usando discos de papel filtro impregnados con 10 μL de este material como se mencionó previamente, el proceso anteriormente mencionado se puede observar en la figura 7.

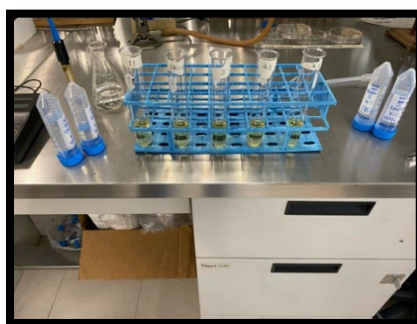


Figura 7: Prueba de precipitación mediante gradiente de pH.

12.4.2 PRUEBAS DE FRACCIONAMIENTO DE SOLVENTES.

Otra estrategia de purificación fue el usar diferentes solventes utilizando el CFS recuperado de cultivos frescos. Para esto, se realizó una mezcla con acetato de etilo con volúmenes

iguales, posterior al cual se realizaron dos lavados con agua destilada a la fracción orgánica y se almacenaron ambas fracciones en tubos Falcon a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

13 RESULTADOS

13.1 AISLAMIENTO DE COLONIAS DE INTERÉS

Se lograron tres cultivos puros provenientes de las escamas de peces con la mayor probabilidad de actividad antimicrobiana, dichos cultivos se pueden observar en la figura 8. Las cepas LB1 y LB4 se presentaron levemente mucoides con colonias aisladas de tamaño medio, opacas con una leve coloración blanca y con cierta capacidad de swarming (más observable con LB4), sin elevación y con leves diferencias entre ellas. La cepa LB2 presentó colonias pequeñas circulares con alta adherencia al agar, además de presentar el crecimiento más lento requiriendo aproximadamente 32 horas para crecer óptimamente, adicionalmente difirió del resto de cepas por su capacidad de usar el manitol y acidificar el medio de cultivo.

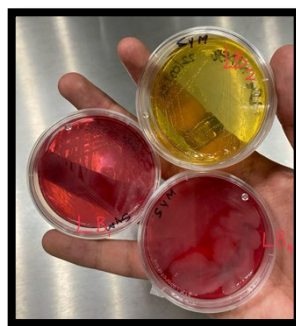


Figura 8: Medios de cultivo inoculados con aislados bacterianos de LB1, LB2 y LB4.

13.1.1 RESULTADOS DE LA IDENTIFICACIÓN MEDIANTE MÉTODOS CONVENCIONALES

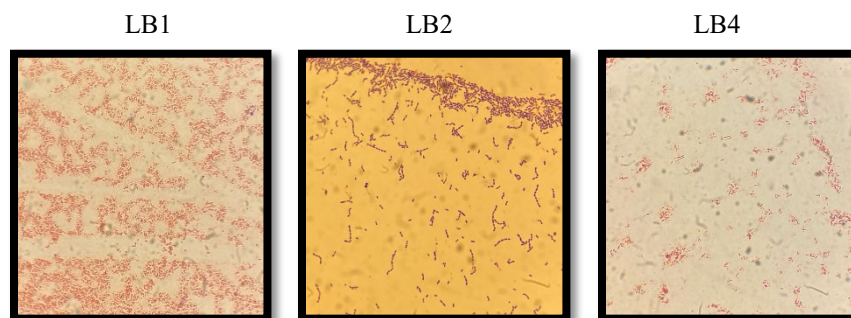


Figura 9: Microscopías de la tinción de Gram de las cepas.



Figura 10: Prueba de oxidasa en las tres cepas.



Figura 11: Prueba de catalasa en las tres cepas.

