

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

**CARRERA:
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
INGENIERAS EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**TEMA:
AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS CAPACES DE PRODUCIR
ANTIBIÓTICOS, A PARTIR DE SUELOS DE LAS REGIONES NATURALES
DE ECUADOR**

**AUTORAS:
CARLA ISABEL EGAS ROSERO
MICHELLE ELIZABETH TINAJERO CARRERA**

**TUTORA:
MARÍA ELENA MALDONADO RODRÍGUEZ**

Quito, marzo del 2016

Cesión de derechos de autor

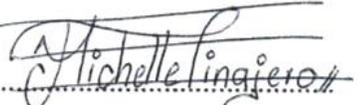
Nosotras, Carla Isabel Egas Rosero y Michelle Elizabeth Tinajero Carrera con documentos de identificación N° 171877847-3 y 171338282-6 respectivamente, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud somos autores del trabajo de titulación intitulado: “Aislamiento de microorganismos capaces de producir antibióticos, a partir de suelos de las regiones naturales de Ecuador”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingenieras en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autores nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

(f) 

Carla Isabel Egas Rosero

C.I.: 1718778473

(f) 

Michelle Elizabeth Tinajero Carrera

C.I.: 1713382826

Quito, marzo del 2016

Declaratoria de coautoría de la docente tutora

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación:
“Aislamiento de microorganismos capaces de producir antibióticos, a partir de suelos de las regiones naturales de Ecuador”, realizado por Egas Rosero Carla Isabel y Tinajero Carrera Michelle Elizabeth, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, 17 marzo del 2016

(f) 

María Elena Maldonado Rodríguez

C.I.: 1707743157

Dedicatoria

Este trabajo se lo dedico con mucho amor a mi madre Alexandra y a mi padre Edwin, por brindarme su apoyo incondicional durante mis estudios, por cuidarme, aconsejarme y por su esfuerzo para hacer mi vida mejor. A mi hermano Edwin, por ser un ejemplo a seguir y porque sé que siempre podré contar con su presencia. Y por supuesto a Dios, por darme la fuerza y sabiduría necesarias para ir en el camino correcto, y porque gracias a él soy una mejor persona cada día.

Una etapa se termina, pero otra nueva empezará. ¡En la práctica está el éxito!

Michelle Tinajero

La presente investigación se la dedico primeramente a Dios por darme la sabiduría y ser guía en este camino, a mi madre Marcia por su paciencia y sacrificio para hacer de mí una mujer de bien, a mi abuela Piedad por brindarme amor y por sus cuidados, a mi tío Edwin por sus consejos y enseñanzas, y a mi novio Alejandro por darme fortaleza y brindarme paz; a lo largo de mi trayectoria estudiantil. Gracias por ser mi motivación para concluir esta etapa de vida; cada uno ha logrado inculcar en mí buenos valores que me servirán a futuro.

Hoy cumplo una meta, pero faltan muchas más. ¡El que tiene a dios, lo puede todo!

Carla Isabel Egas Rosero

Índice

Introducción	1
1. Marco conceptual.....	3
1.1. Los microorganismos.....	3
1.1.1. Las bacterias.....	4
1.1.2. Los Actinomicetos	5
1.1.3. Hongos.....	6
1.2. Microorganismos del suelo.....	7
1.2.1. Factores que influyen la presencia de microorganismos en el suelo ...	11
1.3. Microorganismos productores de antibióticos	12
1.3.1. Función biológica de los antibióticos.....	14
1.4. Los antibióticos.....	15
1.5. Antibiosis	15
1.6. Espectro bacteriano	16
1.7. Clasificación de los antibióticos	17
1.7.1. Bacteriostáticos	17
1.7.2. Bactericidas	17
1.8. Metabolismo Bacteriano:	20
1.8.1. Metabolitos primarios	21
1.8.2. Metabolitos secundarios	21

1.9.	Resistencia de microorganismos a antibióticos comunes	26
1.9.1.	Mecanismos de resistencias	27
2.	Metodología	29
2.1.	Material para el análisis	29
2.2.	Fase 1: Aislamiento y purificación de cepas microbianas del suelo	29
2.2.1.	Preparación de una suspensión de suelo en agua estéril	30
2.2.2.	Diluciones seriadas	30
2.2.3.	Siembra de diluciones.....	30
2.2.4.	Aislamiento de microorganismos	31
2.3.	Fase 2. Antibiograma cepas pre-seleccionadas.....	32
2.3.1.	Método de rayado con palillos.....	32
2.3.2.	Método de “cilindros de agar”	34
2.3.3.	Selección de microorganismos productores de antibióticos.....	35
2.4.	Fase 3. Caracterización de las cepas productoras de antibióticos	35
2.4.1.	Tinción diferencial de Gram.....	36
2.4.2.	Tinción con colorante Azul de Metileno	36
2.4.3.	Tinción de esporas	37
2.5.	Cinética de crecimiento microbiano	37
2.5.1.	Temperatura óptima de crecimiento	37
2.5.2.	pH óptimo de crecimiento	38

2.6. Producción del antibiótico	38
2.6.1. Actividad antimicrobiana	39
2.6.2 .Método de difusión en pocillo de agar	40
2.7. Pruebas Bioquímicas Microgen TM Gn A+B-ID System.....	41
2.8. Extracción y purificación de antibióticos.....	42
2.9. Espectro infrarrojo de los antibióticos obtenidos.....	42
3. Resultados y discusión	43
3.1. Del aislamiento y purificación de microorganismos productores de antibióticos	43
3.2. De la capacidad de producir halos de inhibición.....	44
3.3. De la caracterización morfocultural de las cepas	46
3.4. Cinética de crecimiento.....	47
3.5. Producción de la sustancia antibiótica	48
3.6. De la extracción del antibiótico	50
3.7. Resultado de las pruebas bioquímicas.....	52
3.8. Espectro infrarrojo	53
Conclusiones	55
Recomendaciones	57
Referencias.....	59

