

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE BACTERIAS TERMÓFILAS
AISLADAS DE AGUAS TERMALES DEL VOLCÁN CHILES, NARIÑO-COLOMBIA
SOBRE LAS BACTERIAS PATÓGENAS *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*

MARIO ANDRES PANTOJA ESPAÑA

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
SAN JUAN DE PASTO

2019

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE BACTERIAS TERMÓFILAS
AISLADAS DE AGUAS TERMALES DEL VOLCÁN CHILES, NARIÑO-COLOMBIA
SOBRE LAS BACTERIAS PATÓGENAS *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*

MARIO ANDRES PANTOJA ESPAÑA

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar por el título de Biólogo

Asesor:

Edith Mariela Burbano Rosero

Doctora en Ciencias

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
SAN JUAN DE PASTO

2019

NOTA DE RESPONSABILIDAD

“Las ideas y conclusiones aportadas en este trabajo de grado son responsabilidades exclusivas de los autores”

Artículo primero del acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966, emanado por el

Honorable Consejo Superior de la Universidad de Nariño.

NOTA DE ACEPTACIÓN

DOLLY MARGOT REVELO ROMO
JURADO

PABLO FERNADEZ IZQUIERDO
JURADO

EDITH MARIELA BURBANO ROSERO
ASESOR

San Juan de Pasto, 6 de septiembre de 2019

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por todo su apoyo y comprensión se hizo posible la realización de esta etapa tan importante en mi vida.

A mi asesora Mariela Burbano, por todo su apoyo y confianza en mi proyecto. Su capacidad para guiar mis ideas fue imprescindible en mi formación como investigador y en la culminación de este trabajo.

Al grupo de investigación GIBIMMA, por toda la ayuda y los consejos realizados durante todo el proceso del proyecto.

A mis Jurados, Dolly Revelo y Pablo Fernández, por sus valiosos aportes en el desarrollo de este trabajo.

A la Vicerrectoría de Investigaciones, Postgrados y Relaciones Internacionales por la financiación de este trabajo.

DEDICATORIA

Mi trabajo de grado lo dedico con todo mi amor a mi madre, la persona más especial en mi vida, por su sacrificio y esfuerzo, por su apoyo incondicional en todo momento, por ser mi fuerza y mi motivación para alcanzar todas mi metas.

RESUMEN

Los microorganismos extremófilos son aquellos que se desarrollan en ambientes que antiguamente se consideraban hostiles para permitir la supervivencia de organismos vivos. Por esta razón se clasifican con base en la condición física o química extrema del ambiente en el que se desarrollan, así, los termófilos son aquellos microorganismos cuya temperatura óptima de crecimiento supera los 45 °C. Actualmente, los termofilos constituyen una de las mejores fuentes de biomoléculas termoestables con capacidad biocatalizadora, capaces de soportar condiciones drásticas de proceso y cuyo uso comercial, clínico e industrial puede conducir a un gran desarrollo biotecnológico. Dentro de la infinidad de moléculas producidas por microorganismos, el descubrimiento de sustancias con características antimicrobianas ha sido muy importante para el desarrollo de muchos productos farmacéuticos y terapéuticos, es así como aproximadamente 80 % de las drogas disponibles en el mercado son derivadas de microorganismos.

En múltiples investigaciones, las bacterias patógenas han demostrado que tienen la capacidad para desarrollar y propagar la resistencia a los antibióticos rápidamente, representando una amenaza que deteriora la eficiencia de los antibióticos disponibles en el mercado. Debido a esto se hace necesario la búsqueda de nuevos agentes antibacterianos tales como los péptidos antimicrobianos con modos de acción diferentes a los antibióticos tradicionales. En este sentido, a través del trabajo de investigación se buscó evaluar la actividad inhibitoria de las bacterias termófilas aisladas de aguas termales del volcán Chiles, Nariño sobre las bacterias patógenas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

A través del ensayo *Agar Deferred spot* fue posible evaluar la capacidad inhibitoria de los aislados termófilos y se seleccionaron 2, 303-1 A y LB 102-1, los cuales inhibieron el crecimiento de la cepa patógena resistente *S. aureus*. Se comprobó la naturaleza proteica de las sustancias antimicrobianas y posteriormente fue realizado un proceso de extracción de péptidos con cloroformo, la corrida electroforética fue realizada en gel SDS-poliacrilamida para complementar un análisis parcial de los péptidos antimicrobianos. A través de este estudio fue posible descubrir una importante diversidad de microorganismos que contribuyen al conocimiento de los ambientes termales en el departamento de Nariño. Los aislados termófilos, *Bacillus licheniformis LB1021* y *Bacillus aerius 3031A* parecen ser una fuente de moléculas antimicrobianas capaces de inhibir el crecimiento de cepas patógenas resistentes como *S. aureus*. Adicional a los ensayos abordados en este estudio, son necesarios análisis complementarios que permitan concluir que los péptidos antimicrobianos observados a través de SDS-PAGE son bacteriocinas termoestables de clase II.

Palabras clave: Inhibición, bacterias termófilas, actividad inhibitoria, halos de inhibición, bacteriocinas, fuente termal.

ABSTRACT

Extremophilic microorganisms are those that develop in environments that were once considered hostile to allow the survival of living organisms. For this reason they are classified based on the extreme physical or chemical condition of the environment in which they develop, thus, thermophiles are those microorganisms whose optimum growth temperature exceeds 45 ° C. Currently, thermophiles are one of the best sources of thermostable biomolecules with biocatalytic capacity, capable of withstanding drastic process conditions and whose commercial, clinical and industrial use can lead to great biotechnological development. Within the infinity of molecules produced by microorganisms, the discovery of substances with antimicrobial characteristics has been very important for the development of many pharmaceutical and therapeutic products, which is how approximately 80% of the drugs available in the market are derived from microorganisms.

In multiple investigations, pathogenic bacteria have shown that they have the ability to develop and spread antibiotic resistance rapidly, representing a threat that impairs the efficiency of commercially available antibiotics. Because of this, it is necessary to search for new antibacterial agents such as antimicrobial peptides with different modes of action than traditional antibiotics. In this sense, through the research work we sought to evaluate the inhibitory activity of thermophilic bacteria isolated from hot springs of the Chiles, Nariño volcano on the pathogenic bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

Through the Agar Deferred spot test it was possible to evaluate the inhibitory capacity of thermophilic isolates and 2, 303-1 A and LB 102-1 were selected, which inhibited the growth of the resistant pathogen strain *S. aureus*. The protein nature of the antimicrobial substances

was checked and subsequently a peptide extraction process with chloroform was performed, the electrophoretic run was performed on SDS-polyacrylamide gel to complement a partial analysis of the antimicrobial peptides. Through this study it was possible to discover an important diversity of microorganisms that contribute to the knowledge of thermal environments in the department of Nariño. Thermophilic isolates, *Bacillus licheniformis* LB1021 and *Bacillus aerius* 3031A appear to be a source of antimicrobial molecules capable of inhibiting the growth of resistant pathogenic strains such as *S. aureus*. In addition to the trials addressed in this study, complementary analyzes are necessary to conclude that the antimicrobial peptides observed through SDS-PAGE are thermostable class II bacteriocins.

TABLA DE CONTENIDO

	Pag.
1. Introducción	13
2. Planteamiento del problema	14
3. Justificación	16
4. Marco teórico	18
4.1 Microorganismos termófilos	18
4.1.1 Diversidad	18
4.1.2 Hábitats	19
4.1.3 Adaptaciones	20
4.2 Compuestos microbianos	21
4.2.1 Bacteriocinas	23
4.2.2 Tipos de bacteriocinas y modos de acción	25
4.2.3 Métodos de extracción	26
4.2.4 Aspectos genéticos	27
4.3 Identificación de proteínas asociada a la actividad microbiana	28
4.4 Resistencia bacteriana	29
4.5 Actividad enzimática	30
4.5.1 Proteasas	30
4.5.2 Lipasas	31
4.5.3 Quitinasas	31
4.5.4 Amilasas	32
4.5.5 Celulasas	32
5. Marco de antecedentes	34
6. Objetivos	36
6.1 Objetivo general	36
6.2 Objetivos específicos	36
7. Materiales y métodos	37
7.1 Área de estudio	37
7.2 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	38
7.3 Caracterización morfológica y molecular	38
7.3.1 Extracción de ADN	39
7.3.2 Amplificación de la subunidad ribosomal 16S rRNA	39

7.4	Detección de la actividad inhibitoria	40
7.4.1	Método Spot en capa	40
7.4.2	Método de siembra masiva	41
7.4.3	Determinación de concentración inhibitoria	41
7.4.4	Técnica de difusión en pozo	42
7.4.5	<i>Agar Deferred Spot</i>	42
7.4.6	Confirmación de la naturaleza proteica	42
7.4.7	Extracción de bacteriocinas	43
7.4.8	SDS-PAGE	43
7.5	Detección de la actividad celulolítica	44
7.6	Detección de la actividad lipolítica	44
8.	Resultados	45
8.1	Aislamiento e identificación de los aislados bacterianos	45
8.2	Detección de la actividad antimicrobiana	46
8.3	Actividad enzimática	53
9.	Discusión	54
10.	Conclusiones	60
11.	Recomendaciones	61
12.	Bibliografía	62
13.	Anexos	72
13.1	Anexo A. Características morfológicas	72
13.2	Anexo B. Pruebas bioquímicas	73
13.3	Anexo C. Dendrograma de pruebas bioquímicas	73
13.4	Anexo D. Halos de hidrólisis de celulosa	74
13.5	Anexo E. Perfil de resistencia de <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	74

Lista de figuras

Figura 1. Figura 1. Árbol filogenético de los aislados termófilos, construido en el programa MEGA X 10.1, tomando los criterios *Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean* (UPGMA).

Figura 2. Método de siembra masiva.

Figura 3. Determinación de la concentración inhibitoria del sobrenadante.

Figura 4. Técnica de difusión en pozo.

Figura 5. Método *Agar-Deferred Spot*

Figura 6. Tratamiento con proteinasa K para confirmación de la naturaleza proteica de la sustancia inhibitoria.

Figura 7. Halos de inhibición producidos por los extractos de bacteriocinas de los aislados termófilos 303-1 A y LB 102-1.

Figura 8. Electroforesis vertical de proteínas. Gel SDS- poliacrilamida.

Figura 9. Halos de hidrólisis de celulosa con aislados termófilos.

Lista de tablas

Tabla 1. Grupos más importantes que presentan microorganismos procariotas termófilos e hipertermófilos.

Tabla 2. Gama de antibióticos para los cuales se reporta resistencia en Colombia.

Tabla 3. Identificación de los aislados termofilos por comparación con RDP y GenBank.

1. Introducción

Debido a la gran diversidad de nichos en los cuales se pueden encontrar los microorganismos, estos han sido objeto de innumerables estudios por las nuevas características y uso potencial que pueden poseer. Los extremófilos constituyen la opción más prometedora como fuente de biomoléculas con capacidad biocatalizadora, capaces de soportar condiciones drásticas de proceso y cuyo uso comercial, clínico e industrial puede conducir a un gran desarrollo biotecnológico. Las enzimas que han sido aisladas de microorganismos termófilos han sido objeto de diversas investigaciones y aplicaciones, una de ellas es la búsqueda de moléculas con la capacidad de controlar microorganismos patógenos asociados al deterioro de los alimentos y que además son potenciales causantes de infecciones, con un enfoque hacia la industria farmacéutica y alimentaria. Adicionalmente se presenta un gran interés en la búsqueda de termoenzimas con actividad celulolítica, lipolítica, proteolítica, amilolítica y quitinolítica debido a las innumerables ventajas que presentan con respecto a las enzimas mesófilas (Brock, 2012; Oliart et al., 2016; Alba Cuecas, 2017; Madigan et al., 2017).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el informe sobre resistencia a los antibióticos advierte sobre la grave amenaza que representa para la salud las altas tasas de resistencia que están adquiriendo las bacterias ante los antibióticos utilizados como “último recurso” en el tratamiento de infecciones. Las bacterias han demostrado que tienen la capacidad para desarrollar y propagar la resistencia a los antibióticos rápidamente, por lo cual se hace necesario la búsqueda de nuevos agentes antibacterianos tales como las bacteriocinas con modos de acción diferentes a los antibióticos tradicionales.

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos sintetizados ribosómicamente que presentan un potencial uso en el control de patógenos debido a que son nuevas alternativas de antibióticos en el tratamiento de infecciones, sumado a esto son compuestos que presentan gran diversidad de estructuras, funcionalidades, espectros antimicrobianos, modos de acción y también multiplicidad en términos de fuentes, entre estos, tenemos a los microorganismos termófilos cuyas bacteriocinas han sido capaces de inhibir un amplio rango de microorganismos patógenos de importancia clínica (Martirani et al., 2002; Parisien, 2007; Pokusaeva et al., 2009; Edalatian et al., 2012; Alkhalili et al., 2016; Vasilchenko & Valyshev, 2019). Por esta razón, a través del trabajo de investigación se pretende evaluar microorganismos termófilos que presenten alternativas de agentes antimicrobianos y enzimas como las celulasas con uso potencial a nivel industrial y sobre todo clínico contra bacterias que se han convertido en un problema de salud pública.

2. Planteamiento del problema

En la actualidad sustancias antimicrobianas alternativas cobran importancia ya que por más de medio siglo la humanidad ha dependido principalmente de los antibióticos para tratar enfermedades infecciosas contra bacterias patógenas, con lo cual se han salvado millones de vidas, sin embargo, la resistencia bacteriana se acrecienta cada vez más como una amenaza que deteriora la eficiencia de los antibióticos disponibles en el mercado. Las bacterias han demostrado que tienen la capacidad para desarrollar y propagar la resistencia a los antibióticos rápidamente, por lo cual se hace necesario la búsqueda de nuevos agentes antibacterianos tales como las bacteriocinas con modos de acción diferentes a los antibióticos tradicionales (Parisien et al., 2007; Zhou & Zhang, 2018).

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos sintetizados ribosómicamente que presentan un potencial uso en el control de patógenos y bacterias contaminantes asociados a los alimentos

y además son nuevas alternativas de antibióticos en el tratamiento de infecciones (Martirani et al., 2002; Pokusaeva et al., 2009; Edalatian et al., 2012; Kumariya et al., 2019). Según Parisien (2007) 99% de todas las bacterias pueden producir al menos una bacteriocina, sumado a esto son compuestos que presentan gran diversidad de estructuras, funcionalidades, espectros antimicrobianos, modos de acción y también diversidad en términos de fuentes.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el primer informe basado en datos de 114 países sobre resistencia a los antibióticos, advierte sobre la grave amenaza que representa para la salud las altas tasas de resistencia que están adquiriendo las bacterias ante los antibióticos utilizados como “último recurso” en el tratamiento de infecciones comunes como la septicemia, diarrea, neumonía, infecciones urinarias o gonorrea. Por otra parte, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) reporta para las Américas que las bacterias con mayor porcentaje de resistencia son *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* que en algunos entornos 90% de las infecciones son por cepas resistentes a antibióticos comunes. La OMS (2018) también llama la atención de la necesidad de desarrollar nuevos productos diagnósticos, antibióticos y otros instrumentos que permitan a los profesionales sanitarios tener ventaja ante la resistencia emergente.

Los estudios relacionados con la búsqueda de fuentes de compuestos con actividad antimicrobiana en ambientes termales son escasos, lo cual representa pocos esfuerzos para contrarrestar el problema de la resistencia antimicrobiana, por otro lado, los ambientes termales representan nuevos nichos ecológicos para la búsqueda de microorganismos de interés, además, el departamento de Nariño se caracteriza por su geografía volcánica con diversas fuentes termales asociadas. Por lo tanto, el trabajo de investigación pretende buscar bacterias productoras de péptidos antimicrobianos y enzimas termoestables en ambientes que son poco estudiados para contribuir al conocimiento de estos y además para hacer frente ante la creciente problemática de resistencia bacteriana en el mundo.

Con base en los argumentos expuestos se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es la actividad inhibitoria de las bacterias termófilas aisladas de una fuente termal del volcán Chiles, Nariño sobre las bacterias patógenas *E.coli* y *S. aureus*?