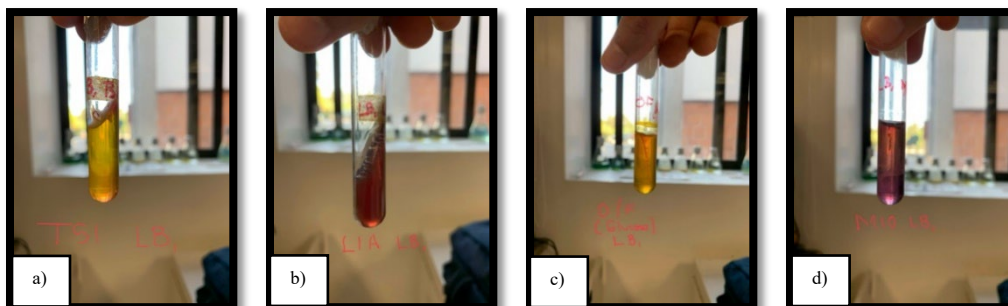


Figura 12: Realización de pila de pruebas bioquímicas de selección primaria en LB1 donde a) Agar TSI, b) Agar LIA, c) O/F (Glucosa) y d) Medio MIO.

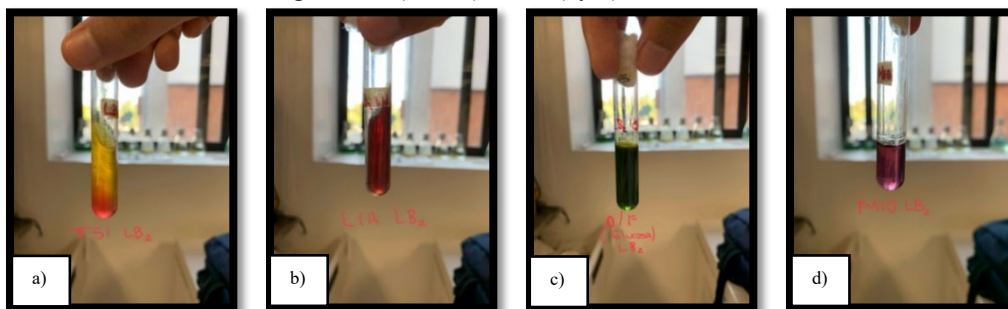


Figura 13: Realización de pila de pruebas bioquímicas de selección primaria en LB2 donde a) Agar TSI, b) Agar LIA, c) O/F (Glucosa) y d) Medio MIO.

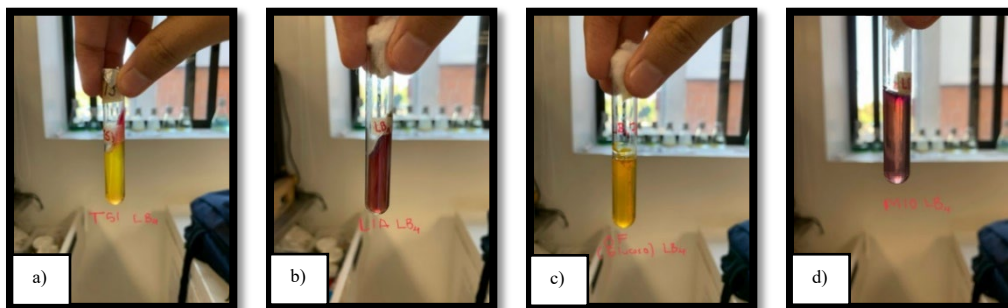


Figura 14: Realización de pila de pruebas bioquímicas de selección primaria en LB2 donde a) Agar TSI, b) Agar LIA, c) O/F (Glucosa) y d) Medio MIO.

Tabla 1: Resultados de las múltiples pruebas de identificación llevadas a cabo.