Índice de tablas

Tabla 1. Población microbiana en un suelo agrícola fértil.....	10
Tabla 2. Importancia relativa de los grupos microbianos productores de antibióticos...	13
Tabla 3. Clasificación de los antibióticos según el mecanismo de acción sobre la estructura bacteriana	19
Tabla 4. Mecanismos de acción de los antibióticos y mecanismos de resistencia a los mismos	28
Tabla 5. Preparación de Estándares de McFarland	40
Tabla 6. Caracterización Morfocultural de cepas productoras de antibiótico.....	47
Tabla 7. Turbidez de la suspensión bacteriana	50
Tabla 8. Peso del antibiótico en gramos	51

Índice de figuras

Figura 1. Incremento de la proporción de células.....	22
Figura 2. Esquema de la siembra con palillos.....	34
Figura 3. Media de los halos de inhibición producidos contra <i>Bacillus spizizenii</i>	45
Figura 4. Media de los halos de inhibición producidos contra <i>Pseudomona aeruginosa</i>	46
Figura 5. Crecimiento a 30 ± 0.2 °C y pH 7 ± 0.2	48
Figura 6. Presencia de la sustancia antibiótica, deducida en días.	49
Figura 7. Áreas inhibición producidas, en el antibiograma, utilizando la sustancia antibiótica extraída con diclorometano.	52

Resumen

La resistencia adquirida por parte de los microorganismos se debe al uso indiscriminado de sustancias antimicrobianas y a la capacidad que tienen de originar mecanismos para adaptarse a diferentes ambientes. Este problema incrementa a medida que pasan los años siendo necesaria la investigación de nuevos antibióticos a partir de fuentes naturales, la producción de éstos se basa en el metabolismo secundario de microorganismos, que pueden provenir del suelo.

El trabajo experimental se enfocó en el aislamiento de cepas productoras de antibióticos, a las cuales se realizaron caracterizaciones morfo-culturales y bioquímicas en las cuales se determinó que las cepas encontradas son: *Burkholderia cepacia* (PAG C007), *Burkholderia cepacia* (PAQ C024), *Xanthomona maltophilia* (PAA C019). Se realizó la cinética de crecimiento considerando como parámetros la temperatura y pH, en las cuales se determinó que las condiciones óptimas son 30° C de temperatura y pH 7 ± 0.2 . Mediante técnica de antibiograma se seleccionaron 3 cepas, y el antibiótico extraído se sometió a espectroscopia infrarroja, donde se encontraron grupos funcionales: amino, carbonilo con una cadena lateral de doble enlace y alcanos, que corroboran la existencia de estructuras antimicrobianas.

Palabras clave: antibióticos, aislamiento, *Burkholderia cepacia*, *Xanthomona maltophilia*, antibiograma.

Abstract

Acquired resistance by microorganisms is due to the indiscriminate use of antimicrobials and to the ability to originate mechanisms to adapt to different environments. This problem increases in passing years and research of new antibiotics from natural sources being required, their production is based on secondary metabolism of microorganisms, which may come from soils.

The experimental work was focused on the isolation of antibiotic producing strains, physiological and biochemical characterizations were performed and in which it was determined that the strains were: *Burkholderia cepacia* (PAG C007), *Burkholderia cepacia* (PAQ C024), *Xanthomona maltophilia* (PAA C019). Considering pH and temperature parameters, the optimum conditions in the growth kinetics are 30 °C temperature and pH 7 ± 0.2 . In susceptibility study technique three strains were selected, and the extracted antibiotic was subjected to infrared spectroscopy, functional groups found were: amino, carbonyl with double bond lateral chain and alkanes, supporting the existence of antimicrobial structures.

Keyword: antibiotics, isolation, *Burkholderia cepacia*, *Xanthomona maltophilia*, susceptibility.

Introducción

El suelo es un reservorio natural de microorganismos, capaces de originar muchos productos biológicamente activos, incluidas las moléculas antibióticas, que frecuentemente se producen en respuesta al estrés ambiental o la competencia con otros microorganismos (Salyers, Wilson, Whitt, & Winkler, 2011). Los metabolitos microbianos son fuentes ricas para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos, de origen natural. Siendo los Actinomicetos y hongos filamentosos, la principal fuente de los antibióticos naturales (Wu, Kim, van Weze, & Choi, 2015, pág. 11).

La función de un antibiótico es suprimir el crecimiento de otros microorganismos y en algunos casos eliminarlos (Patiño, 2006, pág. 48). Pero, a pesar de que más de 5.000 sustancias antibióticas han sido identificadas a partir de los cultivos de hongos filamentosos y bacterias, Gram positivas y Gram negativas, sólo alrededor de 100 antibióticos se han utilizado comercialmente para el tratamiento de enfermedades en humanos, animales y plantas, muchas veces por su alta toxicidad. Al mismo tiempo que, la aparición de agentes patógenos resistentes a múltiples de estos fármacos, requiere la búsqueda continua de nuevos compuestos antimicrobianos eficaces para controlar la propagación de agentes patógenos resistentes, así como, para el tratamiento de enfermedades mortales como el cáncer (Saravana Kumar, Duraipandiyamb, & Ignacimuthu, 2014, pág. 436).

Considerando que la introducción de nuevos antibióticos se está convirtiendo en uno de los principales problemas con los que se enfrenta la sanidad a nivel mundial, la búsqueda

de sustancias antibióticas desconocidas, eficaces contra las bacterias patógenas resistentes a múltiples fármacos es un área importante de la investigación biotecnológica (Ugur & Ceylan, 2010, pág. 406). Y, por tal razón, el presente trabajo se ha desarrollado con el fin de encontrar nuevos microorganismos capaces de producir antibióticos, aislados a partir de suelos de diferentes regiones naturales del Ecuador (específicamente de la Región Insular - Galápagos y la Región Sierra – Norte), evaluado su capacidad de antibiosis frente a *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 9027) y *Bacillus spizizenii* (ATCC 6633) y por último logrando estimar la cantidad de sustancia antibiótica que cada microorganismo seleccionado puede producir.