3. Justificación

Los microorganismos extremófilos presentan un gran interés científico, desde un punto de vista evolutivo se propone que las primeras formas de vida fueron termófilas y frecuentemente se encuentran nuevos taxones. Adicionalmente, presentan interés desde un punto de vista bioquímico debido a las altas temperaturas que tienen que soportar sus biomoléculas, algunas tan importantes en procesos industriales y biotecnológicos como las enzimas o sus compuestos antimicrobianos, los cuales han sido capaces de inhibir un amplio rango de microorganismos patógenos de importancia clínica; todas estas características suscitan gran interés hacia el estudio de estos microorganismos (Ferrerías, 2011; Alba Cuecas, 2017).

Los péptidos antimicrobianos (AMP) representan nuevas alternativas de antibióticos que despiertan gran interés debido a su efectividad, seguridad y enorme diversidad; aquellos que son producidos por bacterias se denominan bacteriocinas, dentro de estas encontramos las bacteriocinas clase II o los lantibióticos que son las más importantes producidas por bacterias Gram positivas cuya característica principal son los aminoácidos poco comunes como la lantionina. Estos péptidos actúan bloqueando la síntesis de la pared celular en bacterias sensibles o formando poros en la membrana, la nisina es el AMP más importante comercialmente, aunque existen numerosos estudios que están reportando la purificación y producción de nuevos AMPs con nuevas y mejores características de aplicación (Parisen et al., 2007; Kaškonienė et al., 2017; Kumariya et al., 2019).

A través de la investigación se realizó una búsqueda de posibles microorganismos con actividad antimicrobiana y enzimas termoestables, en organismos y ambientes que han sido

muy poco estudiados en el departamento de Nariño, dentro del foco de interés las bacteriocinas presentan un prometedor valor clínico e industrial, sus principales usos son como bioconservantes estables de alimentos debido a que son capaces de inhibir el crecimiento de otros termófilos y bacterias asociadas al deterioro de los productos finales de la industria láctea como también bacterias contaminantes de comidas enlatadas a base de vegetales y carnes. En el contexto clínico las bacteriocinas aisladas de termófilos han sido capaces de inhibir el crecimiento de bacterias mesófilas patógenas como: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus* y además que prometen ser nuevas alternativas de antibióticos ante el creciente problema de resistencia multidrogas (Parisien et al., 2007; Pokusaeva et al., 2009; Beristain et al. 2012; Alkhalili et al., 2016).

Las aguas termales del volcán Chiles en Nariño representan fuentes que pueden albergar una interesante diversidad biológica para explorar y conservar. Un estudio fisicoquímico de la fuente termal realizado por Cabrera y Díaz (2003) describe el agua como sulfatada, débilmente ácida, con bajo contenido de otros elementos como nitratos, nitritos, fosfatos y hierro los cuales aportan las condiciones para el desarrollo de bacterias termófilas. Esto contrasta además con los 61 aislados obtenidos en el estudio microbiano de la fuente termal.

En un contexto social la investigación pretende realizar un aporte de posibles microorganismos inhibitorios para el tratamiento de infecciones frecuentes presentadas por la comunidad nariñense, en especial contra aquellos microorganismos que reportan mayor impacto epidemiológico en los hospitales de Nariño tales como *E. coli*, cuya tasa de resistencia viene aumentando en el departamento hasta unas cifras alarmantes de 41.7 %, causando al mismo tiempo infecciones que requieren complicados tratamientos (Hospital Departamental de Nariño, 2015).

4. Marco Teórico

4.1. Microorganismos termófilos

4.1.1. Diversidad

Debido a la gran diversidad de nichos en los cuales se pueden encontrar los microorganismos, estos han sido objeto de innumerables estudios por las nuevas características y uso potencial que pueden poseer. Dentro de este grupo podemos encontrar a los microorganismos extremófilos, los cuales son capaces de vivir y reproducirse en ambientes que presentan particularidades consideradas extremas para el desarrollo de la vida (Brock, 2012; Alba Cuecas, 2017; Madigan et al., 2017).

Los extremófilos se clasifican dependiendo de las condiciones físicas o químicas extremas del ambiente en el que se desarrollan: termófilos, cuya temperatura óptima de crecimiento es superior a 45 °C pertenecientes a los dominios *Bacteria* y *Archaea*, dentro de éstos se encuentran los hipertermófilos (temperatura óptima de crecimiento superior a 80 °C); psicrófilos (temperatura óptima de crecimiento por debajo de 10 °C); acidófilos (pH óptimo de crecimiento por debajo de 5); alcalófilos (pH óptimo de crecimiento por arriba de 8); halófilos (habitan en medios hipersalinos, de 5 % a 30 % de sal); osmófilos (viven a altas presiones osmóticas); radiófilos (resisten altos niveles de radiación); metalófilos (toleran altas concentraciones de metales pesados); piezófilos antes llamados barófilos, requieren o toleran presión hidrostática de 40 atm a 60 atm (Oliart, et al., 2016).

En una apreciación global los grupos más característicos que presentan microorganismos termófilos son los que se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Grupos más importantes que presentan microorganismos procariotas termófilos e hipertermófilos (Brock, 2012).

Grupos	Rango de temperatura (°C)
Bacterias fototróficas	
Cianobacterias	55 - 70
Bacterias púrpuras	55 - 60
Bacterias verdes	70 - 73
Bacterias Gram positivas	
<i>Bacillus</i>	50 - 70
<i>Clostridium</i>	50 - 65
Bacterias ácido lácticas	50 - 75
Actinomicetos	55 - 65
Otras Eubacterias	
<i>Thiobacillus</i>	50 - 60
Espirqueta	64
<i>Desulfotomaculum</i>	37 - 55
Aerobios Gram negativos	50 - 75
Anaerobios Gram negativos	50 - 75
Arqueobacterias	
Metanógenas	55 - 95
Sulfuro dependientes	55 - 110

4.1.2. Hábitats

Los hábitats donde viven los extremófilos incluyen manantiales calientes, sistemas hidrotermales submarinos poco profundos o sistemas de aberturas abisales, tierras y mares polares fríos y glaciares alpinos; lagos salinos y ambientes con valores de pH extremos, sea ácido (zonas de solfataras, minas) o alcalino (fuentes carbónicas, tierras y lagos alcalinos); y con relativa frecuencia, en zonas que combinan dos o más factores extremos, como alta temperatura y condiciones ácidas, en los manantiales ácidos y calientes de zonas volcánicas, o

baja temperatura y alta presión, en los fondos marinos (Oliart, et al., 2016; Madigan et al., 2017).

Por lo general, los termófilos han sido aislados de aguas termales que son manifestaciones de la actividad geológica, con bajas concentraciones de nutrientes y que poseen propiedades fisicoquímicas muy características (temperatura, pH y composición mineral), estos representan ambientes extremos en donde existe una gran diversidad de microorganismos propios y particulares de cada manantial (Ferrerias, 2011; Brock, 2012).

4.1.3. Adaptaciones

Debido a las altas temperaturas del ambiente termal, los componentes celulares de los microorganismos termófilos se enfrentan al desensamblaje o a la descomposición para lo cual han desarrollado una combinación de estrategias. Una de ellas es la presencia de solutos compatibles o “termosolutos”, los cuales se caracterizan por tener carga negativa y están agrupados en 2 categorías: Aquellos derivados de hexosas tienen un grupo hidroxilo del carbono uno, generalmente bloqueado en una configuración α , y otros son poli-fosfodiésteres, los cuales aparecen en concentraciones elevadas y contribuyen a la termoestabilidad de las enzimas, ácidos nucleicos y moléculas biológicas lábiles como el ATP (Ferrerias, 2011, Madigan et al., 2017).

Los lípidos de la membrana son muy importantes para mantener la estabilidad de estos organismos ante las altas temperaturas. En bacterias, los mecanismos termoadaptativos incluyen la presencia de ácidos grasos saturados, ramificaciones y/o ciclación. Las proteínas de los termófilos también necesitan mantener su estabilidad en la estructura tridimensional para

cumplir sus funciones, en termófilos se ha encontrado que las proteínas tienen una superficie más polar, un núcleo más apolar y mejor empaquetado, un número mayor de interacciones iónicas, puentes disulfuro, y una optimización de estructuras secundarias, dando lugar a unas proteínas más pequeñas, con un núcleo hidrofóbico mucho más compacto minimizando cavidades dentro de la proteína y bucles en el exterior de ella (Ferrerias, 2011; Brock, 2012; Madigan et al., 2017).

La competencia en el hábitat microbiano por los nutrientes y el espacio ha llevado a generar otro tipo estrategias o adaptaciones con el fin de aumentar la supervivencia y el crecimiento, una de las más importantes y que además es un fenómeno general en la mayoría de bacterias es la producción de compuestos antimicrobianos. Existen números estudios de organismos termófilos en los cuales se encuentran sustancias tales como los péptidos antimicrobianos o bacteriocinas capaces de inhibir el crecimiento tanto de microorganismos cercanamente relacionados como de ciertas bacterias patógenas (Martirani et al., 2002; Aun et al., 2009; Pokusaeva et al., 2009; Alkhalili et al., 2016).

4.2. Compuestos antimicrobianos

El descubrimiento de productos naturales ha sido muy importante para el desarrollo de muchos productos farmacéuticos y terapéuticos, es así como aproximadamente 80 % de las drogas disponibles en el mercado son derivadas de productos naturales o análogos. Este tipo de compuestos incluyen antibióticos tales como penicilina, tetraciclina, eritromicina, anti infecciosos (avermectina, quinina, artemisinina) y drogas anticancerígenas (taxol, doxorubicina). Todos estos productos y aquellos que se están descubriendo recientemente

como nuevas alternativas reflejan la gran diversidad de compuestos antimicrobianos que pueden ser producidos por los microorganismos (Morton, 2015; Madigan et al., 2017).

Dentro de la enorme variedad de sistemas de defensa microbiana se incluyen antibióticos tradicionales de amplio espectro que han sido muy importantes para el bienestar humano, subproductos metabólicos como los ácidos lácticos producidos por el género de los lactobacilos, agentes líticos como lisozimas que también se encuentran en muchos alimentos, numerosos tipos de exotoxinas proteicas y bacteriocinas. Todos estos mecanismos desarrollados por los microorganismos han llamado la atención no solo por su diversidad sino también por su abundancia natural (Riley & Wertz, 2002; Cuecas, 2017).

Algunos ejemplos de los sistemas de defensa microbianos son: la producción de ácidos orgánicos como una característica muy distintiva de las bacterias ácido-lácticas (BAL) entre estos están: ácido láctico, el cual puede interactuar con las membranas celulares y causar acidificación intracelular y desnaturalización de proteínas; ácido acético y propiónico que al igual que el ácido láctico pueden interactuar con las membranas celulares, causar acidificación intracelular y desnaturalización de proteínas pero estos compuestos son más efectivos que el ácido láctico debido a los elevados valores de pKa (ácido láctico 3.08, ácido propiónico 4.87 y ácido acético 4.75), por lo tanto tienen un mayor rango de actividad antimicrobiana. Otro agente antimicrobiano que presentan las BAL es el peróxido de hidrogeno, el cual es producido en presencia de oxígeno y su efecto antimicrobiano se debe a la oxidación de los grupos sulfhidrilo causando la desnaturalización de enzimas y la peroxidación de las membranas lipídicas, aumentando la permeabilidad de la membrana. Por último, las bacterias ácido-lácticas también producen bacteriocinas, las cuales han sido ampliamente estudiadas para su aplicación

en muchos campos, especialmente como bioconservantes de alimentos (Riley & Wertz, 2002; Ramírez, 2005; Mirkovic et al., 2016; Kaškonienė et al., 2017).

Otro grupo de interés y productor de compuestos antimicrobianos son los actinomicetos que son capaces de producir antibióticos de amplio espectro tales como: estreptomicina, marinomicinas, vancomicina, rifampicina; antifúngicos como: Anfotericina B y una gran diversidad de compuestos aplicables en muchos campos (Quiñones et al., 2016). Por otra parte, los péptidos antimicrobianos son producidos por una amplia variedad de organismos que incluyen eucariotas y procariotas, representan nuevas alternativas de antibióticos que despiertan gran interés debido a su efectividad, seguridad y enorme diversidad. Aquellos AMP's que son producidos por bacterias se denominan bacteriocinas, se encuentran en casi todas las especies bacterianas, y dentro de una especie se producen decenas o incluso cientos de diferentes tipos de bacteriocinas. Las halobacterias producen universalmente su propia versión de bacteriocinas, las halocinas. Las colicinas, son bacteriocinas producidas por la mayoría de bacterias Gram negativas (Riley & Wertz, 2002; Motta et al., 2004; Parisien et al., 2007; Alkhalili et al., 2016).

Estudios como el de Marlida (2014) reportan la producción de sustancias antimicrobianas por bacterias ácido-lácticas termófilas capaces de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas como *E. coli*, *S. thymurium* y *L. monocytogenes*. Por otra parte Aun et al. (2009) realiza un estudio acerca de la producción de antibióticos en bacterias termófilas del género *Bacillus*, donde la sustancia producida por las cepas bacterianas termófilas inhibe eficientemente el crecimiento de bacterias patógenas como *S. aureus* y *Micrococcus luteus*. Al-Dhabi et al. (2016) realiza un screening de bacterias termófilas con capacidad de producir compuestos antimicrobianos donde el género *Streptomyces* a partir de la producción de acetato de etilo es

capaz de inhibir el crecimiento de una amplia gama de microorganismos patógenos entre bacterias y hongos, proponiendo que los actinomicetos asociados a ambientes extremos son fuente prometedora de compuestos antimicrobianos. Por último, Alkhalili et al. (2016) realizó un estudio acerca de AMP's en la cepa termófila *Geobacillus sp. ZGt-1* aislada de una fuente termal, la cual fue capaz de inhibir el crecimiento de otros termófilos cercanamente relacionados y de mesófilos como *B. subtilis* y *S. typhimurium*.

4.2.1. Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos sintetizados ribosómicamente que presentan un potencial uso en el control de patógenos y bacterias dañinas asociados a los alimentos y además son nuevas alternativas de antibióticos en el tratamiento de infecciones (Martirani et al., 2002; Pokusaeva et al., 2009; Edalatian et al., 2012; Alkhalili et al., 2016). Estos compuestos pueden ser producidos por bacterias Gram positivas (G^+) y Gram negativas (G^-), generalmente son secretadas extracelularmente y presentan entre 20 y 60 aminoácidos, conformadas por puentes disulfuro, tioéter o grupos tiol libres y tienen puntos isoeléctricos en un intervalo de pH 8 a 10. La producción de estas sustancias sucede en la fase logarítmica del crecimiento bacteriano o en el final de esta (Beristain, 2012; Kaškonienė et al., 2017, Kumariya et al., 2019).

Las bacteriocinas son compuestos que presentan gran diversidad de estructuras, funcionalidades, espectros antimicrobianos, modos de acción y también diversidad en términos de fuentes, dentro de las cuales tenemos a los termófilos que se desarrollan en ambientes que ofrecen oportunidades para el aislamiento de microorganismos con nuevos y potentes compuestos antimicrobianos. Estas sustancias comúnmente se encuentran en bacterias Gram positivas que al estar asociadas a ambientes termales incrementan su valor debido a la

estabilidad de sus biomoléculas a altas temperaturas y valores de pH, algunos representantes son *Geobacillus stearothermophilus*, *G. thermodentrificans*, *G. thermoleovorans*, *Bacillus licheniformis* y *B. subtilis* (Martirani et al., 2002; Aun et al., 2009; Pokusaeva et al., 2009; Alkhalili et al., 2016).

En el contexto clínico las bacteriocinas aisladas de termófilos han sido capaces de inhibir el crecimiento de bacterias mesófilas patógenas como: *E. coli*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. typhimurium*, *S. aureus*, *S. haemolyticus* y además prometen ser nuevas alternativas de antibióticos ante el creciente problema de resistencia multidrogas (Parisien et al., 2007; Pokusaeva et al., 2009; Beristain et al. 2012; Alkhalili et al., 2016).