PRUEBA BIOQUÍMICA / TINCIÓN REALIZADA	BACTERIA	RESULTADO
TINCIÓN DE GRAM	LB1	Coco-bacilos Gram variable.
	LB2	Coco-bacilos Gram variable.
	LB4	Coco-bacilos Gram variable.
TINCIÓN DE ZIEHL-NEELEN	LB1	Ácido alcohol no resistentes.
	LB2	Ácido alcohol no resistentes.
	LB4	Ácido alcohol no resistentes.
AGAR TSI	LB1	A/A. Producción de SH ₂ : Negativo. Producción de gas: Negativo.
	LB2	A/B. Producción de SH ₂ : Negativo. Producción de gas: Negativo.
	LB4	B/A. Producción de SH ₂ : Negativo. Producción de gas: Negativo.
AGAR LIA	LB1	Descarboxilasa: (+) Desaminasa: (-) Producción de SH ₂ : (-)
	LB2	Descarboxilasa: (+) Desaminasa: (-) Producción de SH ₂ : (-)
	LB4	Descarboxilasa: Desaminasa: Producción de SH ₂ : (-)
MEDIO MIO	LB1	Movilidad: Negativo Indol: No probado Ornitina: Negativo
	LB2	Movilidad: Negativo Indol: No probado Ornitina: Positivo
	LB4	Movilidad: Negativo Indol: No probado Ornitina: Negativo
MEDIO O/F (GLUCOSA)	LB1	O: Positivo F: Positivo
	LB2	O: Negativo F: Negativo
	LB4	O: Positivo F: Positivo
FORMACIÓN DE ESPORAS	LB1	Negativo
	LB2	Negativo
	LB4	Negativo
PRUEBA DE CATALASA	LB1	Positivo (Fuerte)
	LB2	Positivo (Débil)
	LB4	Positivo
PRUEBA DE OXIDASA	LB1	Positivo
	LB2	Positivo
	LB4	Positivo

Los resultados descritos en la tabla 1, permiten una aproximación al género bacteriano de cada cepa, teniendo para LB1 y LB4 la posibilidad de ser *Flavobacterium/Atinobacillus*, sin

embargo, esta aproximación se hace demasiado ambigua y en el caso de LB2 la aplicación de los criterios no permitió una aproximación certera, por lo anterior se procede a la identificación mediante métodos moleculares.

13.1.2 RESULTADOS AL MOMENTO DE LA IDENTIFICACIÓN MEDIANTE MÉTODOS MOLECULARES

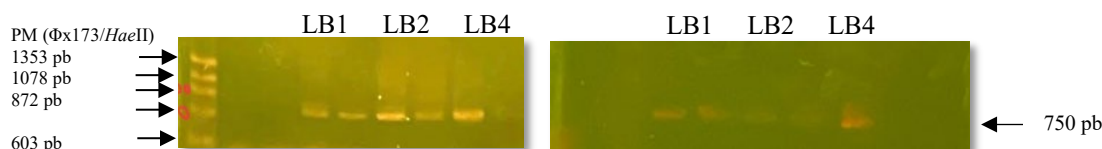


Figura 15: Geles de agarosa posterior a la electroforesis y tinción con bromuro de etidio.

Como se puede observar en la figura 15, el par de *primers* 27F/1492R resultó adecuado y amplificó de manera exitosa un fragmento de DNA de aproximadamente 750 pb, lográndose la extracción tanto con un protocolo de lisis y extracción de DNA como con un protocolo usando directamente las células sin necesidad de lisarlas para LB1 y LB2, pero para LB4 si fue necesario la lisis celular y extracción previa para poder observar un amplicón, este amplicón fue posteriormente purificado y conservado bajo congelación a -20°C hasta su envío para secuenciación.

13.2 PRUEBAS DE EFECTO ANTIMICROBIANO Y ESPECTRO DE ACTIVIDAD.

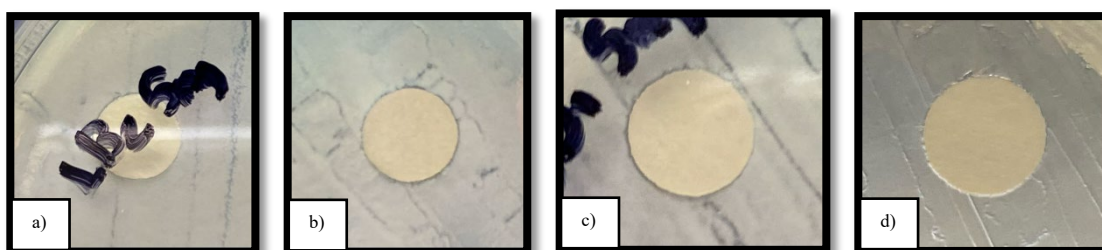


Figura 16: Pruebas de efecto antimicrobiano preliminares frente a: a) *Candida albicans*, b) *Enterobacter cloacae*, c) *Salmonella enterica*, d) *Pseudomonas aureginosa*.