Capítulo 1

Marco conceptual

1.1. Los microorganismos

Se definen como seres de tamaño microscópico, con una organización biológica sin diferenciación de tejidos u órganos (Puigdomenech, 2009, pág. 21). Entre estos se encuentran bacterias, hongos, protozoos, microalgas y virus, que pueden vivir en ambientes como el suelo, el agua, el aire, la comida, en los animales, así como en como rocas, glaciares, aguas termales y respiraderos de aguas profundas (Singh & Kapoor, 2010, págs. 1-2).

Son los seres más primitivos y numerosos que existen en el planeta Tierra, que han colonizado todo tipo ambiente, e interactúan continuamente en todos los ecosistemas. Además, son necesarios para el funcionamiento de los sistemas biológicos y el mantenimiento de la vida, puesto que participan en procesos metabólicos, ecológicos y biotecnológicos esenciales para la industria: farmacéutica, alimenticia, médica, entre otras, así como resolver problemas ecológicos y de contaminación ambiental. Lo que significa que, parte de la actividad biológica esencial que permite la vida depende de los microorganismos (Montaño, Sandoval, Camargo, & Sánchez, 2010, pág. 17).

A pesar de que los microorganismos fueron los causantes de las enfermedades más devastadoras de la humanidad, como la peste negra (entre los años 1346 y 1361), solo el 1% de las especies conocidas pueden causar daño al ser humano, plantas o animales

(García & Gamboa, 2006). Algunos microorganismos han desempeñado funciones importantes dentro de la biotecnología, desde tiempos remotos con la elaboración de vino o el pan, por procesos fermentativos (Thieman & Palladino, 2010, pág. 123).

A continuación se explicara brevemente algunos de los microorganismos que conciernen a esta investigación.

1.1.1. Las bacterias

Son microorganismos unicelulares procariotas, porque carecen de un núcleo verdadero, a diferencia de los organismos eucariotas, en los cuales el material genético está separado del citoplasma por una membrana nuclear. Pueden ser móviles o inmóviles dependiendo a la presencia o no de flagelos, tienen formas diversas y pueden llegar a medir aproximadamente de 0.3-1 micra de diámetro y hasta 15-20 micras de longitud, no obstante la mayoría de las bacterias poseen menos de 4 micras de largo. Estos microorganismos pueden adaptarse para sobrevivir a ambientes muy hostiles, como círculos polares, desiertos, aguas termales y en las profundidades del mar (Mendoza Zepeda, 2010, pág. 17).

La mayoría de las bacterias se multiplican por fisión binaria, otras por gemación o incluso pueden producir descendencia múltiple simultáneamente (Wassenaar, 2011, pág. 17). Estas crecen y se dividen rápidamente, se estima que en condiciones favorables pueden dividirse cada 20 minutos aproximadamente, es decir se crearán millones de células a partir de una pequeña población (Thieman & Palladino, 2010, pág. 120). También se sabe, que pueden intercambiar libremente sus genes entre especies, esta transferencia de genes, la mutación y otros factores de variación genética, les permite a

estos microorganismos evolucionar rápidamente para sobrevivir a nuevos entornos y al estrés ambiental. Esta acelerada evolución es importante en medicina, debido a que las bacterias patógenas crean fácilmente resistencia a los antibióticos (Kapoor, 2010, pág. 157).

Las bacterias tienen alrededor de 3.500 millones de años en la Tierra, y se calcula que representan el 50% de la materia viva en el planeta. Se estima que, únicamente un 1% ha sido identificado, cultivado y estudiado dentro del laboratorio. Pueden clasificarse mediante la técnica tinción de Gram, en dos grandes grupos: bacterias Gram negativas y Gram positivas (Thieman & Palladino, 2010, pág. 121).

Tienen usos importantes en la industria, como por ejemplo: en el tratamiento de aguas residuales, la producción de queso y yogur, así como en el campo de la biotecnología y la genética molecular, y en la fabricación de antibióticos y otros productos (Kapoor, 2010, pág. 28).

1.1.2. Los Actinomicetos

También llamados actinobacterias son un grupo de bacterias Gram-positivas, con alto contenido en relación de guanosina - citosina (GC) en su ADN, alrededor de 70 a 80% (Kim, 2013, pág. 2). Son organismos aeróbicos e inmóviles, que representan parte de la vida del suelo, en el cual desempeñan una función importante en la descomposición de materiales orgánicos, como la celulosa y la quitina. Además participan en el ciclo del carbono, ayudando a reponer el suministro de nutrientes en el suelo lo cual ayuda en la formación de humus. Otros actinomicetos habitan en plantas y animales, algunos son

patógenos, como por ejemplo: *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* y unas pocas especies de *Streptomyces* (Kapoor, 2010, pág. 4).

Actinomicetos, sobre todo el género *Streptomyces*, son conocidos como productores de metabolitos secundarios de interés farmacológico y comercial. La historia de antibióticos derivados de *Streptomyces* comenzó en 1943, cuando Selman Waksman descubrió la estreptomicina en bacterias, aisladas del suelo, las cuales estaba estudiando, gracias a su descubrimiento obtuvo un Premio Nobel, y desde entonces cientos de antibióticos presentes en la naturaleza se han descubierto por medio de estos microorganismos, especialmente de este género (Logan, 2009, pág. 211). La propiedad más interesante de los *Streptomyces*, es su capacidad de producir sustancias antifúngicas, antivirales, antitumorales, anti-hipertensivas, y principalmente los antibióticos y los inmunosupresores (Procópio, da Silva, Martins, Azevedo, & Araujo, 2012, pág. 467).