4.2.2. Tipos de bacteriocinas y modos de acción

Las bacteriocinas se clasifican de acuerdo con su estructura, propiedades fisicoquímicas y propiedades moleculares. En la clasificación de las bacteriocinas de bacterias Gram positivas se identifican 3 grupos (Beristain et al. 2012):

Clase I (Lantibióticos).

Son péptidos conformados de 19-38 aminoácidos, su peso molecular es menor a 5 kDa y tienen modificaciones post-traduccionales por la deshidratación de serina o treonina las cuales se unen a través de un grupo tioéter a cadenas laterales de la cisteína con lo cual forman lantionina y α -metil-lantionina (aminoácido inusual). Los lantibióticos a su vez se dividen en dos grupos dependiendo de su estructura y modo de acción: Clase Ia: Con peso molecular menor a 4 kDa, carga neta positiva y su actividad microbiana se enfoca en la despolarización de la membrana citoplasmática destruyendo la célula. Clase Ib: Con peso molecular entre 1.8

y 2.1 kDa, carga neta negativa o sin carga y su actividad antimicrobiana está relacionada con la inhibición enzimática (Chen y Hoover, 2003; Dimov et al., 2005; Beristain et al. 2012; Kaškonienė et al., 2017).

Clase II (No lantibióticos).

Péptidos conformados de 30 a 60 aminoácidos, su peso molecular es menor a 10 kDa, no presentan modificaciones post-traduccionales y son estables al calor y al pH. Los No-lantibióticos se dividen a su vez en tres grupos: Clase IIa: Se caracteriza por tener una secuencia amino terminal - Try - Gly - Asn - Gly - Val - Xaa - Cis y contiene uno o dos puentes disulfuro. Clase IIb: Bacteriocinas formados por dos péptidos los cuales son requeridos para su actividad antimicrobiana, formando poros en la membrana celular causan una desestabilización. Clase IIc: Poseen una estructura cíclica y no tienen modificaciones post-traduccionales, carecen de la secuencia amino terminal - Try - Gly - Asn - Gly - Val - Xaa - Cis (Chen y Hoover, 2003; Dimov et al., 2005; Beristain et al. 2012; Kaškonienė et al., 2017).

Clase III (Termolábiles)

También son denominadas bacteriolocinas, son lábiles al calor y presentan un peso molecular mayor a 30 kDa. Su actividad antimicrobiana se enfoca en la hidrólisis de la pared celular de las bacterias sensibles (Dimov et al., 2005; Beristain et al. 2012; Kaškonienė et al., 2017).

4.2.3. Métodos de extracción

El método más utilizado para la obtención de las bacteriocinas es la precipitación con sulfato de amonio. Dependiendo de la cepa bacteriana con la que se trabaje este consiste en llevar el

medio de cultivo hasta el final de la fase estacionaria, después se realiza una centrifugación y el sobrenadante es tratado con sulfato de amonio cuya concentración puede variar de 60 a 70 %, con esto se obtiene un precipitado el cual debe ser filtrado y lavado para eliminar el sulfato de amonio y poder realizar las pruebas de inhibición bacteriana. Algunas veces seguido del proceso de centrifugación se hace varios pasos de cromatografía HPLC para obtener bacteriocinas más puras, pero también es sabido que la estabilidad de los extractos de bacteriocina decrece dramáticamente a medida que se incrementa su grado de purificación (Pokusaeva et al., 2009; Agudelo, 2013; Surovtsev et al. 2014; Alkhalili et al. 2016; Zhou & Zhang, 2017). Otros métodos de extracción de bacteriocinas están basados en su afinidad con los solventes orgánicos, su variación en la solubilidad en soluciones salinas concentradas y valores de pH.

Una vez realizado el precipitado de las bacteriocinas se pueden comprobar sus características bioquímicas al tratar las muestras con diferentes proteasas tales como proteinasa K, alfa-quimiotripsina, tripsina, pronasa E o con enzimas tales como alfa-amilasa, lipasa A, DNAasa o RNAasa. Y por último se puede determinar el peso molecular del compuesto con SDS-PAGE (Pokusaeva et al., 2009; Agudelo, 2013; Alkhalili et al. 2016).

4.2.4. Aspectos genéticos

Las bacteriocinas pueden estar codificadas en los cromosomas o en los plásmidos, dependiendo del tipo de bacteria con la que se esté trabajando. Los genes estructurales de las bacteriocinas generalmente se encuentran acompañados de otros, necesarios para su expresión y procesamiento tales como genes modificadores, inmunitarios, transportadores y reguladores, además se organizan en operones (Martínez, 1996; Morton et al., 2015).

A través de técnicas tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se puede determinar si una bacteria posee el potencial genético de codificar alguna bacteriocina en específico. Entre las ventajas de la prueba se encuentra su alta sensibilidad, especificidad y límite de detección, pero debido a la diversidad de las bacteriocinas y a los diversos tipos de productores se hace difícil la búsqueda de genes codificantes de bacteriocinas en un gran número de cepas, por lo tanto, se han desarrollado marcadores moleculares para la amplificación de genes específicos de una cepa bacteriana en cuestión (Edalatian et al., 2012; Agudelo, 2013; Morton et al., 2015).

4.3. Identificación de proteínas asociadas a actividad antimicrobiana

En aquellos trabajos dirigidos hacia la búsqueda de compuestos con actividad antimicrobiana tales como las bacteriocinas, las técnicas de identificación para péptidos y proteínas en mezclas complejas que son comúnmente usadas son el mapeo de masas peptídicas mediante espectrometría de masas. El espectrómetro debe desempeñar cuatro funciones básicas: vaporizar sustancias de volatilidades muy diferentes, originar iones a partir de las moléculas neutras en fase gaseosa, separar los iones en función de su relación masa/carga (m/z) y por último debe ser capaz de detectar los iones formados y registrar la información adecuadamente (Alkhalili et al., 2016).

Uno de los aspectos principales que permitió la introducción de la espectrometría de masas en el análisis de biomoléculas fue el desarrollo de las técnicas de ionización “suave” que permitían observar iones moleculares de compuestos de masa alta, ESI y MALDI son las dos técnicas de ionización más utilizadas en la actualidad en el análisis proteómico. ESI es una técnica de ionización a presión atmosférica en la que, mediante la aplicación de un fuerte campo

eléctrico, se produce la nebulización de una solución del analito a su salida de un tubo capilar. En este proceso los iones presentes en fase líquida son desorbidos a fase gaseosa de una forma tan suave que se pueden conservar incluso complejos moleculares derivados de interacciones no covalentes existentes en la solución. La ionización por ESI de péptidos y proteínas genera iones multicargados siendo la extensión de la carga dependiente del pH de la solución y del número de grupos básicos (o ácidos) de la molécula (Abián et al., 2008).

Por otra parte, el desarrollo de analizadores de masa de creciente resolución y velocidad de análisis ha sido primordial en este proceso, uno de los grupos de analizadores de masa son los que se basan en el confinamiento de iones, este tipo de analizadores permiten el confinamiento de iones dentro de una cámara de pequeño tamaño utilizando campos eléctricos (Paul trap o ión trap, Orbitrap) o magnéticos (analizador de resonancia ciclotrónica de iones mediante transformada de Fourier, FT-ICR) (Abián et al., 2008). Alkhalili et al. (2016) en su estudio de candidatos a proteínas antimicrobianas obtenidas de una bacteria termófila realiza un análisis proteómico dirigido a la fracción proteica antibacterialmente activa utilizando un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos Pro (Thermo Fisher Scientific) equipado con una fuente de spray de iones nanoEasy (Proxeon Biosystems, Odense, Dinamarca).

4.4. Resistencia bacteriana

La resistencia bacteriana puede generarse de una manera natural cuando las bacterias carecen de la molécula diana a la que se une el agente antimicrobiano y, por lo tanto, afecta a todas las bacterias de una misma especie o género. Y en otros casos la resistencia bacteriana puede ser adquirida y aparece únicamente en algunas poblaciones dentro de una determinada

especie. Este tipo de resistencia aparece por mutaciones en el ADN o por la adquisición de material genético exógeno a través de plásmidos, transposones o integrones (Medina, 2011).

En general, las bacterias presentan resistencia a los agentes antimicrobianos por uno o varios de los siguientes mecanismos: inactivación del antimicrobiano producida a través de la producción de enzimas, modificación de las células diana debido a mutaciones que alteran el sitio de unión a los antimicrobianos impidiendo su actividad, disminución de la permeabilidad celular causada por mutaciones de los genes que codifican las porinas de la pared celular o debido a la presencia de proteínas de membrana especializadas que disminuyen la entrada del antimicrobiano y la expulsión de agentes antimicrobianos mediante transportadores o bombas de expulsión activas ubicadas en la membrana interna de los microorganismos que impiden que el antimicrobiano se acumule en el interior de la célula (Medina, 2011).

Curiosamente se ha reportado que muchas bacterias patógenas adoptan la misma estrategia de resistencia a antibióticos para escapar de las bacteriocinas. Después de todo, las bacteriocinas son un subconjunto de los antibióticos (Kumariya et al., 2019).

4.5. Actividad enzimática

La temperatura es quizá uno de los factores que presenta mayores efectos en la funcionalidad de las estructuras biológicas, durante millones de años la temperatura ha modelado la actividad de moléculas tan importantes como las enzimas y también la evolución de los microorganismos en ambientes extremos. Las enzimas termófilas son muy utilizadas para potenciales aplicaciones biotecnológicas debido a que son capaces de catalizar reacciones bioquímicas en condiciones extremas. Algunas de las ventajas por las que se prefiere a las enzimas termófilas sobre sus homólogos mesófilos son: presentan mayor estabilidad y tienen una vida media más

prolongada; tienen mayor resistencia a ciertos agentes químicos como solventes orgánicos, detergentes e incluso a amplios rangos de pH; aumenta la solubilidad de sustratos y productos de forma que se puede incrementar su concentración; se disminuye la posibilidad de contaminación con las altas temperaturas (Ferrerías, 2011; Madigan et al., 2017). Algunas de las enzimas utilizadas en la industria son:

4.5.1. Proteasas

Las proteasas son una de las enzimas más ampliamente estudiadas y más utilizadas en procesos industriales, alcanzando más de 60% en el mercado mundial. Básicamente se encargan de romper las proteínas en péptidos más pequeños o aminoácidos. Estas enzimas se clasifican principalmente de acuerdo con su sitio catalítico en: proteasas de serina, cisteína o metaloproteasas. Aquellas que son resistentes a la desnaturalización por detergentes y a condiciones alcalinas, se utilizan como aditivos en detergentes domésticos; en el remojo en la industria de la piel; como modificadores de la proteína de soya entre otros. La termolisina es la única proteasa termofílica con aplicación industrial: se utiliza en la producción del dipéptido *aspartame*, usado como endulzante bajo en calorías. La mayoría de proteasas extremófilas son del tipo serina, estables a altas temperaturas, altas concentraciones de detergentes y agentes desnaturalizantes (Suárez et al., 2004; Canales, 2013; Dutta et al., 2016; Calero et al., 2017).

4.5.2. Lipasas

Las lipasas son enzimas capaces de hidrolizar lípidos para producir glicerol y ácidos grasos. Su uso en la industria ha aumentado recientemente debido a su capacidad para trabajar en disolventes orgánicos, realizando reacciones de síntesis entre alcoholes y ácidos. Las lipasas

básicamente catalizan reacciones como: hidrólisis de lípidos, síntesis de ésteres, acidólisis que consiste en el reemplazamiento de un ácido graso esterificado por un ácido graso libre y transesterificación que básicamente es el cambio de ácidos grasos por triglicéridos. Se emplean en procesos industriales tales como la obtención de naproxeno y ácido linoléico conjugado; para la producción de biodiesel por transesterificación, y para la obtención de saborizantes y aromatizantes (Suárez et al., 2004; Canales, 2013; Leiva, 2016).

4.5.3. Quitinasas

La quitina es el segundo polímero más abundante en la naturaleza, está formada por aminoazúcares unidos entre sí por enlaces glicosídicos β (1 \rightarrow 4), que forman una cadena lineal de unidades de N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucosa. La quitina es degradada por un grupo de enzimas llamadas quitinasas, y es el principal componente estructural de la pared celular de hongos fitopatógenos y del caparazón de los insectos; es por esto que la principal aplicación de las quitinasas es la formulación de fungicidas o insecticidas. Pero los campos de aplicación biotecnológica de las quitinasas, no solo se reduce a un enfoque de biocontrol, sino que cada día son más amplios, por ejemplo, se han propuesto a las quitinasas para la producción de quitooligosacáridos los cuales toman importancia por sus posibles actividades biológicas, para la producción de biomasa microbiana con aplicaciones en acuicultura, obtención de protoplastos, degradación y reutilización de desechos marinos como los del camarón. También se ha sugerido el uso de quitinasas para combatir importantes infecciones micóticas superficiales, entre otros potenciales usos (Gonzales et al., 2010; Castro et al., 2011; Madigan et al., 2017).

4.5.4. Amilasas

Las amilasas son enzimas que hidrolizan las moléculas de almidón para obtener diversos productos utilizados en la industria, tales como la dextrina y otros polímeros más pequeños. Estas enzimas se han utilizado para la producción de endulzantes para la industria alimentaria, en la fabricación de papel, textiles y en la producción de detergentes (Ferrerias, 2011; Madigan et al., 2017). Existe gran variedad de bacterias, adaptadas a diferentes ambientes que tienen la capacidad de hidrolizar la molécula de almidón, es común encontrar bacterias termófilas con alta capacidad amilolítica tales como: *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus licheniformis*, Rubiano (2006) reporta en su estudio de aislamiento y caracterización de organismos extremófilos asociados a manantiales termominerales de Paipa e Iza (Boyacá) la cepa P3 -18 que posee actividad amilolítica incluso más alta que las usadas a nivel industrial.

4.5.5. Celulasas

Una de las ventajas del estudio de los microorganismos radica en la participación sobre los ciclos biogeoquímicos, a través de los cuales se recupera y se recicla materia y energía por medio de complejos enzimáticos, entre estos tenemos a los microorganismos celulolíticos capaces de hidrolizar la molécula de celulosa, componente principal de las paredes celulares y por lo tanto la molécula más abundante en la naturaleza (Malaga & Cabrera, 2017).

La hidrólisis enzimática de la celulosa y hemicelulosa implica la acción secuencial de tres enzimas, las cuales se clasifican dependiendo del sitio en el que actúan sobre la molécula: endo-1,4 glucanasas (-1,4 glucano glucanohidrolasa), exo-1,4 celobiohidrolasas y las 1,4 glucosidasas. Es también conocido que las hidrolasas de las paredes celulares vegetales suelen

contener dominios catalíticos y no catalíticos, incluyendo entre estos, dominios de unión a los sustratos. Se cree que el papel de tales dominios es permitir el reconocimiento y contacto con las fibras de la pared celular. Existe actualmente una demanda creciente de enzimas celulolíticas debido a que tienen diversidad de aplicaciones en biotecnología e industria: la producción de alcohol; mejoramiento de la producción de jugos; detergentes limpiadores (provoca colores brillantes y suavidad), lavado de mezclilla, pretratamiento de biomasa celulósica y en cultivos de forraje, para mejorar la calidad y digestibilidad de los animales; para la sacarificación enzimática de desechos de agricultura e industriales, y en el blanqueamiento de la pulpa de madera (Mikán & Suárez, 2004; Guzmán et al., 2015; Málaga & Cabrera, 2017).

Los microorganismos degradadores de celulosa incluyen hongos y bacterias, aerobios y anaerobios, mesófilos y termófilos, que ocupan una variedad de hábitats. Siendo consideradas las bacterias termófilas prometedoras en la degradación de celulosa, por la termoestabilidad de sus enzimas, es de gran importancia la selección de estos microorganismos con una eficiente actividad celulolítica para obtener sustancias biológicamente activas con interés biotecnológico e industrial (Guzmán et al., 2015).

Hasta la fecha se han encontrado microorganismos termófilos como *Thermotoga maritima*, *T. neapolitana* y *T. thermarun*, hongos y levaduras que producen xilanasas y enzimas relacionadas que se activan a altas temperaturas y en amplios rangos de acidez (Suárez et al., 2004; Madigan et al., 2017).