Como se observa en la figura 16, en las pruebas preliminares se observa una leve actividad inhibitoria de los extractos frente algunos microorganismos de interés, estos resultados se encuentran descritos en la tabla 2, es importante resaltar que ni uno de los halos de inhibición formados fue suficientemente extenso (diámetro mínimo) para poder determinar ni un resultado como “sensible” en base a criterios del CLSI.

Tabla 2 : Resultados de los antibiogramas preliminares.

Microorganismo:	Extracto:	Resultado:
<i>E. coli</i>	LB1	Negativo
	LB2	Negativo
	LB4	Negativo
<i>Candida albicans</i>	LB1	Negativo
	LB2	Positivo
	LB4	Positivo
<i>Enterobacter cloachae</i>	LB1	Negativo
	LB2	Positivo
	LB4	Positivo
<i>S. aureus</i>	LB1	Negativo
	LB2	Negativo
	LB4	Negativo
<i>Salmonella enterica</i>	LB1	Positivo
	LB2	Positivo
	LB4	Negativo
<i>B. subtilis</i>	LB1	Negativo
	LB2	Negativo
	LB4	Negativo
<i>Pseudomonas aureginosa</i>	LB1	Negativo
	LB2	Positivo
	LB4	Negativo
<i>Klebsiella pneumonie</i>	LB1	Negativo
	LB2	Positivo
	LB4	Positivo
<i>Salmonella typhimurium</i>	LB1	Negativo
	LB2	Negativo
	LB4	Negativo

13.3 PURIFICACIÓN DEL BIOPRODUCTO

Se realizaron pruebas de inhibición usando la fracción acuosa recuperada de la prueba de fraccionamiento de solventes, resultado en la ausencia de efecto antimicrobiano frente a los microorganismos probados. La fase orgánica de la prueba no fue puesta a prueba.

Por el lado de la prueba de precipitación mediante gradiente de pH, no se logró observar la formación de un precipitado en el rango de pH probado. Tampoco se procedió a centrifugar las muestras debido a una falta visual de la formación de un precipitado.

14 DISCUSIÓN

De acuerdo con lo observado durante el proceso de aislamiento e identificación bacteriana, el cual continua en curso a la fecha de redacción del trabajo presentado, existe la problemática de la poca certeza que brindan las pruebas de selección primaria aplicadas a las tres cepas (LB1, LB2 y LB4), es por esto que se abrió la duda acerca de la posibilidad de estar trabajando con una o varias especies bacterianas no identificadas hasta el punto de realización de los experimentos.

Por ende, se llevó a cabo la amplificación del gen ribosomal 16S, con la finalidad de en un futuro realizar la secuenciación de este material genético para poder realizar una identificación mediante métodos moleculares, esta amplificación se llevó a cabo haciendo uso de un par de *primers* de uso general (27F/1492R), cuya capacidad de identificación bacteriana se encuentra reportada en la literatura, siendo usados inclusive para la determinación de la composición de microbiomas.

Posterior a la reacción de PCR y a la electroforesis del material recuperado se determinó que los *primers* 27F/1492R demuestran ser adecuados para la amplificación del DNA ribosomal de las tres cepas de trabajo, cuestión que abrió la posibilidad de en un futuro realizar la secuenciación de dicho material amplificado con la finalidad de dilucidar la identidad de las cepas mediante la comparación con bases de datos y algoritmos como el BLAST, para así conocer el género bacteriano al que pertenecen las bacterias, o en su defecto, corroborar la posibilidad de que sean pertenecientes a un género bacteriano no descrito.

Por otro lado, los resultados obtenidos en la sección de las pruebas antimicrobianas permitió corroborar que las cepas bacterianas trabajadas poseen actividad antimicrobiana, sin

embargo, esta actividad, bajo las condiciones de cultivo aplicadas, fue considerablemente más baja que aquellas reportadas para otras cepas productoras de fuentes similares (microbioma marino), e inclusive más baja a la reportada por los tesisistas que previamente aislaron las cepas de trabajo. Esta baja actividad pudiera deberse a múltiples factores, entre los que se pudiera encontrar la baja concentración a la que se produce la bacteriocina por las cepas productoras.