1.1.3. Hongos

Son organismos eucariotas, pertenecientes al reino Fungí, son heterótrofos y poseen una pared celular quitinosa, que crecen como filamentos multicelulares llamados hifas las cuales forman un micelio, algunas especies también crecen como células individuales. Su reproducción puede ser sexual y asexual a través de esporas, por lo general producidas en estructuras especializadas o en los cuerpos fructíferos (Kapoor, 2010, pág. 91). La mayoría de los hongos no son percibidos a simple vista, pueden estar presentes en el suelo, la materia muerta, y formando simbiosis con plantas, animales, u otros organismos. Cumplen una función esencial en la descomposición de la materia orgánica

y son indispensables en el ciclo de nutrientes. Por lo general, han sido utilizados como fuente de alimentos, en el caso de las setas y trufas, y en la fermentación de diversos productos alimenticios, tales como el vino y la cerveza (Ruiz J. , 2001, págs. 275-276).

Los hongos se utilizan como fuentes para producir antibióticos, para la industria médica, y diversas enzimas, tales como celulasas, pectinasas, y proteasas, importantes para el uso industrial, un ejemplo de ello está en la industria de los detergentes. Éstos se distribuyen por todo el mundo, y crecen en una amplia variedad de hábitats, la mayoría en ambientes terrestres, incluyendo los desiertos, algunas especies viven exclusivamente en los hábitats acuáticos, ambientes hipersalinos, y las profundidades del mar y también se los puede encontrar en las rocas. Estos organismos soportan temperaturas extremas tanto bajas como altas, la mayoría de las especies son capaces de sobrevivir a la radiación UV y algunas también a la radiación cósmica (Kapoor, 2010, pág. 92).

1.2. Microorganismos del suelo

El suelo representa la parte más externa de la corteza terrestre, resultado de la meteorización de las rocas, las cuales poseen diferentes características entre sí. Se puede considerar el suelo como un sistema en el cual interactúan tres fases: una fase sólida, formada por materia mineral y orgánica, una fase líquida, y una fase gaseosa o atmósfera del suelo, la cual contiene una gran cantidad de dióxido de carbono, pero es escasa en oxígeno, resultado de la respiración aeróbica de raíces de plantas, animales y microorganismos (Nogales, 2005, pág. 41).

El suelo constituye un sistema complejo, principalmente diverso, que alberga una gran riqueza de especies vegetales, animales y microbianas. Se considera un ambiente apropiado para el desarrollo de los microorganismos tanto procariotas como eucariotas, se pueden encontrar también virus y bacteriófagos. Todas estas formas de vida interactúan entre sí y con el suelo para crear diferentes condiciones. La actividad de los organismos que viven en el suelo ayuda a controlar su calidad, profundidad, estructura y propiedades del suelo. Así también el clima regional contribuye a la naturaleza del suelo. Y las interacciones entre estos múltiples factores son responsables de la variación de tipos de suelo. Por tal razón, la misma estructura del suelo se puede encontrar en diferentes lugares para apoyar a diferentes comunidades biológicas (Evans, Heritage, & Killington, 1999, pág. 1).

Algunos componentes del suelo sirven como fuente de nutrientes para los microorganismos que lo habitan, entre ellos están: los minerales, materia orgánica, exudados radicales y biomasa. Así, los microorganismos del suelo incluyen bacterias, actinomicetos, hongos, algas, protozoos y virus. La fisiología del microorganismo dependerá de la naturaleza química y física del ambiente, es decir de los componentes que constituyen el suelo (Ramos, 2004, págs. 185-186).

Las comunidades bacterianas no están distribuidas al azar en el suelo, sino que siguen patrones especiales de adherencia a escalas de varios milímetros a varios metros (Nunan, Wu, Young, Crawford, & Ritz, 2002). La actividad biológica se concentra en gran medida en el suelo superficial, cuya profundidad puede variar. En la tierra vegetal, los componentes biológicos ocupan una fracción muy pequeña (menor al 0,5%) del

volumen total del suelo y constituyen menos del 10% de la materia orgánica total en el suelo (Nielsen & Winding, 2002, págs. 13-16).

Dentro del suelo, los microorganismos presentes están en su mayoría vinculados a las partículas del mismo. Se presume, que su número varía de acuerdo a la disponibilidad de nutrientes adecuados. Siendo las bacterias la mayor parte de la población microbiana, seguida de los hongos, las algas y los protozoos. Los valores publicados sobre el número de microorganismos existentes excluyen aquellos que aún no se ha podido identificar en el laboratorio, esto podría corresponder a un 99% de las especies, de acuerdo algunos expertos. Cabe recalcar, que millones o probablemente miles de millones de bacterias pueden estar presentes en un solo gramo de tierra vegetal, pero, a pesar de poder estar presente en enormes cantidades, las bacterias solo representan un porcentaje mínimo del volumen en la mayoría de suelos. No así, los hongos, que aunque presentes en cantidades más pequeñas, forman una mayor proporción de la biomasa del suelo, debido a su mayor tamaño (Hogg, 2013, págs. 363-364).

A pesar de que, el número y tipo de microorganismos presentes en el suelo depende de varios factores ambientales, en la tabla 1 se puede ejemplificar un número aproximado de microorganismos presentes en un suelo agrícola fértil.

Tabla 1.

Población microbiana en un suelo agrícola fértil

POBLACIÓN DEL SUELO EN UN SUELO AGRÍCOLA FÉRTIL		
Tipo de microorganismo		Número aproximado por gramo
Bacterias	Conteo directo	2,500,000,000
	Dilución en placa	15,000,000
Actinomicetos		700,000
Hongos		400,000
Algas		50,000
Protozoos		30,000

Nota: Adaptado de *Introduction to Soil and Agricultural Microbiology* (Prabakaran, 2010, pág. 17), por C. Egas y M. Tinajero, 2016.