5. Marco de antecedentes

La resistencia bacteriana a los antibióticos actuales según la OMS representa una grave amenaza a nivel mundial, el tratamiento de infecciones comunes cada vez es más difícil debido

a la rápida propagación de los mecanismos de resistencia, lo que se traduce a la vez en un aumento de las tasas de mortalidad en la población. Debido a esto numerosas investigaciones actualmente se están enfocando en la búsqueda de compuestos antibacterianos alternativos, tales como las bacteriocinas con modos de acción diferentes y más eficientes que los antibióticos tradicionales (Alkhalili et al., 2016).

Tabla 2. Gama de antibióticos para los cuales se reporta resistencia en Colombia (Martínez et al., 2014).

Bacterias patógenas	Antibióticos
<i>E. coli</i>	AMK: amicacina; SAM: ampicilina/sulbactam; ATM: aztreonam; FEP: cefepime; CTX: cefotaxime; CAZ: ceftazidime; CRO: ceftriaxona; CIP: ciprofloxacina; DOR: doripenem; ETP: ertapenem; IPM: imipenem; MEM: meropenem; TZP: piperacilina/tazobactam; TGC: tigeciclina.
<i>S. aureus</i>	AMP: ampicilina; DAP: daptomicina; GEN: gentamicin; LNZ: linezolid; OXA: oxacilina; VAN: vancomicina.

El estudio realizado por Edalatian et al. (2012) sobre bacteriocinas de Enterococos aislados de quesos demuestra que de 96 aislados obtenidos, 48 fueron capaces de inhibir el crecimiento de cepas indicadoras tales como *E. intestinalis*, *S. aureus*, *Listeria innocua* utilizando el método agar spot test. El análisis de PCR reveló genes codificantes para las enterocinas A, B, P o X o sus combinaciones. Por otra parte, Morton et al. (2015) reporta que las modificaciones enzimáticas que presentan las bacteriocinas y su transporte es llevado a cabo por proteínas cuyos genes codificantes (genes de contexto) están próximos a los genes precursores de la bacteriocina y además estos genes parecen conservarse entre especies no relacionadas; utilizando este conocimiento y con la ayuda de un software llamado BOA (*Bacteriocin Operon and gen block Associator*) desarrollado por los autores fueron capaces de identificar nuevos candidatos para los genes de contexto en diferentes bases de datos aclarando las vías de síntesis

de las bacteriocinas, e identificando nuevos candidatos con disimilaridad conocida de secuencia.

Alkhalili et al. (2016) realizó un estudio acerca péptidos antimicrobianos en la cepa termófila *Geobacillus sp. ZGt-1* aislada de una fuente termal, la cual fue capaz de inhibir el crecimiento de otros termófilos cercanamente relacionados y de mesófilos como *B. subtilis* y *S. typhimurium* en un medio de cultivo sólido, la actividad antimicrobiana también se probó bajo un método de inmovilización de células en perlas de agar utilizando un cultivo tipo batch en medio líquido a una temperatura de 60 °C; este método mostró un incremento de la actividad antimicrobiana hasta un máximo en el ciclo 14 lo cual demuestra que el método podría ser aplicado a nivel industrial. El tratamiento de los cultivos en medio sólido con proteasa llevó a la pérdida de la actividad antimicrobiana, con lo que se comprobó la naturaleza proteica del compuesto inhibidor. Además de esto también se realizó un tratamiento con SDS-PAGE el cual mostró que la fracción del compuesto proteico causante de la inhibición estaba entre 15 y 20 kDa, sumado a esto el análisis de espectrometría de masas mostró que la fracción activa de la proteína se encontraba en el rango de peso de interés.

Renye et al. (2016) realizó un estudio en *Streptococcus thermophilus* utilizando varios medios de cultivo tales como TYL, M17- lactosa, M17- glucosa y MRS, para evaluar si el medio influye en la producción de bacteriocinas. El crecimiento de las cepas en los cuatro medios de cultivo fue diferencial, no se logró evidenciar mayor porcentaje de producción en alguno de los medios en específico, por lo tanto, como la elección del medio puede influir en la producción de bacteriocinas dependiendo de la cepa con la que se está trabajando, es necesario probar varios tipos de medios de cultivo para la producción de estos compuestos.

Zhou y Zhang (2017) demuestran que las bacteriocinas pueden tener múltiples aplicaciones en diferentes contextos, los autores probaron los efectos antibacteriales de las bacteriocinas

obtenidas de *Lactobacillus rhamnosus* sobre infecciones que suelen ser comunes después de cirugías que involucran implantes ortopédicos; trabajando en un modelo animal con conejos a los cuales se les realizó un implante de rodilla e infección de la zona del implante con *S. aureus* formador de biopelículas. Aquellos conejos tratados con las bacteriocinas aisladas presentaron disminuciones significativas tanto en los niveles de proteína C reactiva e interleuquina 6, además los niveles de formación de la biopelícula de *S. aureus* disminuyeron significativamente con respecto al control, lo cual indica que las bacteriocinas pueden ser agentes potenciales para la prevención de infecciones ortopédicas post operación y para el tratamiento de múltiples infecciones.

Recientes estudios donde se aísla bacteriocinas de diversas fuentes y se evalúa su espectro inhibitorio están reportando la emergencia de numerosas cepas resistentes de *E. coli* y *S. aureus*, Alkhalili et al. (2016) aísla péptidos antimicrobianos de la cepa *Geobacillus sp.* pero su actividad inhibitoria únicamente se extiende a microorganismos relaciones taxonómicamente, los péptidos aislados son incapaces de inhibir el crecimiento de cepas de *E. coli* y *S. aureus*, al igual que lo reportado por Gutiérrez et al. (2016) y Macaluso et al. (2016) cuyas bacteriocinas aisladas de productos lácteos no producen acción inhibitoria sobre las cepas patógenas en mención.

6. Objetivos

6.1. Objetivo general

Evaluar la actividad inhibitoria de las bacterias termófilas aisladas de aguas termales del volcán Chiles, Nariño sobre las bacterias patógenas *E. coli* y *S. aureus*.

6.2. Objetivos específicos

Caracterizar las bacterias termófilas aisladas de aguas termales del volcán Chiles, Nariño.

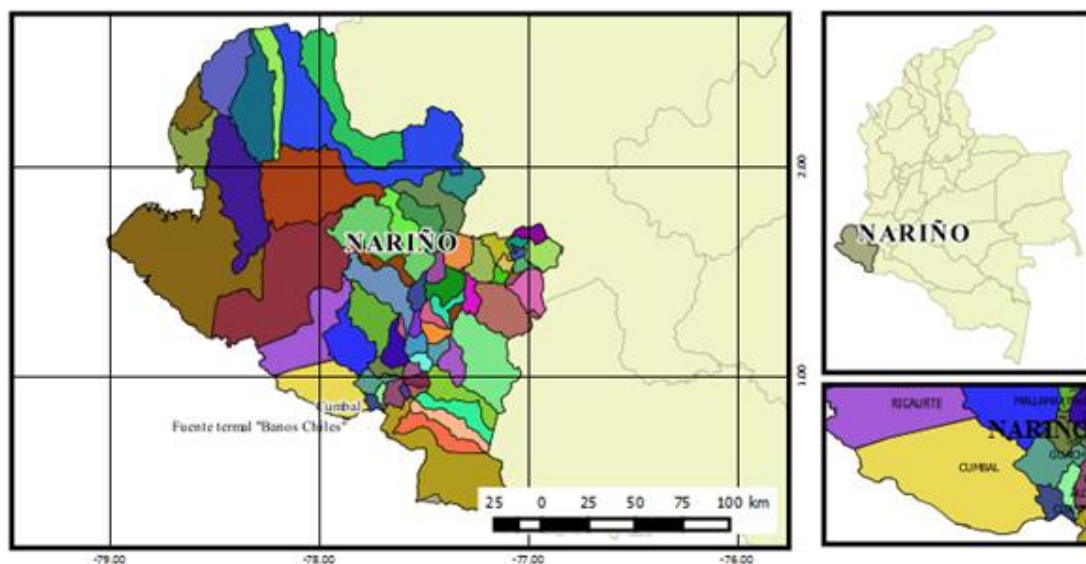
Estimar el efecto inhibitorio in vitro de las bacterias termófilas aisladas aguas termales del volcán Chiles, Nariño sobre las bacterias patógenas *E. coli* y *S. aureus*.

Analizar los péptidos antimicrobianos de la bacteria termófila con mayor inhibición sobre las bacterias patógenas *E. coli* y *S.aureus*.

7. Materiales y métodos

7.1. Área de estudio

El volcán Chiles se encuentra en el Nudo de los Pastos en la línea fronteriza entre Colombia y Ecuador, latitud $0^{\circ} 49' N$ y $77^{\circ} 56' O$, altura aproximada de 4750 m.s.n.m. Las fuentes termales “Baños Chiles” se encuentran hacia el lado de Colombia, entre las coordenadas, latitud: $0^{\circ} 48' 46.4'' N$ y $77^{\circ} 51' 59.4'' O$. Las fuentes termales presentan una temperatura promedio de $42^{\circ} C$ y pH 5.3 (Cabrera & Díaz, 2003).



7.2. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Los aislados termófilos se obtuvieron de un análisis previo realizado en el área de estudio, las muestras de agua fueron colectadas en termos estériles de 250 mL y transportadas hasta los laboratorios de la Universidad de Nariño donde se realizó su procesamiento. Después de una hora del muestreo, se tomaron 100 uL para inocular por triplicado en medios sólidos Luria Bertani (LB) y un medio preparado con agua termal adicionado con fuente de carbono (peptona 5%, glucosa 5%) se ajustó a pH 6.0 y se incubó en condiciones aeróbicas a 50 °C durante 72 horas. Una vez se observó crecimiento se realizó un pase en tubos de ensayo tipo slam. A partir de los tubos de preservación iniciales se realizaron pases repetitivos en agar nutritivo hasta obtener un total de 18 aislados axénicos, las placas se incubaron por 12 horas a 50°C.

Las cepas bacterianas de *E. coli* y *S. aureus* asociadas a infecciones humanas e identificadas como resistentes a distintos antibióticos fueron suministradas por el Laboratorio Clínico Especializado Ltda. de la ciudad de San Juan de Pasto. Para su conservación y disponibilidad en ensayos posteriores se realizó un banco de células primarias, se agregaron 500 µL de cada aislado previamente crecido en crioviales con 500 µL de caldo LB - glicerol 60 % y se dejó en refrigeración a -20 °C, adicionalmente se realizó un perfil de resistencia de las cepas patógenas utilizando sensidiscos de los siguientes antibióticos: penicilina, amikacina, aztreonam y cefotaxima.

7.3. Caracterización morfológica y molecular

Los aislados termófilos se incubaron por 12 horas a 50°C en placas de agar nutritivo y se registraron características morfológicas como: forma, margen, elevación, superficie, textura,

propiedad óptica, tamaño, color y tinción de Gram, además se realizaron las pruebas bioquímicas: catalasa, oxidasa, producción de indol, ureasa, rojo de metilo, Voges Proskauer, hidrólisis de gelatina y utilización de fuentes de carbono (caseína, almidón, glucosa, fructosa, galactosa, maltosa, sacarosa y lactosa).

7.3.1. Extracción de ADN

Los aislados fueron inoculados en 10 mL de medio Trypticase de Soya (TSB) a 50 °C por 18 horas hasta obtener una turbidez equivalente a 0.5 en la escala McFarland. Después, las células fueron centrifugadas por 5 minutos a 10000 rpm; la biomasa fue resuspendida en 567 µL de la solución tampón TE y homogeneizada en vortex por 5 segundos. Luego se adicionaron 30 µL de dodecilsulfato sódico (SDS) 10% y 9 µL de proteinasa K (20 mg/mL) se agitó suavemente. La mezcla se incubó por 1 hora a 37 °C en baño serológico. Posteriormente fueron adicionados 100 µL de NaCl 5M y 80 µL de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), la solución se incubó por 20 minutos a 65 °C en baño serológico. Después se adicionó igual volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y la solución fue centrifugada por 25 minutos a 10000 rpm. Se pasó el sobrenadante a otro tubo y se agregaron 0,3 µL de RNAsa A (20 mg/mL) y se incubó por 1 hora a 37 °C. Se adicionó igual volumen de cloroformo y se centrifugó por 15 minutos a 10000 rpm. El sobrenadante se pasó a otro tubo y se agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol. La mezcla fue centrifugada nuevamente por 5 minutos a 10000 rpm, se descartó el sobrenadante y se adicionaron 200 µL de etanol 70%, se centrifugó por 5 minutos a 10000 rpm, se descartó el etanol y se dejó secar el tubo, por último, el ADN se resuspendió en agua ultrapura y se guardó en nevera durante toda la noche (Burbano et al., 2017). Se realizó la cuantificación de ADN en NanoDrop usando la relación de densidad óptica 260/280 entre 1.8 a 2 (Sambrook, 1996).

7.3.2. Amplificación subunidad 16s rRNA

Para la amplificación de la subunidad 16S rRNA se utilizaron los primers 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) (Weisburg, Barns, Pelletier & Lane, 1991) y 1041R (CGGTGTGTACAAGACCC) (Nübel, et al., 1996). La mezcla de reacción (50 µL) contenía 5× Buffer Colorless (Promega) con 1 mM MgCl₂, 0,05 mM dNTPs, 0,4 µM de cada primer, GoTaq DNA Polimerasa, 2 µL de la muestra de ADN y el volumen final ajustado con agua ultrapura. Ciclos de amplificación: 95 °C por 2 minutos para denaturación inicial seguida por 30 ciclos de 94 °C por 2 minutos, 55 °C por 1 minuto y 72 °C por 3 minutos y una extensión final de 10 minutos a 72 °C. Todas las reacciones fueron realizadas en un termociclador MultiGene (Labnet Inc.). El proceso de secuenciación se realizó a través de la empresa CorpoGen, Colombia.

Las secuencias fueron editadas y alineadas en el programa BioEdit V.7.0.4., después fueron comparadas con secuencias disponibles en GenBank con la herramienta BLASTn y en Ribosomal Database Project (RBD), se seleccionaron los microorganismos que presentaron mayor porcentaje de identidad y eran de origen similar a las secuencias analizadas. Posteriormente se determinaron las relaciones filogenéticas entre las cepas, mediante la generación de un árbol filogenético usando el método *Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean* (UPGMA).

7.4. Detección de la actividad inhibitoria

Diferentes métodos de laboratorio pueden ser usados para determinar in vitro la susceptibilidad de las bacterias ante agentes antimicrobianos, estos generalmente se basan en la naturaleza química de los compuestos a evaluar.

7.4.1. Método Spot en capa

Para la determinación antibacterial por este método *E. coli* y *S. Aureus* (cepas de prueba) se sembraron en agar Mueller Hinton (MH) toda la noche a 37 °C. Las colonias fueron suspendidas en solución salina estéril (0.85%) y sembradas en *soft agar* (agar blando) MH precalentado a 45 °C, de tal manera que la turbidez era equivalente a 0.5 en la escala McFarland. 10 mililitros de *soft agar* MH con las cepas de prueba fueron vertidos en placas y se dejó solidificar. Previamente, el medio de cultivo TSB con los aislados termófilos se incubó a 50 °C durante 18 horas y después fue centrifugado a 4000 rpm por 40 minutos. Finalmente, 10 µL del sobrenadante filtrado (Syringe filters) fueron colocados sobre la superficie del agar y los tratamientos fueron incubados a 37 °C por 12 horas (Alkhalili et al., 2016).

7.4.2. Método de siembra masiva

Las cepas de *E. coli* y *S. aureus* se inocularon en caldo LB durante 6 – 8 horas a 37 °C, una vez se observó crecimiento se realizó una siembra masiva con hisopos estériles en placas de agar MH a concentración normal (38 g/L) y placas de agar MH a la mitad de la concentración (19 g/L). Inmediatamente se agregaron 10 µL de los controles (agua destilada estéril y antibiótico) y el sobrenadante de los aislados termófilos (4000 rpm por 40 minutos) se inoculó en las siguientes condiciones: impregnado en sensidiscos expuestos a UV, sensidiscos sin exposición a UV y una gota de 10 µL sobre el agar.