Esta baja producción pudiera responder a las condiciones bajo las cuales las cepas fueron incubadas, ya que los cultivos realizados no cumplen las condiciones reportadas por Maldonado-Barragán & West en el año 2019 como necesarias para la inducción de producción de bacteriocinas, la cual se da mediante un sistema de *Quorum sensing* en el cual se toma en cuenta la cantidad de nutrientes, la presencia de microorganismos competidores y la cantidad de clones de la cepa productora. Por ende, una posibilidad para mejorar la actividad antimicrobiana de los CFS de LB1, LB2 y LB4 pudiera ser el uso de medios de cultivo con menor cantidad de nutrientes, así como el uso de cultivos mixtos para inducir a una producción más alta de bacteriocinas.

Sin embargo también debe de considerarse que estas condiciones inductoras para producción de bacteriocinas reportadas, son adecuada para géneros bacterianos ya conocidos hoy en día, por lo que, en el caso de que las cepas LB1, LB2 y LB4 pertenezcan a un genero desconocido, las condiciones bajo las cuales se ven inducidas a la producción de bacteriocinas podrían ser enteramente diferentes, hecho que propicia a la investigación futura de las condiciones óptimas para que estas cepas puedan producir el producto antimicrobiano en mayor concentración.

En cuestión de las metodologías de purificación y concentración, estas fueron poco fructíferas, si bien esto igualmente pudiera tener varios factores, una posibilidad alta radica igualmente a la baja concentración inicial de estos componentes, los intentos de concentración del bioproducto mediante liofilización se vieron complicados debido a la alta concentración de sales en el medio, las cuales sobrepasaban a la bacteriocina en concentración por lo que el polvo resultante de esta metodología poseía mayor cantidad de sales que de producto de interés, este factor es relevante ya que se tiene bien reportado por CLSI que el crecimiento de algunos microorganismos se ve inhibido altas concentraciones de sales, sin embargo en este procedimiento se logró comprobar la ausencia de actividad antimicrobiana de NaCl a la concentración del medio gracias al uso de controles.

En cuanto al fraccionamiento de solventes, si bien la metodología no se pudo llevar a cabo de manera completa debido a la pérdida de la fracción orgánica, la pérdida de actividad antimicrobiana que presento la remanente fracción acuosa dictamina que el bioproducto de interés pudiera ser purificado de los solutos hidrofílicos de los CFS mediante el uso de un solvente orgánico como el acetato de etileno, esta afinidad por el acetato es un factor que dictamina que el bioproducto antimicrobiano pudiera pertenecer precisamente a las bacteriocinas, por lo que con esta prueba se logró una aproximación a la estructura de(del) bioproducto(s).

15 CONCLUSIONES

Los hallazgos logrados en la etapa experimental de este proyecto de investigación no logran satisfacer los objetivos de investigación planteados, si bien hasta la fecha de redacción, la identificación bacteriana mediante métodos moleculares se encuentra en proceso, la utilización de métodos moleculares confirmó la presencia de géneros bacterianos poco convencionales en las escamas del pez *E. striatus*.

Asimismo, se confirmó que las cepas LB1, LB2 y LB4 aisladas de la fuente descrita, poseen cierta actividad antimicrobiana frente a microorganismos de interés médico, incluyendo algunas especies relacionadas a aquellas del grupo ESKAPE, pero, esta actividad antimicrobiana fue baja, esto inclusive pasando intentos de concentración mediante liofilización y pese a estarse reportada una actividad mayor previamente.

Sin embargo, aún existen metodologías que pudieran mejorar la actividad antimicrobiana, siendo interesantes propuestas la utilización de factores de *quorum sensing* para la inducción de producción de bacteriocinas, adicionalmente en los últimos años se han propuesto en investigaciones como las propuestas por Zgheib et al. (2020) de asociación de bacteriocinas con otra sustancia bioactiva y antimicrobianas en búsqueda de efectos sinérgicos. Por lo que estas asociaciones pudieran ser provechosa con los compuestos producidos por las bacterias LB1, LB2 y LB4.