Los microorganismos son importantes en procesos de edafogénesis; ciclos biogeoquímicos de elementos como el carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre, fósforo, hierro y otros metales; fertilidad de las plantas y protección frente a patógenos; degradación de compuestos xenobióticos, entre otros (Nogales, 2005, pág. 42).

Bacterias encontradas frecuentemente en suelos incluyen *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Nitrobacter*, *Rhizobium* y *Azotobacter*, así como cianobacterias. Actinomicetos frecuentemente encontrados incluyen *Streptomyces* y *Nocardia*. Y entre los géneros más comunes de hongos encontrados incluye *Penicillium* y *Aspergillus*. (Hogg, 2013, pág. 364).

1.2.1. Factores que influyen la presencia de microorganismos en el suelo

La población microbiana puede variar de acuerdo a una gran cantidad de factores entre estos los más importantes son la cantidad de agua disponible, la materia orgánica presente, el pH, la temperatura y la humedad.

El contenido de materia orgánica de un suelo proviene de restos de plantas y animales muertos, ya que éstos se descomponen en el suelo por acción de algunos invertebrados y microorganismos, principalmente bacterias y hongos. Así, el número de microorganismos disminuye a medida que se aleja de la superficie del suelo, como de la materia orgánica y oxígeno, debido a que la mayoría de los microorganismos presentes son heterótrofos aerobios, que participan en la descomposición de sustratos orgánicos. Por tal razón, la proporción de los anaerobios aumentará con la profundidad, pero no en grandes cantidades (Hogg, 2013, pág. 363).

Generalmente las condiciones neutras favorecen el crecimiento de bacterias y hongos, pH 5-6, en el caso de los Actinomicetos las condiciones ligeramente alcalinas serán favorables para su desarrollo, pH 7, pero el alto contenido de sal puede ser tóxico. En cuanto a la temperatura, existen microorganismos que pueden crecer en entornos extremos, tales como 60°C, así como a temperaturas muy bajas de -18°C, los cambios en la temperatura influyen en el microorganismo, tanto cuantitativa como cualitativamente. La humedad excesiva, mayor al 65%, en el suelo, reduce el número de microorganismos, en particular bacterias aerobias (Prabakaran, 2010, págs. 32-33).

El crecimiento de la población de microorganismos depende de la concentración de sustancias inorgánicas en el suelo. Además, que los nutrientes presentes en el suelo son absorbidos por las plantas y microorganismos.

1.3. Microorganismos productores de antibióticos

Existen tres grupos de microorganismos productores de antibióticos: las bacterias, los actinomicetos y los hongos filamentosos, debido a que tienen mejor producción de metabolitos secundarios. Aunque, también pueden ser organismos productores algunos hongos superiores y algas, pero manifiestan baja actividad antimicrobiana y poca especificidad (Lancini, Parenti, & Gallo, 1995, pág. 3).

Más de 60 % de los antibióticos descritos son producidos por las especies del orden *Actinomycetales*, en particular por el género *Streptomyces* (Zotchev, 2012, pág. 270).

Según Lancini, Parenti, & Gallo (1995), los microorganismos productores pueden generar dos o más antibióticos no relacionados, y los clasifica de acuerdo a la producción de sustancias:

- Actinomicetos: producen mayor número y variedad de antibióticos conocidos, más de 6000 sustancias aisladas hasta el momento.
- Hongos: solamente dos géneros producen una cantidad relativamente alta de antibióticos, *Aspergillus* y *Penicillium*. Los hongos producen varios tipos de metabolitos secundarios, pero solo aproximadamente 1.500 muestran actividad antibiótica.

- Bacterias: especialmente *Bacillus* y *Pseudomonas* (formadoras de esporas), producen un alrededor de 1.000 antibióticos hasta el momento.
- Mixobacterias: a pesar de que son poco estudiadas, demuestran alta producción de antibióticos (pág. 5).

Tabla 2.

Importancia relativa de los grupos microbianos productores de antibióticos

Microorganismos productores	% De antibióticos descritos
Líquenes y algas	0.8
Hongos	
<i>Penicillium</i>	4.1
<i>Aspergillus</i>	3.0
<i>Fusarium</i>	1.2
<i>Cephalosporium</i>	0.8
Otros fungi imperfecti	5.4
Basidiomicetos y ascomicetos	5.0
Bacterias	
Pseudomonadaceae	1.3
Bacillaceae	7.0
Otras eubacterias	1.7
Actinomicetos	69.7

Nota: Tomado de *Microbiología Industrial* (Leveau & Bouix, 2010, pág. 418).

Cabe recalcar que, muchos de los actinomicetos del suelo productores de antibióticos, como por ejemplo la estreptomicina, no constituyen una parte importante de la comunidad de microorganismos del suelo, sólo en condiciones severas y de gran estrés este grupo podría predominar en un suelo (Ramos, 2004, pág. 190).

1.3.1. Función biológica de los antibióticos

Los antibióticos se sintetizan como metabolitos secundarios, los mismos que no son necesarios para el crecimiento y mantenimiento del organismo productor, como lo son los metabolitos primarios, puede que desempeñen funciones de supervivencia en la naturaleza, pero adquieren mayor importancia en el campo de la salud, la nutrición, y la economía (Ruiz, y otros, 2010, pág. 146).

La función biológica de los antibióticos y su importancia para los organismos productores todavía no ha sido definida, por lo que sigue siendo cuestionada. Es probable que la función de los antibióticos sea la inhibición de crecimiento de otros organismos, que compiten en el acceso a las fuentes de nutrición en los alrededores ambiente, puesto que la mayoría de microorganismos productores de antibióticos habitan en el suelo, y se encuentran en una competencia constante (Logan, 2009, pág. 262).