7.4.3. Determinación de concentración inhibitoria

Los aislados termófilos se inocularon en medio TSB durante 18 horas a 50 °C, fueron centrifugados (4000 rpm por 40 minutos) y el sobrenadante filtrado (Syringe filters), después se prepararon tubos eppendorf con diferentes concentraciones (100, 50, 25 y 12,5%) del

sobrenadante en los cuales se inocularon 5 μ L de las cepas de prueba y se incubaron por 12 horas a 37 °C. Por último, se sembraron 10 μ L de cada uno de los tubos en placas con agar MH para evaluar el crecimiento (Wiegand et al., 2008).

7.4.4. Técnica de difusión en pozo

Para evaluar la actividad inhibitoria se usó también la prueba de difusión en pozo con algunas variaciones: 1) Sobre placas con 20 mL de agar MH se realizó una siembra con hisopo de las cepas de prueba (*E. coli* y *S. aureus*, 37 °C – 12 h) de forma independiente, después se realizaron 5 pozos en el agar con una pipeta Pasteur los cuales se sellaron en la base con 20 μ L de agar MH. Por último se colocaron los controles (agua destilada estéril y antibiótico) y 20 μ L del sobrenadante de los aislados en cada uno de los pozos. 2) Sobre dos placas con agar MH se realizaron 5 pozos con una pipeta Pasteur y se sellaron en la base con 20 μ L de agar MH, se agregaron los controles (agua destilada estéril y antibiótico) y 20 μ L del sobrenadante de los aislados termófilos en cada uno de los pozos, por último se cubrió una placa con 10 mL de *soft agar* inoculado con las cepas de prueba y otra placa con 9 mL de agar MH (concentración normal) más 1 mL de las cepas de prueba (Balouiri et al., 2016).

7.4.5. Agar Deferred spot

Se realizó una siembra de los aislados termófilos (una o dos colonias) en el centro de placas MH, se incubó a 50 °C por 18 horas. Por otra parte, se realizaron cultivos de las cepas de prueba en placas MH a 37 °C por 12-14 horas. Una vez se observó crecimiento en las cepas de pruebas, se suspendieron en una solución salina estéril (0,85%) se mezclaron con agar MH (45 °C) y se preparó el *soft agar* que posteriormente fue depositado sobre las placas donde crecieron los

aislados termófilos, se llevó a incubación a 37 °C por 18 horas y se observó la presencia de actividad inhibitoria (Alkhalili et al., 2016).

7.4.6. Confirmación de la naturaleza proteica

Siguiendo el mismo protocolo explicado anteriormente se procedió a confirmar si la sustancia causante de la inhibición era de naturaleza proteica, para esto a un lado de las colonias de los mejores aislados termófilos se agregaron 3 µL de proteinasa K (2 mg/mL) y se dejó incubar por 2 horas a 37 °C, seguido de esto se agregó la capa superior de *soft agar* con *S. aureus*. Se dejó incubar a 37 °C por 12-18 horas y se observó el halo de inhibición (Alkhalili et al., 2016).

7.4.7. Extracción de bacteriocinas

En 250 mL de caldo TS se inoculó 2,5 mL de cada uno de los aislados termófilos que presentaron inhibición (303-1 A y LB 102-1) y se llevó a incubación a 50 °C por 18 horas. Después se realizó una centrifugación a 7100 g (12 °C) por 15 minutos. 25 mL del sobrenadante se pasaron a tubos falcon y se mezclaron con 12,5 mL de cloroformo en shaker por 20 minutos. Después se procedió a centrifugar a 10400 g (12 °C) por 20 minutos. Se recuperó la interfase y se resuspendió en 5-10 mL de Tris buffer 0,1 mol pH 7,0 para volver a ser centrifugado y eliminar la mayor cantidad de cloroformo y medio de cultivo. Se recuperó el sedimento y se dejó sobre una placa en incubadora a 37 °C para el secado. Al siguiente día se hizo un raspado del polvo en la placa, se resuspendió en Tris buffer 0,1M pH 7,0 y se dejó en refrigeración (Burianek & Yousef, 2000).

Después del proceso de extracción se realizó la prueba de siembra masiva para evaluar la actividad inhibitoria de las bacteriocinas. Se utilizaron sensidiscos impregnados con 15 µL de cada uno de los extractos y tambien se uso un sensidisco impregnado con cloroformo como control.

7.4.8. SDS-PAGE

Los extractos fueron separados por electroforesis vertical en geles SDS - poliacrilamida a 10%, utilizando el sistema Bio-Rad Mini Protean III. El gel separador y el espaciador se prepararon a partir de una solución 30%: 0,8% de acrilamida: bisacrilamida con un grosor de 1,5mm. El gel separador se preparó a 10% de poliacrilamida, incluyendo 375 mM de Tris (pH 8,8), 0,1% de SDS, 0,03% de TEMED y 0,004% de persulfato de amonio. El gel espaciador se preparó a 3,8% de poliacrilamida, incluyendo 125 mM de Tris (pH 6,8), 0,1% de SDS, 0,04 % de TEMED y 0,01% de persulfato de amonio. De cada uno de los extractos se cargaron en el gel 80 µg de proteínas totales disueltas en buffer de carga 5X (5% de SDS, 50% de glicerol, 0,05% azul de bromofenol, 50 mM de DTT y 0,125M de Tris-HCl pH 6,8), realizándose la separación electroforética durante 2 horas a un voltaje constante de 90 V en solución de corrida 25 mM Tris (pH 8,3), 190 mM de glicina y 0,1% de SDS (Alkhalili et al., 2016).

7.5. Detección de la actividad celulolítica

Para detectar la hidrólisis de celulosa se usó un medio de cultivo suplementado: carboximetil celulosa (10 g/L), extracto de levadura (2,5 g/L), peptona (2,5 g/L), sulfato de calcio (0,5 g/L), cloruro de calcio (0,5 g/L), fosfato monobásico de potasio (0,1 g/L), fosfato dibásico de potasio (0,1 g/L) y agar (15 g/L). El revelado de las placas se realizó adicionando sobre las colonias Rojo Congo durante 10 minutos, seguidamente, se retiró el Rojo Congo y se cubrió con

solución salina 1M, durante una hora. Al término de la hora, se eliminó la solución salina y se cubrió con ácido acético al 2%, por diez segundos para evidenciar los halos de hidrólisis que fueron medidos con un calibrador electrónico (Flórez et al., 2015).

7.6. Detección de la actividad lipolítica

Se preparó agar LB a una concentración de 10 g/L y se agregó triton X-100 (0,1% v/v), rodamina B (0,01% p/v); como fuentes de carbono se utilizaron: tween 80 y aceite de oliva (1% v/v). Para el revelado de los halos de hidrólisis se utilizó un transiluminador UV (González, 2010).

8. Resultados

8.1. Aislamiento e identificación de los aislados bacterianos

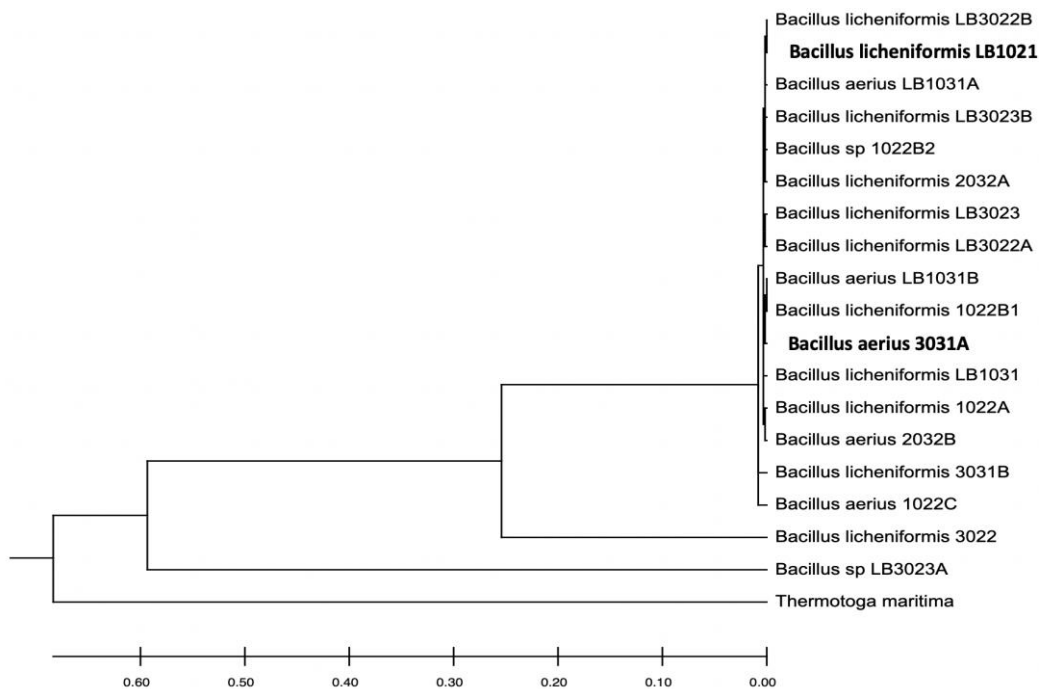
A partir de los tubos de preservación iniciales se realizaron pases repetitivos en agar nutritivo hasta obtener un total de 18 aislados axénicos, los cuales presentaron formas bacilares y todos fueron Gram positivos, la mayoría de las colonias presentaron características como: forma irregular, margen ondulado, elevación plana, superficie áspera, textura membranosa, opaca, tamaño mediano y color blanco (Anexo 1). Las pruebas bioquímicas indican un relacionamiento de los aislados con el género *Bacillus*, se presentan en el anexo 2.

Los aislados fueron identificados sobre la base de las secuencias del gen 16S rRNA, se realizó una comparación de las secuencias con las bases de datos: GenBank y Ribosomal Database Project (RDP) y se asignaron las especies dependiendo del porcentaje de identidad, cobertura, valor *e* y el posible origen del aislado (termófilo).

Tabla 3. Identificación de los aislados termófilos por comparación con RDP y GenBank.

Aislado	% Ident.	Especie
LB 302-3 A	93,6	<i>Bacillus sp.</i>
LB 302-3 B	98,83	<i>Bacillus licheniformis</i>
LB 302-3	99,23	<i>Bacillus licheniformis</i>
LB 302-2 A	97,25	<i>Bacillus licheniformis</i>
LB 302-2 B	98,91	<i>Bacillus licheniformis</i>
LB 103-1 A	98,23	<i>Bacillus aerius</i>
LB 103-1 B	98,62	<i>Bacillus aerius</i>
LB 103-1	98,6	<i>Bacillus licheniformis</i>
LB 102-1	99,46	<i>Bacillus licheniformis</i>
102-2 A	98,13	<i>Bacillus licheniformis</i>
102-2 B1	98,46	<i>Bacillus licheniformis</i>
102-2 B2	97,97	<i>Bacillus sp.</i>
102-2 C	98,01	<i>Bacillus aerius</i>
203-2 A	98,6	<i>Bacillus licheniformis</i>
203-2 B	98,97	<i>Bacillus aerius</i>
302-2	97,42	<i>Bacillus licheniformis</i>
303-1 A	98,68	<i>Bacillus aerius</i>
303-1 B	96,81	<i>Bacillus licheniformis</i>

Figura 1. Árbol filogenético de los aislados termófilos, construido en el programa MEGA X 10.1, tomando los criterios *Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean* (UPGMA). En negrita se observa los dos aislados que presentaron inhibición sobre *S. aureus*.



8.2. Detección de la actividad antimicrobiana

Se evaluó la actividad inhibitoria de los 18 aislados con el método Spot en capa, la preparación del agar blando con las cepas de prueba dificultó la técnica debido a que se observaba inhibición en el control negativo y también fuera de los puntos de evaluación donde el vapor de las placas también generó inhibición de las bacterias de prueba. Debido a que el control negativo no funcionó en la técnica, no se puede afirmar que el sobrenadante de los aislados termófilos genere inhibición ya que podría ser un falso positivo, por lo tanto, se utilizaron técnicas diferentes para evaluar la actividad inhibitoria.

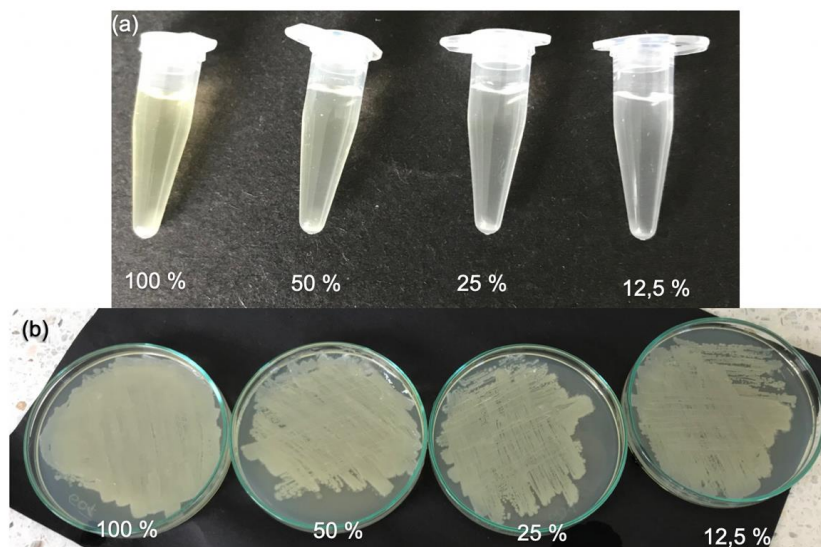
Se probó diferentes controles negativos como agua miliQ, agua de corriente estéril y agua destilada estéril utilizando el método de siembra masiva con las cepas de prueba, los controles funcionaron correctamente y se realizó esta técnica como alternativa para evaluar actividad inhibitoria. La técnica de siembra masiva se trabajó con una variación en la concentración del agar para evaluar la difusión del sobrenadante de los termófilos y además se probó distintas maneras de inocular el sobrenadante en el papel filtro: uno con exposición a UV, sin exposición a UV, por último, una gota de 10 μ L del sobrenadante. No se observó halo de inhibición ni diferencias en la difusión del sobrenadante en las dos concentraciones de agar probadas, tampoco se logro observar diferencias entre los distintos tratamientos en los que fue impregnado el sobrenadante sobre los sensidiscos, puesto que eran idénticos al control negativo. Fue posible observar variaciones en la difusión del control positivo (Amikacina) entre las dos concentraciones de agar probadas, el antibiótico tuvo mayor difusión (mayor halo) en el agar a mitad de la concentración (Figura 2).

Figura 2. Placas de agar Mueller Hinton a concentración normal (a) y a la mitad de la concentración (b). Sensidisco expuesto a UV con sobrenadante # 1, sensidisco sin exposición a UV con sobrenadante # 2, sensidisco con agua # 3, gota de sobrenadante (10 μ L) # 4, amikacina # 5.



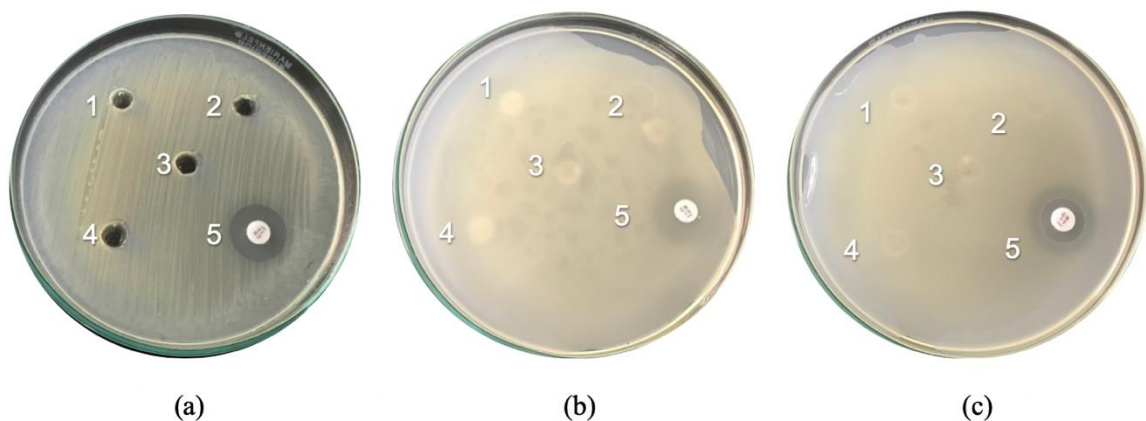
Se realizó también una técnica para determinar la concentración inhibitoria del sobrenadante de los termófilos en tubos eppendorf a diferentes concentraciones, pero al comprobar el crecimiento de las cepas de prueba en placas de agar MH (Figura 3, b) no se observó diferenciación entre las concentraciones (100, 50, 25 y 12,5 %) en todas crecieron de igual forma.