Finalmente, el ultimo objetivo propuesto fue cumplido parcialmente, debido a los hallazgos de la perdida de actividad antimicrobiana de la fracción acuosa del CFS de las tres cepas posterior a una prueba de fraccionamiento de solventes, mediante acetato de etilo, lo que confirma que este método de extracción puede ser eficaz a un futuro.

Considerando todo lo expuesto, no es posible corroborar la tesis planteada inicialmente, esto debido a la falta de identificación final de las bacterias, las cuales, si bien la imposibilidad de identificación mediante los métodos convencionales indica que se traten de un género bacteriano novedoso, esto solo se podrá corroborar una vez se secuencie el material genético recuperado.

Por el otro lado, a día de hoy no es posible asegurar que las bacterias de trabajo produzcan concretamente bacteriocinas, esto debido a la falta de precipitación por gradiente de pH, sin embargo la posibilidad de separación mediante solventes orgánicos pudiera ser un factor indicativo de la identidad del(de los) compuestos producidos.

16 BIBLIOGRAFÍA

- Abellan-Schneyder, I., Machado, M. S., Reitmeier, S., Sommer, A., Sewald, Z., Baumbach, J., List, M., & Neuhaus, K. (2021). Primer, Pipelines, Parameters: Issues in 16S rRNA Gene Sequencing. *MSphere*, 6(1). <https://doi.org/10.1128/msphere.01202-20>
- Ihaheen, M. A., Muzaheed, Fatani, A. J., Alosaimi, M. T., Mansy, W., George, M. V., Acharya, S., Rathod, S., Divakar, D. D., Jhugroo, C., Khan, A. A., Shaik, J. P., & Jhugroo, P. (2020). Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *Disease-a-month*, 66(6), 100971. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2020.100971>
- Al-Qudah, M. M. A., Rahahleh, R. J., Alraei, W. Y., Aljaraedah, T. Y., Abu-Harirah, H. A., Amawi, K. F., & El-Qudah, J. M. F. (2023). Evaluation of the Antimicrobial Activity of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria Isolated from Human Intestine against Pathogenic Microorganisms. *Tropical Journal Of Natural Product Research*, 7(6). <https://doi.org/10.26538/tjnpr/v7i6.18>
- Christaki, E., Marcou, M., & Tofarides, A. (2020). Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *Journal Of Molecular Evolution*, 88(1), 26-40. <https://doi.org/10.1007/s00239-019-09914-3>
- Cowan, S. T. (1993). Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. En *Cambridge University Press eBooks*. <https://doi.org/10.1017/cbo9780511527104>
- Darbandi, A., Asadi, A., Ari, M. M., Ohadi, E., Talebi, M., Zadeh, M. H., Emamie, A. D., Ghanavati, R., & Kakanj, M. (2021). Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials. *Journal Of Clinical Laboratory Analysis*, 36(1). <https://doi.org/10.1002/jcla.24093>
- De Oliveira, D. M. P., Forde, B. M., Kidd, T. J., Harris, P. N. A., Schembri, M. A., Beatson, S. A., Paterson, D. L., & Walker, M. J. (2020). Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(3). <https://doi.org/10.1128/cmr.00181-19>