Sin embargo, en su ambiente natural, los organismos productores de antibióticos pueden no sintetizar antibióticos en cantidades significativas, lo que sugiere que poseen un papel biológico alternativo, pero, cualquiera que sea la verdadera función biológica de los antibióticos, debe ser importante para el organismo productor (Zotchev, 2012, págs. 270-271).

1.4. Los antibióticos

Los antibióticos son sustancias producidas por varias especies de microorganismos (bacterias, hongos, actinomices), que suprimen el crecimiento de otros microorganismos y eventualmente pueden destruirlos. Se han definido también como antibacterianos obtenidos por síntesis química como: sulfonamidas y quinolonas (Camacho V. J., 2001, págs. 6-7). De igual forma este término ha sido utilizado para incluir a todos los medicamentos quimioterapéuticos que poseen actividad antibacteriana (Mendoza, 2010, págs. 41-45).

La época de las sustancias antimicrobianas se desarrolla a inicios de 1935 con el descubrimiento de las sulfonamidas por Domagk. En 1940, Ernest Chain y Howard Florey demostraron que la penicilina descubierta por Alexander Fleming en 1929 era una sustancia quimioterápica efectiva. La edad de oro de los antibióticos se da en 1941 con la industrialización de la penicilina y su aplicación clínica. Posteriormente las investigaciones dieron prioridad a sustancias bacterianas de origen microbiano a las cuales se denominó antibióticos. En la década de 1970 se desarrollan antibióticos de segunda generación y en 1980 los de tercera generación (Sánchez, Sáenz, Pancorbo, Lanchipa, & Robert, 2004, pág. 7).

1.5. Antibiosis

Se define como la asociación de dos organismos donde uno es dañado o eliminado por el otro (Ramírez, 2009, págs. 13-20). La antibiosis se aplica a partir de la obtención de la

penicilina, al desarrollar tanto carácter antibacteriano como antiinfeccioso (Segarra, 1997, págs. 311-331).

La acción de los antibióticos afecta a componentes esenciales de la multiplicación celular o a estructuras necesarias para el mantenimiento de la vida bacteriana (Florez, 2007, pág. 3). La acción antibiótica se da a través de la membrana celular y su permeabilidad, la cual es determinada por el espectro bacteriano (Patiño, 2006, págs. 5-11).

1.6. Espectro bacteriano

Como enuncia Quintana (2002, págs. 2-4) es la medida de la acción de un antibiótico sobre las cepas bacterianas, de acuerdo a esto se puede definir dos tipos de antibióticos según el espectro:

- Antibióticos de amplio espectro: Son aquellos que actúan inhibiendo a múltiples cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativos; pueden ser antibióticos como: Tetraciclinas y el Cloranfenicol.
- Antibióticos de espectro restringido: Actúan inhibiendo a un grupo reducido de cepas bacterianas, o son específicos para cada cepa como: Nistanina para *Cándida albicans* (págs. 2-4).

1.7. Clasificación de los antibióticos

Las sustancias antibióticas se pueden clasificar en dos grandes grupos:

1.7.1. Bacteriostáticos

Son antibióticos que impiden el crecimiento bacteriano, pero el microorganismo permanece viable, es por ello que cuando el antibiótico es suspendido, puede volver a multiplicarse. Pertenecen a este grupo: tetraciclinas, cloranfenicol, macrólidos, lincosaminas, sulfamidas y trimetoprima. Este tipo de antibiótico brinda una pequeña ayuda al sistema inmunológico del huésped y pueden tener un efecto reversible (Mendoza, 2010, págs. 41-45).

1.7.2. Bactericidas

Promueven la muerte celular de los microorganismos responsables de la infección, que puede ir acompañada de la lisis celular. Pertenecen a este grupo los antibióticos b-lactámicos, aminoglucósidos, rifampicina, vancomicina (Navarra, 2009, págs. 1-3).

Según Florez (2007, pág. 3) los antibióticos bactericidas pueden clasificarse de acuerdo a la diana en la cual actúan en:

1.7.2.1. Inhibidores de la síntesis de la pared celular

Actúan inhibiendo diferentes etapas de la estructura del peptidoglicano que conforma la pared celular, esta interferencia puede ser intracelular o extracelularmente. Siempre se provoca la lisis celular. Por ejemplo la ubicación de la serina es el centro catalítico de las

transpeptidasas y las carboxipeptidasas formando enlace covalente con el anillo betalactámico de las penicilinas cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos, impidiendo que el sustrato natural se fije con dicha serina, inhibiendo de manera irreversible a la enzima (págs. 3-10).

1.7.2.2. Inhibidores de la síntesis proteica

Los antibióticos de esta clasificación se unen a diferentes bases nitrogenadas del ARN ribosómico, interfiriendo en la traducción, dicha inhibición puede darse tanto en la subunidad ribosómica 30S como en la subunidad 50S; logrando inhibición de la síntesis proteica. Algunos de estos antibióticos son: para la subunidad 30S (aminoglicósidos y tetraciclinas) y para la subunidad 50S (cloranfenicol, licosaminas, etc.) (págs. 3-10).

1.7.2.3. Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos

Al biosintetizar ARN Y ADN se dan diversas reacciones donde los antibióticos actúan inhibiendo la replicación o deteniendo la transcripción. Son capaces de impedir componentes esenciales que forma el material genético las bacterias. Por ejemplo la rifampicina inhibe a la ARN polimerasa, incapacitando a la bacteria de formar nuevo ARN (págs. 3-10).