Figura 3. Técnica para determinar la concentración inhibitoria del sobrenadante de los aislados termófilos.



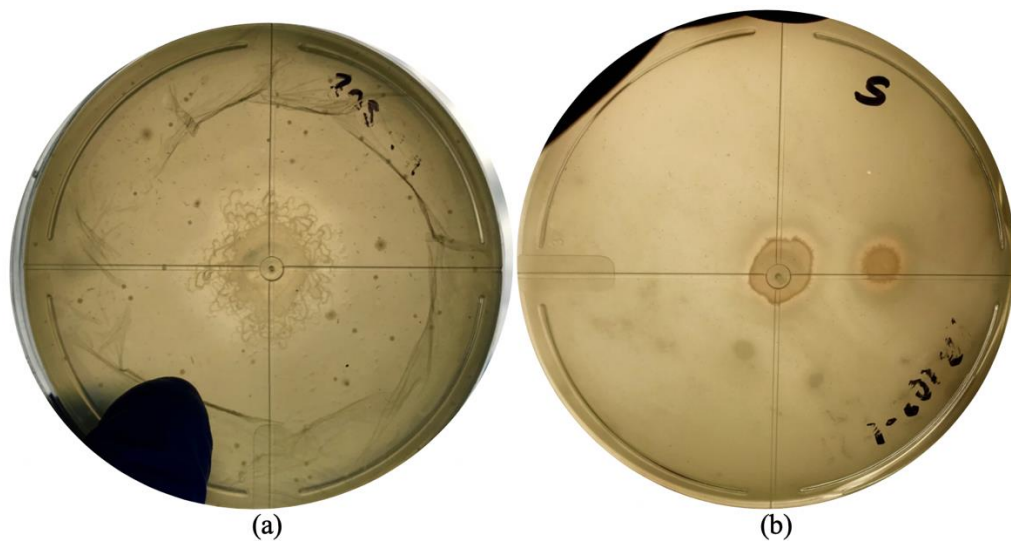
Con la primera técnica de difusión en pozo probada el control negativo funcionó correctamente, no generó halo de inhibición. El control positivo (antibiótico) generó halo de inhibición y tuvo una buena difusión en el agar. Aquellos pozos que contenían 20 μ L del sobrenadante de los aislados termófilos no generaron halo de inhibición evidente con esta técnica (Figura 4, a). Con la segunda técnica de difusión en bicapa se tenía dos variaciones, en la primera, que consistió en una segunda capa de agar blando, ambos controles funcionaron correctamente, pero los pozos con el sobrenadante de los aislados termófilos no generaron inhibición sobre las bacterias de prueba y además se tuvo el mismo problema con las manchas de inhibición fuera de los pozos debido al vapor generado en la placa (Figura 4, b). La otra variación de la técnica fue con una segunda capa de agar MH a concentración normal más 1 mL de las bacterias de prueba, aquí los controles funcionaron correctamente y no se tuvo el problema de las manchas de inhibición como la prueba anterior pero los pozos que contenían el sobrenadante de los aislados termófilos no presentaron halo de inhibición (Figura 4, c).

Figura 4. Técnica de difusión en pozo trabajada con las tres variaciones, en la primera solo se trabajo con una capa de agar y en las dos siguientes se trabajo con 2 capas de agar a diferente concentración para evaluar la difusión de la sustancia de interés. Los pozos # 1, 3, 4 corresponden al sobrenadante de los aislados termófilos cada uno con 20 μ L, los pozos # 2, 5 corresponden a los controles negativo y positivo, respectivamente.



Por ultimo se realizó la prueba *Agar-Deferred Spot*, en la cual 2 aislados termófilos fueron capaces de generar un halo de inhibición bastante notable contra la bacteria patógena de prueba *S. aureus* (Figura 5), por otra parte, ninguno de los aislados termófilos generó inhibición sobre *E. coli*, demostrando así sus fuertes mecanismos de resistencia.

Figura 5. Actividad antibacteriana de los aislados termófilos (a) 303-1 A y (b) LB 102-1 contra *S. aureus*. Alrededor de las colonias de los aislados termófilos se puede observar una zona mas clara que corresponde a la zona de inhibición.



Con base en los anteriores resultados se verificó si la sustancia causante de la inhibición de *S. aureus* en los aislados era de naturaleza proteica. Aquel lado que no fue tratado con proteinasa K (2 mg/mL) presentó inhibición donde se observó una zona más clara, contrario el lado que fue tratado, el cual no presenta zona de aclaramiento alrededor de la colonia confirmando así que las sustancias causantes de la inhibición son péptidos.

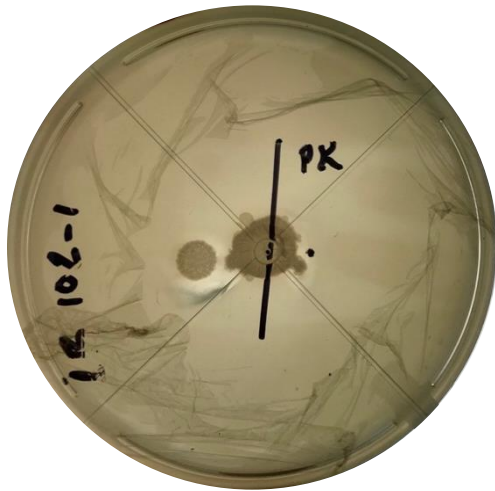
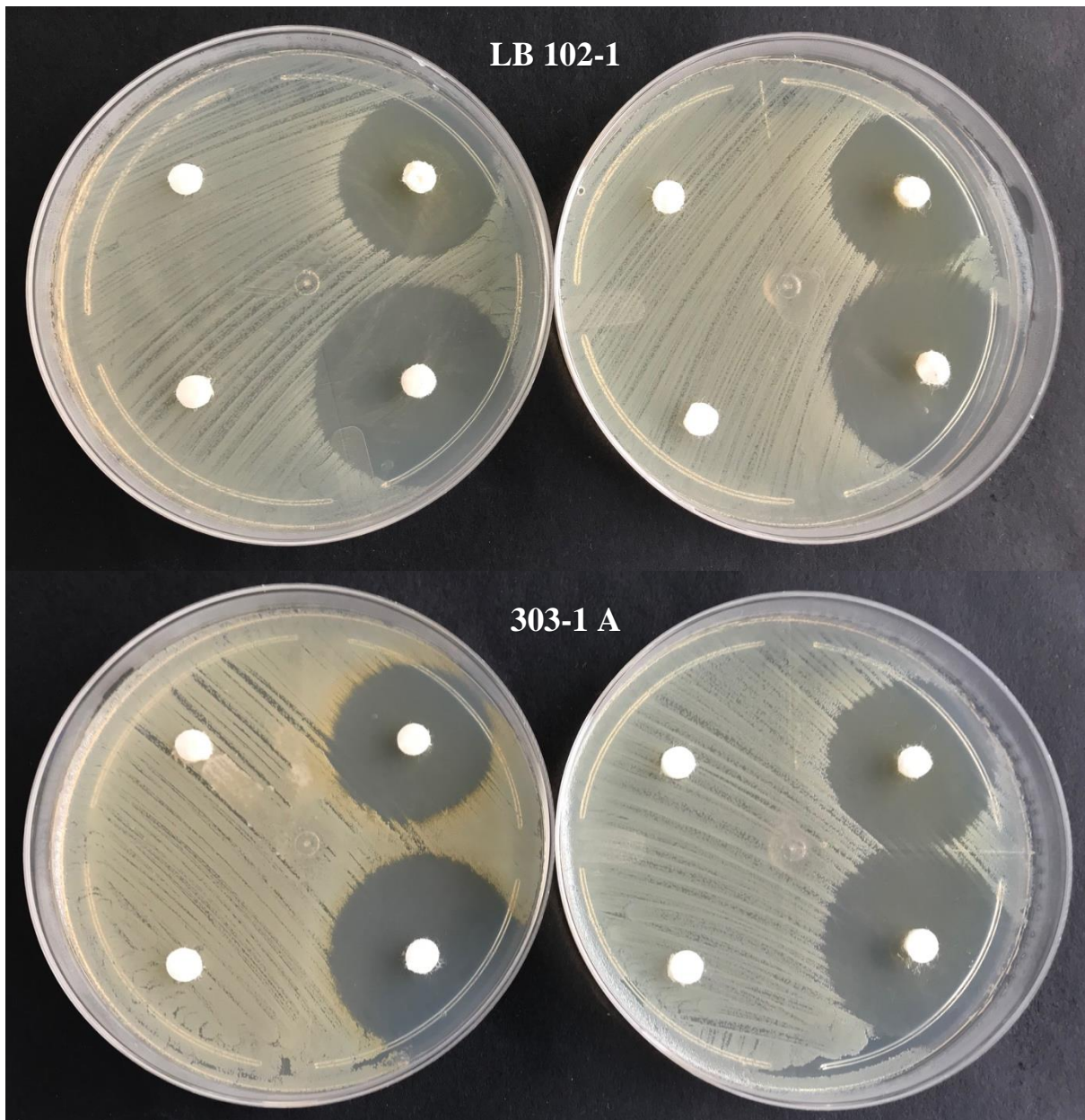


Figura 6. Tratamiento con proteinasa K para confirmación de la naturaleza proteica de la sustancia inhibitoria. La colonia del aislado se dividió en dos lados con una recta, en el lado derecho (PK) se agregaron 2 μ L de la enzima para que impidiera la acción de las bacteriocinas contra *S. aureus*. El lado izquierdo no fue tratado con proteinasa y se observa

una zona de inhibición.

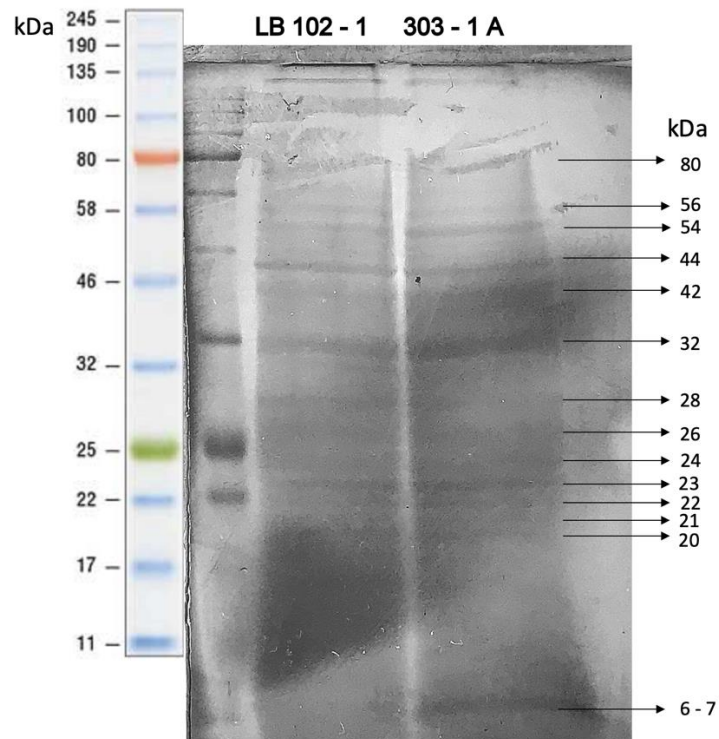
Del proceso de extracción de bacteriocinas se logro recuperar 1 mg del aislado LB 102-1 y 3 mg del aislado 303-1 A, los cuales fueron resuspendidos en 300 y 100 μ L de Tris buffer 0,1M, respectivamente. Seguido de esto se realizó la prueba de siembra masiva para evaluar la actividad inhibitoria de las bacteriocinas. Se utilizaron sensidiscos impregnados con 15 μ L de cada uno de los extractos y tambien se usó un sensidisco impregnado con cloroformo como control. Ambos extractos generaron halos de inhibición bastante sigficativos con un promedio de 28,90 mm y 27,90 mm de diametro para 303-1 A y LB 102-1, correspondientemente, mostrando la eficiencia de las bacteriocinas contra bacterias Gram postivas patogenas.

Figura 7. Halos de inhibición producidos por los extractos de bacteriocinas de los aislados termófilos 303-1 A y LB 102-1. Sensidisco con 15 μ L de cloroformo # 1, sensidisco con agua # 2, sensidisco con 15 μ L de extracto de bacteriocinas # 3, sensidisco con antibiótico # 4.



El proceso de cuantificación de proteínas utilizando el método de Bradford, arrojó una concentración de 6,397 μ g/ μ L para el aislado 303-1 A y 5,511 μ g/ μ L para el aislado LB 102-1. Después se realizó el proceso de electroforesis cuyo gel se puede observar en la figura 8.

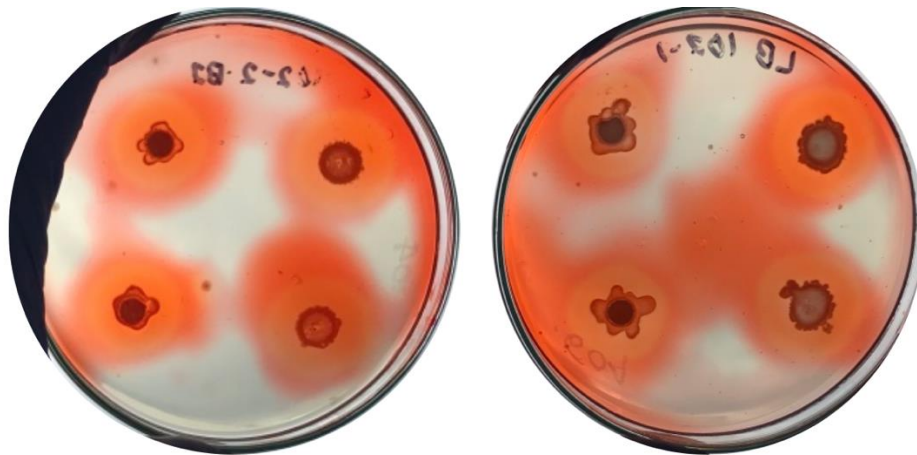
Figura 8. Patron de bandeo del extracto proteico de cada uno de los aislados que presentaron inhibicion sobre *S. aureus*. Las bandas se observan a partir de los 80 kDa, esto indica el bajo peso molecular de las proteínas, característico de las bacteriocinas.



8.3. Actividad enzimática

La mayoría de los aislados termófilos presentaron halo alrededor de la colonia, en 2 aislados no se logró visualizar halo, y en los otros dieciséis la amplitud varió entre 10 y 22,2 mm de diámetro. En general los aislados presentaron actividad celulolítica, los resultados se muestran en el anexo 3.

Figura 9. Halos de hidrólisis de celulosa con aislados termófilos.



Con el experimento realizado para hidrólisis de los sustratos lipídicos, tween 80 y aceite de oliva, no fue posible observar actividad lipolítica.