- Gutiérrez Arias, S. G. (2023). *Aislamiento de un compuesto antimicrobiano de una bacteria aislada de muestras acuáticas* (L. V. Pla, Ed.) [Tesis de licenciatura]. Universidad de las Americas Puebla.
- Heilbronner, S., Krismer, B., Brötz-Oesterhelt, H., & Peschel, A. (2021). The microbiome-shaping roles of bacteriocins. *Nature Reviews Microbiology*, *19*(11), 726-739. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00569-w>
- Marković, K. G., Grujović, M., Koraćević, M. G., Nikodijević, D. D., Milutinović, M., Semedo-Lemsaddek, T., & Djilas, M. (2022). Colicins and Microcins Produced by Enterobacteriaceae: Characterization, Mode of Action, and Putative Applications. *International Journal Of Environmental Research And Public Health*, *19*(18), 11825. <https://doi.org/10.3390/ijerph191811825>
- Meade, E., Slattery, M. A., & Garvey, M. (2020). Bacteriocins, Potent Antimicrobial Peptides and the Fight against Multi Drug Resistant Species: Resistance Is Futile? *Antibiotics (Basel)*, *9*(1), 32. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9010032>
- Negash, A. W., & Tsehai, B. A. (2020). Current Applications of Bacteriocin. *International Journal Of Microbiology*, *2020*, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2020/4374891>
- Pálková, L., Tomova, A., Repiská, G., Babinská, K., Bokor, B., Mikula, I., Minárik, G., Ostatníková, D., & Šoltýs, K. (2021). Evaluation of 16S rRNA primer sets for characterisation of microbiota in paediatric patients with autism spectrum disorder. *Scientific Reports*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86378-w>
- Salam, A., Al-Amin, M., Salam, M. T., Pawar, J. S., Akhter, N., Rabaan, A. A., & Alqumber, M. A. (2023). Antimicrobial Resistance: A Growing Serious Threat for Global Public Health. *Healthcare (Basel)*, *11*(13), 1946. <https://doi.org/10.3390/healthcare11131946>
- Sharma, K., Kaur, S., Singh, R., & Kumar, N. (2021). CLASSIFICATION AND MECHANISM OF BACTERIOCIN INDUCED CELL DEATH: a REVIEW. *Journal Of Microbiology, Biotechnology And Food Sciences*, *11*(3), e3733. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.3733>

- Tang, K., Millar, B. C., & Moore, J. E. (2023). Antimicrobial resistance (AMR). *British Journal Of Biomedical Science*, 80. <https://doi.org/10.3389/bjbs.2023.11387>
- Walsh, T. R., Gales, A. C., Laxminarayan, R., & Dodd, P. C. (2023). Antimicrobial Resistance: Addressing a Global Threat to Humanity. *PLoS Medicine*, 20(7), e1004264. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1004264>
- World Health Organization: WHO. (2023, 21 noviembre). *Antimicrobial resistance*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Yadav, M., & Tiwari, S. K. (2023). Methods for Determination of Antimicrobial Activity of Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Microbiology*, 92(6), 745-765. <https://doi.org/10.1134/s0026261723600520>
- Zimina, M., Babich, O., Prosekov, A., Сухих, С., Иванова, С., Shevchenko, M., & Носкова, С. (2020). Overview of Global Trends in Classification, Methods of Preparation and Application of Bacteriocins. *Antibiotics (Basel)*, 9(9), 553. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9090553>

17 APÉNDICES

17.1 DIRECTRICES DE LA AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY PARA EL MÉTODO DE ESTRÍA EN PLACA.

<https://asm.org/ASM/media/Protocol-Images/The-Streak-Plate-Protocol.pdf?ext=.pdf>

17.2 INSERTO ONEPCR ULTRA.

El inserto original del reactivo se encuentra en la siguiente pagina:

<https://bio-helix.com/products/224>

17.3 INSERTO AXYPREP DNA GEL EXTRACTION KIT.

El inserto original del kit de extracción se encuentra en:

<https://fnkprddata.blob.core.windows.net/domestic/data/datasheet/AXB/AP-GX-4.pdf>

17.4 SECUENCIA *PRIMERS* 27F Y 1492R (PÁLKOVÁ ET AL., 2021).

- 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')
- 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')

17.5 METODOLOGÍA DE LA TINCIÓN DE GRAM SEGÚN ASM.

<https://asm.org/getattachment/5c95a063-326b-4b2f-98ce-001de9a5ece3/gram-stain-protocol-2886.pdf>

17.6 CRITERIOS CLSI.

Los insertos y libretos donde se describen los criterios CLSI para pruebas antimicrobianas se pueden adquirir de la siguiente página:

<https://clsi.org/meetings/susceptibility-testing-subcommittees/clsi-and-ast/>

Teniendo una versión de muestra en:

https://clsi.org/media/2663/m100ed29_sample.pdf