1.7.2.4. Antibióticos que afectan a la membrana

La membrana celular puede lesionarse, por sustancias externas. Tanto las bacterias Gram positivas como las Gram negativas poseen una cubierta de peptidoglicano, por la cual se

diferencian mediante su grosor. Algunas moléculas de naturaleza polipeptídica pueden fijarse en las membranas lipídicas, siendo una acción diferente a otros antibióticos por lo que no ocasionan resistencia cruzada y se utilizan contra cepas multirresistentes, por ejemplo, las polimixinas actúan en la cubierta externa de bacterias Gram negativas (Seija & Vignoli, 2006, págs. 1-4).

A continuación se muestra los antibióticos que pueden cumplir diferentes mecanismos de acción.

Tabla 3.

Clasificación de los antibióticos según el mecanismo de acción sobre la estructura bacteriana

Mecanismo de acción del antibiótico sobre la bacteria	Antibiótico
Inhibición de la síntesis de la pared celular	Penicilinas, Cefalosporinas, Vancomicina, Fosfomicina, Tercoplanina, Bacitracina.
Lesión en la permeabilidad de la membrana celular	Polimixina, Colistinas, Nistatina, Anfotericin C.
Inhibición de la síntesis proteica	Cloranfenicol, Tetraciclina, Aminoglicosidos, Lincomicina, Eritromicina.
Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos (DNA)	Quinolonas, Sulfonamidas, Rafampicina, Trimetropin.

Nota. Adaptado de *¿Por qué las bacterias se hacen resistentes a la acción de los antibióticos?* (Patiño, 2006, pág. 6), por M. Tinajero y C. Egas, 2016.

Otra manera de clasificar a los antibióticos según Ramírez (2009, págs. 13-20) es de acuerdo a su fabricación, los cuales pueden ser:

Sintético: Son aquellas creadas por el hombre, con efectos potencialmente diferentes sobre diferentes tipos de microorganismos, estos antibióticos pueden ser valorados como de amplio espectro y además son desarrollados con vida media larga (periodo de eficacia).

Natural: Son aquellos que provienen de organismos vivos, de un proceso llamado metabolismo secundario, que se da cuando las células de los microorganismos entran en estrés o para supervivencia de las mismas (págs. 13-20).

1.8. Metabolismo bacteriano:

Son relaciones bioquímicas mediante las cuales un organismo a partir de moléculas orgánicas e inorgánicas puede generar macromoléculas específicas (Carlone, 2014, págs. 51-57).

El metabolismo tiene funciones específicas que son:

Obtener energía química de su entorno, almacenarla, para posteriormente utilizar dicha energía para diversas funciones celulares; convertir los nutrientes que se encuentran alrededor en unidades formadoras de componentes macromoleculares de la célula bacteriana y finalmente constituir y degradar moléculas para funciones celulares, por ejemplo, movilidad y captación de nutrientes (Varela, 2008, págs. 1-3).

Según Garcia & Angulo (2004, págs. 187-188) los microorganismos tienen como metabolismo el biosintetizar dos tipos de metabolitos:

1.8.1. Metabolitos primarios

Son las sustancias imprescindibles para los microorganismos, ya que intervienen en procesos de crecimiento y supervivencia, por esta razón se producen en grandes cantidades. Algunos de ellos son: Azúcares, Aminoácidos y Proteínas (págs. 187-188).

1.8.2. Metabolitos secundarios

Los microorganismos son fuente interminable para la elaboración de distintos metabolitos activos, éstos son sustancias biosintetizadas a partir de metabolitos primarios, y se producen de acuerdo a la cantidad de estímulos externos (competencia, infección o limitación de nutrientes), pueden ser: antibacterianos, antifúngicos, antitumorales, antioxidantes, citotóxicos, antiparasitarios, antivirales (págs. 187-188).

La actividad antibiótica está provista por la composición genética de la célula microbiana; es por ello que la actividad antibiótica se genera en cepas, que cuentan con actividad fosfotransferasa, y acetiltransferasa (Herver, Giles, & Akhtad, 1983, págs. 67-68).

Según Parés I Farràs & Juárez Giménez (2012, págs. 323-350) el metabolismo secundario se da en la fase estacionaria cuando se ha detenido el crecimiento de la biomasa bacteriana, dando como resultado dos fases:

a) Trofofase: Es la proliferación celular, b) Ideofase: Donde no se evidencia la proliferación celular.

Diagrama de crecimiento en base a la proporción de células bacterianas

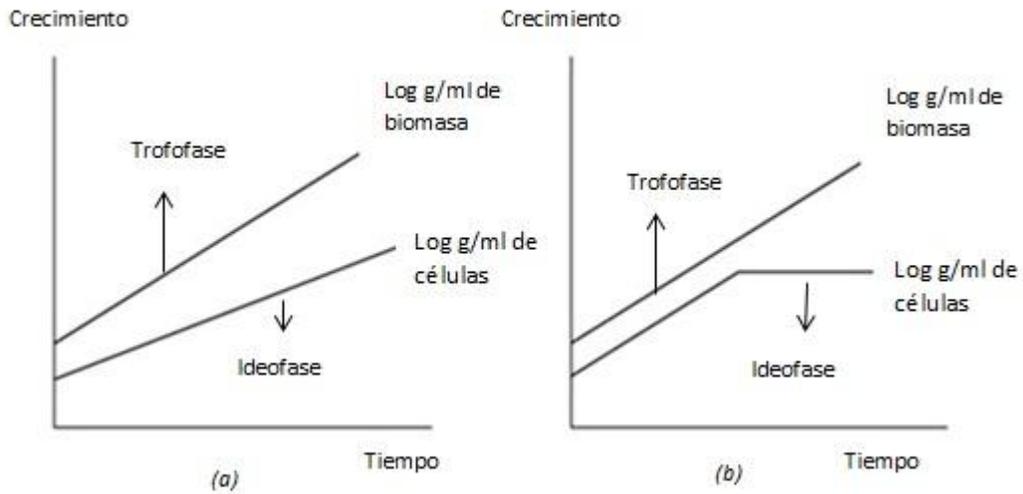


Figura 1. Incremento de la proporción de células

El diagrama (a) corresponde a una trofofase superpuesta a una ideofase,

El diagrama (b) la trofofase e ideofase son sucesivos.