9. Discusión

El aislamiento de bacterias de aguas termales del volcán Chiles fue llevado a cabo a 50 °C, se obtuvieron un total de 18 aislados termófilos, el cual es un número relativamente bajo si se compara con los reportes de Cabrera & Díaz (2003) donde se obtuvieron un total de 61 aislados para la misma fuente termal, con condiciones fisicoquímicas similares. Según las características microscópicas todos los aislados corresponden en su totalidad a bacilos Gram positivos. En general las características morfológicas presentan uniformidad a excepción de algunas diferencias en los aislados LB 103-1 A, LB 103-3 1, 102-2 A, 102-2 B1 y 102-2 C. Las pruebas bioquímicas realizadas indican un relacionamiento de los aislados hacia el género *Bacillus*. El dendrograma de las pruebas bioquímicas (Anexo 3) muestra la formación de dos clusters al igual que el análisis filogenético de las secuencias, en el cluster más grande se ubican la mayoría de los aislados los cuales comparten 67% de similaridad, y otro cluster conformado por los aislados LB 302-3 B y LB 302-3 A. Este último concuerda con lo presentado en el árbol filogenético el cual presenta diferencias filogenéticas significativas con respecto a los demás,

pero el aislado 302-2, que presenta mayor distancia filogenética en el árbol, aparece en las pruebas bioquímicas agrupado con el cluster mayor donde están 16 de los 18 aislados. Muchas de las características morfológicas y bioquímicas se comparten con los aislados obtenidos por Cabrera & Díaz (2003). En el árbol filogenético se puede observar la formación de dos clusters, el primero constituido por las especies del género *Bacillus* y el segundo donde se encuentra el *outgroup* (*Thermotoga maritima*). En el primer cluster, los aislados se agrupan en dos especies: un 60 % pertenecen *Bacillus licheniformis* y un 30 % a *Bacillus aerius*, la distancia evolutiva entre ellos es pequeña a excepción de dos cepas a las cuales no fue posible determinar su origen termófilo, la primera *Bacillus licheniformis* 3022 presentó menor distancia posiblemente debido a procesos de mutación, y la segunda que presentó la mayor distancia evolutiva se dejó como *Bacillus sp.*

Para evaluar la actividad inhibitoria de los aislados termófilos primero se probaron varias técnicas que consistían en un aislamiento primario de las sustancias antimicrobianas, para ello se realizó un proceso incubación de los aislados en medio líquido, después centrifugación para eliminar las células y se trabajó con el sobrenadante en pruebas como: Spot en capa, siembra masiva, difusión en pozo y determinación de la concentración mínima inhibitoria, en todas estas pruebas no se logró observar halos de inhibición sobre las bacterias patógenas probadas. Observaciones similares se han reportado anteriormente con otras cepas termófilas, Alkhalili et al. (2016) en un estudio de los péptidos antimicrobianos de *Geobacillus sp.* reporta una pérdida total de la actividad antibacteriana en el sobrenadante cuando el aislado se cultivo en medio líquido durante toda la noche. Por otra parte, Edalatian et al. (2012) en un estudio de la producción de bacteriocinas por la cepa *Enterococcus spp.* obtiene 48 aislados que presentan actividad inhibitoria en medio sólido, los mismos fueron utilizados para la producción de los antimicrobianos en medio líquido contra las cepas indicadoras, pero bajo estas condiciones tan

solo 20 de los 48 aislados mostraron actividad inhibitoria, lo cual demuestra una importante disminución en la producción de estos compuestos. La producción de péptidos antimicrobianos como las bacteriocinas empieza con la formación de un prepéptido, que posee una secuencia señal N-terminal que está unido al propéptido C-terminal. Luego de la formación del prepéptido, a través de transportadores ABC se lleva fuera de la célula. Por ser moléculas de naturaleza anfifílica, una vez fuera de la célula y al entrar en contacto con el agua, posiblemente entre las moléculas se pueden llegar a formar micelas las cuales interfieran en la actividad antimicrobiana. Por lo tanto, es probable que el crecimiento celular y la producción de péptidos antimicrobianos se facilite en un medio de estado solido.

La siguiente prueba realizada para evaluar la actividad inhibitoria fue *Agar-Deferred Spot*, a diferencia de las pruebas basadas en medios de cultivo líquidos, en esta se observó la producción de sustancias inhibitorias de naturaleza proteica, esto se comprobó con la adición de la proteinasa K sobre la colonia del aislado termófilo, cuya acción impidió la inhibición de la cepa de prueba *S. aureus* (Figura 6). Es importante notar que de los 18 aislados solo 2 produjeron péptidos antimicrobianos efectivos contra *S. aureus* (Figura 5), y ninguno inhibió el crecimiento de *E. coli*. Estos resultados concuerdan con la mayoría de las investigaciones realizadas sobre péptidos antimicrobianos, donde se ha demostrado que la actividad bactericida se dirige principalmente contra bacterias Gram positivas (Martirani et al., 2002; Aun et al., 2009; Pokusaeva et al., 2009; Beristain et al. 2012; Edalatian et al., 2012; Alkhalili et al. 2016). Con relación a esto, existen trabajos enfocados a evaluar el potencial de inhibición de los péptidos antimicrobianos sobre bacterias multiresistentes, donde se utilizan técnicas de microscopia electrónica de barrido para evaluar los daños producidos sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas, estos principalmente demuestran que existen mayores porcentajes de actividad y mayores daños a nivel celular sobre bacterias patógenas Gram positivas, además

se evidencia que la formación de poros en la envoltura celular de las células sensibles es el modo clave de acción (Yi, et al., 2016¹; Yi, et al., 2016²; Ullah et al., 2017).

Existen diversas razones que pueden explicar este fenómeno, según Beristain et al. (2012) y Alkhalili et al. (2016) esto puede ser debido a las diferentes estructuras de la pared celular, en bacterias Gram negativas la capa de peptidoglucano está protegida por otra membrana principalmente compuesta de lipopolisacáridos, mientras que en Gram positivas esta capa esta directamente expuesta a factores externos, incluidas enzimas líticas de la pared celular y péptidos antimicrobianos.

Otra posible explicación a la resistencia podrían ser cambios en la composición de ácidos grasos de la membrana celular. El aumento de la proporción de ácidos grasos saturados y ácidos grasos de cadena ramificada en las variantes resistentes a las bacteriocinas se explica como una adaptación hacia una mayor rigidez de la membrana, menor fluidez, que evita la penetración de las bacteriocinas en la célula. Actualmente existen muchas investigaciones que reportan diversos mecanismos para contrarrestar el efecto de las bacteriocinas, especialmente en bacterias Gram negativas (Kumariya et al., 2019).

La sensibilidad de los microorganismos a los péptidos antimicrobianos principalmente se debe a su interacción con la superficie celular y con la membrana celular. Las bacteriocinas asumen configuraciones de modo que los grupos con carga positiva interactúan electrostáticamente con la superficie de la célula bacteriana con carga negativa, mientras que las superficies hidrófobas se alinean hacia la membrana y atraviesan la bicapa lipídica. Después de perforar la bicapa lipídica, los péptidos se autoasocian o polimerizan para formar complejos. Las bacteriocinas inducen la permeabilización de la membrana celular de la bacteria diana, probablemente formando poros que causan la disipación de la fuerza protón motriz y una

disminución de ATP intracelular, la fuga de sustratos intracelulares y la muerte eventual. Con base en este modo generalista de acción entre las bacteriocinas, las bacterias diana pueden evadir su acción mediante la neutralización de la carga neta negativa de la pared celular, impidiendo su interacción. La carga negativa de la pared celular bacteriana disminuye al adquirir resistencia a la bacteriocina debido a los cambios en la composición del ácido teicoico. Normalmente, el ácido teicoico imparte una carga negativa a la pared celular, pero cuando sufre D-alanilación, imparte una carga positiva a la pared celular, lo que resulta en la neutralización del polímero aniónico (Cardoso, 2012; Kumariya et al., 2019; Vasilchenko & Valyshev, 2019).

Una vez hecho el proceso de extracción de bacteriocinas en los dos aislados que produjeron inhibición, se realizó la prueba de siembra masiva para evaluar su efectividad, se utilizó un control con cloroformo para descartar que la inhibición se realice por la acción del solvente y efectivamente no presentó halo. Ambos extractos generaron halos de inhibición bastante significativos sobre *S. aureus* con un promedio de 28,90 mm y 27,90 mm de diámetro para 303-1 A y LB 102-1, respectivamente (Figura 7). En los últimos años algunas investigaciones sobre bacteriocinas han descrito que su actividad inhibitoria podría aumentar si se somete a un proceso de purificación adecuado, como se observa en este trabajo (Cardoso, 2012; Kumariya et al., 2019). Estos resultados son prometedores si se comparan con investigaciones donde se evalúa el efecto de las bacteriocinas después de procesos de extracción como lo realizado por Aun et al. (2009) cuyo valor máximo de inhibición sobre *S. aureus* fue 22 mm o Yi, et al. (2016) cuyo promedio de inhibición sobre cepas resistentes de *S. aureus* fue de 21 mm. Por otro lado, existen investigaciones como la de Martirani et al. (2002) o Pokusaeva et al. (2009) donde las bacteriocinas evaluadas no logran inhibir el crecimiento de *S. aureus*.

El peso molecular de las bacteriocinas parcialmente purificadas se evaluó mediante electroforesis en gel SDS-poliacrilamida. El bandeo que se observa desde los 80 kDa en las dos cepas es idéntico hasta las bandas de 20 kDa, pero se logra observar una banda diferencial en la cepa 303-1 A cuyo peso molecular aproximado está entre 6 y 7 kDa. Con base en su peso molecular, la cepa 303-1 A probablemente esté produciendo bacteriocinas de clase II cuya característica principal es un peso menor a 10 kDa, además, diversos autores proponen que las bacteriocinas de esta clase se caracterizan por tener una alta estabilidad al calor y mayormente son producidas por microorganismos Gram positivos, dentro de los que se encuentran los microorganismos termófilos (Chen y Hoover, 2003; Dimov et al., 2005; Beristain et al. 2012; Kumariya et al., 2019; Vasilchenko & Valyshev, 2019).

En adición a la actividad inhibitoria se evaluó la actividad celulolítica en los 18 aislados termófilos. El promedio de la medida de los halos de hidrólisis fue de 16 mm; es importante resaltar el aislado LB 102-1, que además de presentar potencial inhibitorio, su promedio de hidrólisis de celulosa está entre los más altos reportados con una medida de 22,43 mm, haciendo de este un microorganismo con potenciales aplicaciones biotecnológicas e industriales. Los resultados obtenidos en los aislados termófilos son bastante prometedores al comparar los halos de hidrólisis con otros trabajos relacionados como Mikán & Suárez (2004); Guzmán et al. (2015) y Málaga & Cabrera (2017) donde se evaluó el potencial celulítico de bacterias termófilas aisladas de diversas fuentes sobre un cultivo suplementado con carboximetil celulosa, los resultados obtenidos mostraron máxima actividad con halos entre los 10 y 12 mm.

10. Conclusiones

A través de este estudio fue posible descubrir una importante diversidad de microorganismos que contribuyen al conocimiento de los ambientes termales en el departamento de Nariño.

Los aislados termófilos, *Bacillus licheniformis* LB1021 y *Bacillus aerius* 3031A parecen ser una fuente de moléculas antimicrobianas capaces de inhibir el crecimiento de cepas patógenas resistentes como *S. aureus*.

A través de este estudio fue posible demostrar las características altamente resistentes de cepas patógenas como *E. coli* aisladas de muestras clínicas dentro del departamento de Nariño.

El análisis de los péptidos antimicrobianos producidos por *Bacillus licheniformis* LB1021 y *Bacillus aerius* 3031A a través de SDS-PAGE reveló que posiblemente estos microorganismos estén produciendo bactericinas termoestables de clase II.

11. Recomendaciones

Se recomienda realizar procesos de producción de péptidos antimicrobianos mayoritariamente sobre medio sólido y evaluar más factores tales como temperatura, pH y composición del medio los cuales pueden influir sobre la producción de los péptidos.

Se recomienda ampliar la gama de microorganismos para evaluar sobre ellos el efecto inhibitorio de los péptidos antimicrobianos, microorganismos cercanamente relacionados con las cepas productoras y también microorganismos patógenos.

12. Referencias bibliográficas

Abián, J., Carrascal, M., & Gay, M. (2008). Introducción a la Espectrometría de masas para la caracterización de Péptidos y proteínas en Proteómica.

Agudelo, N. (2013). Estado del arte de la obtención de bacteriocinas a partir de bacterias ácido lácticas y su aplicación en la industria de alimentos. Universidad Pontificia Bolivariana. Medellín.

Alba Cuecas, M. (2017). Vida microbiana a temperaturas elevadas. Diversidad, aislamiento, termoestabilidad molecular y genómica. Universidad de Sevilla, España.

Al-Dhabi, N., Esmail, G., Duraipandiyar, V., Arasu, V., & Salem-Bekhit, M. (2016). Isolation, identification and screening of antimicrobial thermophilic *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-1 isolated from Tharban hot spring, Saudi Arabia. *Extremophiles*, 20(1), 79-90.

Alkhalili, R., Bernfur, K., Dishisja, T., Mamo G., Schelin, J., Canbäck, B., Emanuelsson, C. & Hatti-kaul, R. (2016). Antimicrobial protein candidates from the thermophilic *Geobacillus* sp. Strain ZGt-1: Production, proteomics, and bioinformatics analysis. *International Journal of Molecular Sciences*.

Aun, S., Ahmad, S. & Hameed, A. (2009). Antibiotic production by thermophilic *Bacillus* species SAT-4. Quaid-i-Azam University, Pakistan.

Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71-79.

Beristain, S., Palou, E. y López, A. (2012). Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. Universidad de las Américas Puebla. México.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

Brock, T. (2012). *Thermophilic microorganisms and life at high temperatures*. Springer Science & Business Media.

Buitrago, E., Hernández, C., Pallares, C., Pacheco, R., Hurtado, K., & Recalde, M. (2014). Frecuencia de aislamientos microbiológicos y perfil de resistencia bacteriana en 13 clínicas y hospitales de alta complejidad en Santiago de Cali-Colombia. *Infectio*, 18(1), 3-11.

Burbano, M., Caetano de Almeida, B. & Otero, I. (2017). Manual de Biología Molecular- Procedimientos Básicos. Manual de Biología Molecular- Procedimientos Básicos. Pasto, Colombia.

Burianek, L., & Yousef, A. (2000). Solvent extraction of bacteriocins from liquid cultures. *Letters in applied microbiology*, 31(3), 193-197.

Cabrera, A., Díaz, R. (2003). Aislamiento y caracterización parcial de bacterias termófilas amilolíticas de las fuentes termales del volcán Chiles departamento de Nariño. Universidad de Nariño.

Calero, A., Llanos, A., Villena, C., Quispe, I., Málaga, H., & Cabrera, R. (2017). Caracterización de dos bacterias termófilas (BP-2 Y BP-4) con capacidad proteolítica aislados en los géiseres de Candarave. Tacna-Perú. *CIENCIA & DESARROLLO*, (19).

Canales, P. (2013). Caracterización molecular de bacterias amilolíticas aisladas de las salinas de San Blas-Junín.

Cardoso, M. (2012). *Caracterización y purificación parcial de sustancias tipo bacteriocinas producidas por cepas de Enterococcus* (Doctoral dissertation).

Castro, R., Álvarez, A., Machado, E., Mendoza, M., Gómez, R., & García, P. (2011). Caracterización de una quitinasa extracelular producida por *Serratia* sp. BIOMI-363706 usando quitina coloidal como sustrato. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 77(2), 101-108.

Chen, H. y Hoover, D. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2:82-100.

Cuecas, A. (2017). Vida microbiana a temperaturas elevadas. Diversidad, aislamiento, termoestabilidad molecular y genómica.

Cui, S., Li, J., Hu, C., Jin, S., Li, F., Guo, Y., Ran., L. & Ma, Y. (2009). Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from swine and workers in China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(4), 680-683.

Dimov, S., Ivanova, P., Harizanova, N.T. y Ivanova, I.V. (2005). Bioactive peptides used by bacteria in the concurrence for the ecological niche: general classification and mode action (overview). *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. (2):3-22.

Dutta, S., Park, Y., & Park, K. (2016). Proteolytic activity of thermophilic *Bacillus licheniformis* strain SF5-1 for the efficient bioconversion of pork waste to amino acid fertiliser. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 111, 31-36.

Edalatian, M., Najafi, M., Mortazavi, S., Alegría, Á., Delgado, S., Bassami, M., & Mayo, B. (2012). Production of bacteriocins by *Enterococcus* spp. isolated from traditional, Iranian, raw milk cheeses, and detection of their encoding genes. *European Food Research and Technology*, 234(5), 789-796.

Ferreras, E. (2011). Expresión y estudio de enzimas termoestables de interés biotecnológico. Universidad Autónoma de Madrid, España.

Flórez, P., Guerra, D., & Rosero, S. (2015). DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UN INÓCULO DE BACTERIAS CELULOLÍTICAS. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 18(1).

Franco González, L. (2010). Evaluación de la actividad lipolítica de microorganismos aislados de suelos del Parque Natural Nacional (PNN) Los Nevados (Bachelor's thesis, Facultad de Ciencias).

Gálvez, A., Abriouel, H., López, R., & Omar, N. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International journal of food microbiology*, 120(1-2), 51-70.

González, M., López, J., & Barba, A. (2010). EXPRESIÓN A GRAN ESCALA DE LA ENDOQUITINASA *Trichoderma harzianum* en *Escherichia coli*.

Gutiérrez, A., Martínez, E., Valencia, M., León, M., de la Fuente, N., Bideshi, D., & Barboza, J. (2016). Potential use of *Bacillus thuringiensis* bacteriocins to control antibiotic-resistant bacteria associated with mastitis in dairy goats. *Folia microbiologica*, *61*(1), 11-19.

Guzmán, Á., Zambrano, D., Rivera, R., Rondón, A., Silva, M., & Pérez, M. (2015). Aislamiento y selección de bacterias autóctonas de Manabí-Ecuador con actividad celulolítica. *Cultivos Tropicales*, *36*(1), 7-16.

Hospital Departamental de Nariño. (2015). Boletín epidemiológico periodo Enero-septiembre 2015. Pasto- Nariño, Colombia.

Kaškonienė, V., Stankevičius, M., Bimbraitė, K., Naujokaitytė, G., Šernienė, L., Mulkytė, K., & Maruška, A. (2017). Current state of purification, isolation and analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, *101*(4), 1323-1335.

Kumariya, R., Garsa, A., Rajput, Y., Sood, S., Akhtar, N., & Patel, S. (2019). Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. *Microbial pathogenesis*.

LEYVA, S. (2016). Aislamiento, caracterización e identificación molecular de microorganismos productores de lipasas nativos del estado de Sinaloa.

Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2017). *Brock biology of microorganisms* (Vol. 13). Pearson.

Macaluso, G., Fiorenza, G., Gaglio, R., Mancuso, I., & Scatassa, M. (2016). In vitro evaluation of bacteriocin-like inhibitory substances produced by lactic acid bacteria isolated during traditional Sicilian cheese making. *Italian journal of food safety*, 5(1).

Málaga, H., & Cabrera, R. (2017). Aislamiento e identificación de bacterias celulolíticas termófilas de géiseres naturales de Candarave-Tacna. *Ciencia & Desarrollo*, (18).

Marlida, Y. (2014). Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Thermophilic Isolated from Hot Spring Rimbo Panti of West Sumatera for Food Biopreservatives. *Pakistan Journal of Nutrition*, 13(8), 465.

Martinez, B. (1996). Bacteriocinas de: *Lactococcus lactis* aislados de quesos asturianos, Nisina Z y Lactococina 972. Universidad de Oviedo.

Martirani, L., Varcamonti, M., Naclerio, G. & De Felice, M. (2002). Purification and partial characterization of bacillocin 490, a novel bacteriocin produced by a thermophilic strain *Bacillus licheniformis*. *Microbial Cell Factories*.

Medina, A. (2011). Resistencia antimicrobiana en aislados de *Escherichia coli* de conejos tratados por vía oral con diferentes pautas de doxiciclina. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

Mikán, J., & Suárez, D. (2004). Screening para el aislamiento y caracterización de microorganismos y enzimas potencialmente útiles para la degradación de celulosas y hemicelulosas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 6(1), 58-71.

Mirkovic, N., Polovic, N., Vukotic, G., Jovicic, B., Miljkovic, M., Radulovic, Z., & Kojic, M. (2016). *Lactococcus lactis* LMG2081 produces two bacteriocins, a nonlantibiotic and a novel lantibiotic. *Appl. Environ. Microbiol.*, 82(8), 2555-2562.

Morton, J., Freed, S., Lee, S. & Friedberg, I. (2015). A large scale prediction of bacteriocin gene blocks suggests a wide functional spectrum for bacteriocins. *BMC Bioinformatics*.

Motta, A., Cladera, F., & Brandelli, A. (2004). Screening for antimicrobial activity among bacteria isolated from the Amazon basin. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35(4), 307-310.

Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A. & Amann, R. (1996). Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of bacteriology*, 178(19), 5636-5643.

Oliart-Ros, R., Manresa, Á., & Sánchez, M. (2016). Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico. *CienciaUAT*, 11(1), 79-90.

Organización Mundial de la Salud. (2014). Primer reporte sobre la resistencia a antibióticos.

Organización mundial de la Salud. (2018). Resistencia a los antibióticos.

Parisien, A., Allain, B., Zhang, J., Mandeville, R. & Ian, C. (2007). Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell Wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072.

Pedroza, A., Matiz, A., Quevedo, B. & Aguirre, A. (2007). *Manual de Introducción a la Biotecnología*. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Pokusaeva, K., Kuisiene, N., Jasinskyte, D., Rutiene, K., Saleikiene, J. & Chitavichius, D. (2009). Novel bacteriocins produced by *Geobacillus stearothermophilus*. *Central European Journal of Biology*.

Quiñones, E., Evangelista, Z., & Rincón, G. (2016). Los actinomicetos y su aplicación biotecnológica.

Ramírez, M. (2005). Actividad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas frente a bacterias patógenas y deterioradas de alimentos.

Rezai, M., Salehifar, E., Rafiei, A., Langae, T., Rafati, M., Shafahi, K., & Eslami, G. (2015). Characterization of multidrug resistant extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* among uropathogens of pediatrics in North of Iran. *BioMed research international*, 2015.

Riley, M., & Wertz, J. (2002). Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annual Reviews in Microbiology*, 56(1), 117-137.

- Sambrook, J., & Russell, D. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*.
- Sen, S. K., Raut, S., Satpathy, S., Rout, P., Bandyopadhyay, B., & Mohapatra, P. (2014). Characterizing novel thermophilic amylase producing bacteria from Taptapani hot spring, Odisha, India. *Jundishapur journal of microbiology*, 7(12).
- Suarez, C., Ramirez, F., Monroy, O., Alazard, D., & Fernandez, L. (2004). La vida a altas temperaturas: adaptacion de los microorganismos y aplicacion industrial de sus enzimas. *Ciencia*, 55(1), 56-65.
- Surovtsev, V., Borzenkov, V. & Levchuk, V. (2014). Purification of Bacteriocins Chromatographic Methods. *Technology of biopreparations. Applied Biochemistry and Microbiology* pp. 44-49.
- Ullah, N., Wang, X., Wu, J., Guo, Y., Ge, H., Li, T., & Feng, X. (2017). Purification and primary characterization of a novel bacteriocin, LiN333, from *Lactobacillus casei*, an isolate from a Chinese fermented food. *LWT*, 84, 867-875.
- Vasilchenko, A., & Valyshev, A. (2019). Pore-forming bacteriocins: structural–functional relationships. *Archives of microbiology*, 201(2), 147-154.
- Villota, G. & Otero, I. (2009). *Características culturales de bacterias cultivables. Grupo de biotecnología microbiana*. Pasto, Colombia.

Viteri, P., Castillo, D., & Viteri, S. (2015). DEVELOPMENT AND EVALUATION OF AN INOCULUM OF CELULOLYTIC BACTERIA. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 18(1), 207-215.

Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols*, 3(2), 163.

Weisburg, W., Barns, S., Pelletier, D. A., & Lane, D. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(2), 697-703.

Yi, L., Dang, Y., Wu, J., Zhang, L., Liu, X., Liu, B., & Lu, X. (2016). Purification and characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus crustorum* MN047 isolated from koumiss from Xinjiang, China. *Journal of dairy science*, 99(9), 7002-7015.

Yi, L., Dang, J., Zhang, L., Wu, Y., Liu, B., & Lu, X. (2016). Purification, characterization and bactericidal mechanism of a broad spectrum bacteriocin with antimicrobial activity against multidrug-resistant strains produced by *Lactobacillus coryniformis* XN8. *Food Control*, 67, 53-62.

Zhou, B., & Zhang, D. (2018). Antibacterial effects of bacteriocins isolated from *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 53103) in a rabbit model of knee implant infection. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15(3), 2985-2989.

13. Anexos

Anexo A. Características morfológicas

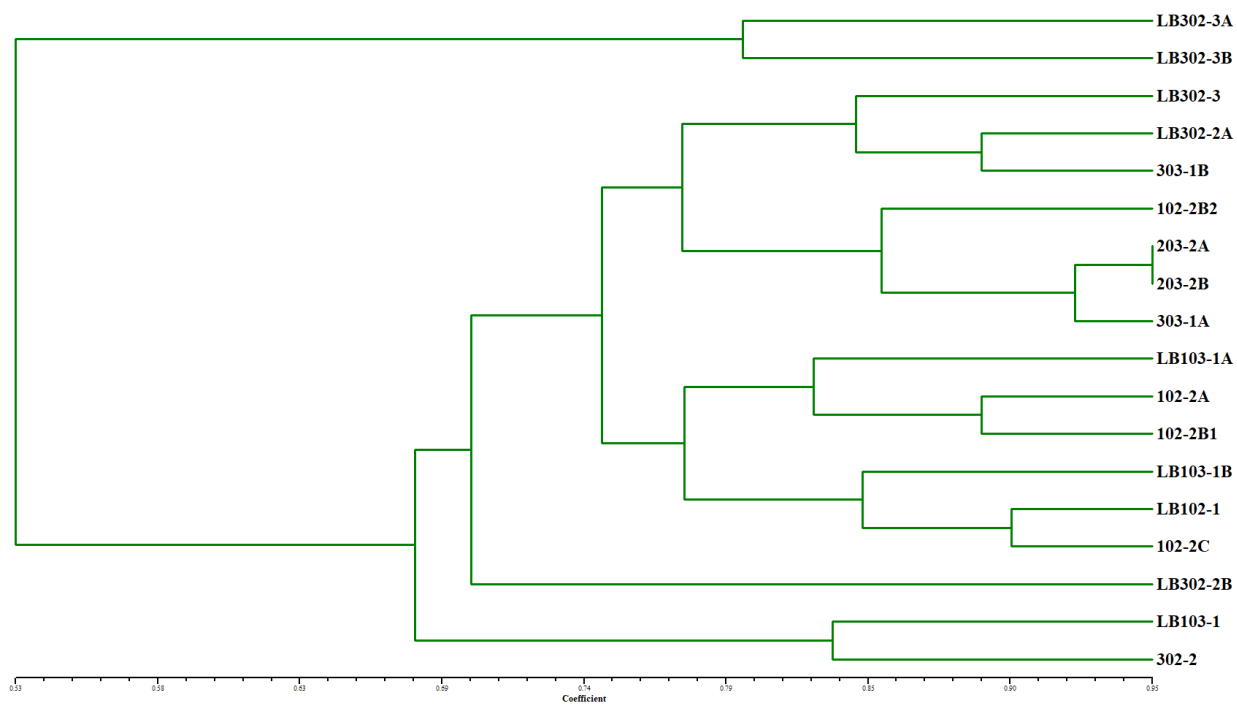
Aislado	Forma	Margen	Elevación	Superficie	Textura	Propiedad óptica	Tamaño	Color	Tinción de Gram
LB 302-3 A	Irregular	Ondulado	Plana	Áspera	Membranosa	Opaca	Mediano	Blanco	Bacilos G+
LB 302-3 B	Irregular	Ondulado	Plana	Áspera	Membranosa	Opaca	Mediano	Rosado	Bacilos G+
LB 302-3	Irregular	Ondulado	Plana	Áspera	Membranosa	Opaca	Mediano	Blanco	Bacilos G+
LB 302-2 A	Irregular	Ondulado	Plana	Áspera	Membranosa	Opaca	Grande	Blanco	Bacilos G+
LB 302-2 B	Irregular	Ondulado	Plana	Áspera	Membranosa	Opaca	Mediano	Blanco	Bacilos G+
LB 103-1 A	Puntiforme	Entero	Convexa	Lisa	Viscosa	Opaca	Pequeño	Rosado	Bacilos G+
LB 103-1 B	Irregular	Ondulado	Plana	Áspera	Membranosa	Opaca	Grande	Blanco	Bacilos G+
LB 103-1	Puntiforme	Entero	Convexa	Lisa	Viscosa	Opaca	Pequeño	Rosado	Bacilos G+
LB 102-1	Irregular	Ondulado	Plana	Áspera	Membranosa	Opaca	Mediano	Blanco	Bacilos G+
102-2 A	Irregular	Ondulado	Convexa	Lisa	Membranosa	Brillante	Mediano	Rosado	Bacilos G+
102-2 B1	Irregular	Ondulado	Convexa	Lisa	Pegajosa	Brillante	Mediano	Blanco	Bacilos G+
102-2 B2	Irregular	Ondulado	Plana	Áspera	Membranosa	Opaca	Mediano	Blanco	Bacilos G+
102-2 C	Irregular	Ondulado	Convexa	Lisa	Viscosa	Brillante	Mediano	Rosado	Bacilos G+
203-2 A	Irregular	Ondulado	Plana	Áspera	Membranosa	Opaca	Grande	Blanco	Bacilos G+
203-2 B	Irregular	Ondulado	Plana	Áspera	Membranosa	Opaca	Grande	Blanco	Bacilos G+
302-2	Irregular	Ondulado	Plana	Áspera	Membranosa	Opaca	Grande	Blanco	Bacilos G+
303-1 A	Irregular	Ondulado	Plana	Áspera	Membranosa	Opaca	Grande	Rosado	Bacilos G+
303-1 B	Irregular	Ondulado	Plana	Áspera	Membranosa	Opaca	Mediano	Rosado	Bacilos G+

Anexo B. Pruebas bioquímicas

Aislado	Catalasa	Oxidasa	Indol	Ureasa	RM	VP	Gel	Cas	Alm	Glu	Fruc	Gal	Mal	Sac	Lac
LB 302-3 A	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
LB 302-3 B	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
LB 302-3	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
LB 302-2 A	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-
LB 302-2 B	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-
LB 103-1 A	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
LB 103-1 B	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-
LB 103-1	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
LB 102-1	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
102-2 A	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-
102-2 B1	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-
102-2 B2	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-
102-2 C	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
203-2 A	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
203-2 B	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
302-2	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-
303-1 A	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-
303-1 B	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-

Abreviaciones: RM, rojo de metilo; VP, Voges Proskauer; Gel, gelatina; Cas, caseína; Alm, almidón; Glu, glucosa; Fruc, fructosa; Gal, galactosa; Mal, maltosa; Sac, sacarosa; Lac, lactosa.

Anexo C. Dendrograma de pruebas bioquímicas.



Anexo D. Halos de hidrólisis de celulosa.

Aislado	Réplica 1 (mm)	Réplica 2 (mm)
LB 302-3 A	13,05	14,00
LB 302-3 B	17,82	19,04
LB 302-3	15,75	14,47
LB 302-2 A	13,35	10,24
LB 302-2 B	16,22	14,94
LB 103-1 A	10,02	12,97
LB 103-1 B	14,31	15,22
LB 103-1	10,35	12,03
LB 102-1	22,36	22,50
102-2 A	20,64	21,56
102-2 B1	15,93	20,68
102-2 B2	22,47	22,97
102-2 C	21,09	20,65
203-2 A	10,06	11,48
203-2 B	No presentó halo	No presentó halo
302-2	17,08	17,02
303-1 A	No presentó halo	No presentó halo
303-1 B	12,72	13,17

Anexo E. Perfil de resistencia de *E. coli* y *S. aureus*.

Antibiótico	<i>E. coli</i>
Penicilina	R
Ampicilina	S
Amoxicilina	I
Cefotaxima	R
Trimetropim - sulfametoxazol	R
Gentamicina	S
Aztreonam	R
Ciprofloxacina	R
Imipenem	S
Amikacina	S

Antibiótico	<i>S. aureus</i>
Penicilina	R
Cefotaxima	S
Aztreonam	R
Amikacina	S