Adaptado de *Metabolismo Secundario* (Parés I Farràs & Juárez Giménez, *Metabolismo Secundario*, 2012)

por M. Tinajero y C. Egas, 2016.

Como se observa en la figura anterior el diagrama (a) indica la acumulación de reservas, que pueden ser utilizadas después del agotamiento del sustrato exterior. El diagrama (b) Puede representar la formación de polisacárido, que están junto a células, que pueden separarse por lavado. En otros casos puede suscitarse un diagrama intermedio entre a y b, donde se representaría la diferenciación celular o producción de pigmentos (págs. 323-324).

Los metabolitos secundarios no son necesarios para la biosíntesis celular y pueden ser producidos por vías biosintéticas primarias (De baets, Vandedrinck, & Vandamme, 2000, págs. 837-853). Demian & Madigan y otros citados en (Chaparro, 2010, págs. 15-16) sostienen que los metabolitos secundarios son productos naturales originados en ciertas especies microbianas, con estructura química diversa, no se encuentran relacionados con la biosíntesis de macromoléculas esenciales, son excretados al exterior celular en condiciones específicas, para supervivencia celular cuando hay competencia, donde la célula puede exudar sustancias que eliminan a los demás microorganismos y permiten su subsistencia y se forman una vez que el crecimiento se ha detenido y la biomasa entra en un estado de estrés.

1.8.3. Características de los metabolitos secundarios

La caracterización de los metabolitos se realiza mediante:

1.8.3.1. Cinética de formación de los metabolitos secundarios

Es importante mencionar que el metabolismo secundario también cuenta con regulación, ésta es llamada represión por catabolito y se define como la inactivación de operones y está ligada con la tasa y la fase de crecimiento, ya que solamente después de utilizar los sustratos más fáciles de metabolizar se puede iniciar la producción de metabolitos secundarios, hay distintas fases de producción (Marinelli & Molinari, 2006):

Momento de inicio de producción: la cual se promueve cuando a ocurrido el término de la multiplicación celular, donde las células están viables; en las bacterias se inicia al final de la fase exponencial.

Tipo de función y duración de la producción: Parte una vez que se inicia la síntesis del metabolito secundario, es una función lineal con respecto al tiempo.

Término de la producción: Se debe a la aparición de un proceso de diferenciación celular que crea células no fabricantes de metabolitos; de igual forma puede ser por la inhibición feedback realizada por el propio metabolito; por la finalización de la síntesis de una enzima importante, por el metabolito y la desnaturalización de la enzima presente y el agotamiento del precursor del metabolito secundario. Es importante mencionar que la formación de metabolitos secundarios, no tiene lugar ni al principio ni a la mitad de la fase logarítmica y no se producen en altas tasas de crecimiento (págs. 1-10).

1.8.3.2. Función útil de los metabolitos secundarios para la célula

Los microorganismos productores de antibióticos son tolerantes a las sustancias que producen. Los genes que se ocupan de la biosíntesis de metabolitos secundarios se encuentran agrupados a genes reguladores, por lo que se trata de un sistema desarrollado que se activa cuando la célula entra a condiciones de estrés cuando hay un estímulo fuera de la célula bacteriana (Parés I Farràs & Juárez Giménez, 2012, págs. 329-330).

1.8.3.3. Clasificación de los metabolitos secundarios

Según Parés I Farràs & Juárez Giménez (2012, págs. 323-350) los metabolitos secundarios pueden ser clasificados por las actividades que tienen en:

Metabolitos con actividad en animales

Son sustancias producidas por microorganismos que tienen actividad celular en animales, dicha actividad con sustancias y en dosis prescritas son beneficiosos; pero hay ciertas sustancias que resultan tóxicas en animales, en un estudio realizado los metabolitos secundarios de *Penicillium citrinum*, cuando son suministrados con el alimento, sobre el desarrollo de ratones *Mus musculus* permite determinar la inflamación en hígado y riñón producido por un irritante químico de toxinas microbianas; además de cortes histológicos que mostraron degeneración hidrópica capsular y necrosis subcapsular enfermedades que son más comunes cuando se sufre de hepatitis alcohólica aguda (págs. 329-330).

Metabolitos con actividad en plantas

Son sustancias que actúan como inhibidores o reguladores del crecimiento vegetal; algunos microorganismos como los hongos forman simbiosis con plantas, pueden ser endófitos. El hongo es capaz de producir metabolitos bioactivos, así como modificar los mecanismos de defensa de su hospedera, permitiendo incrementar la sobrevivencia de ambos organismos. Produciendo compuestos activos que le confieren protección a su hospedera contra el ataque de patógenos y herbívoros (Sánchez-Fernández & Sánchez-Ortiz, 2013, págs. 132-133).

Inhibidores de enzimas

Son moléculas químicas o iones que interfieren en actividades enzimáticas, deteniéndolas o retardándolas. Se ha encontrado la acción del phlebiacrysoico, aislado a partir de cultivos de *Phlebia chrysocrea*, de inhibir la síntesis de los leucotrienos (Sánchez-Fernández & Sánchez-Ortiz, 2013, págs. 132-133).

Autorreguladores

Son aquellos que regulan algunos procesos metabólicos, un ejemplo de ellos son las cepas concernientes al género *Lentinus*, *Oudemansiella*, *Coprinus*, *Auricularia*, *Poria*, y otros. Estas producen colesterol-oxidasa, la cual se emplea para la determinación enzimática de colesterol (Sánchez-Fernández & Sánchez-Ortiz, 2013, págs. 132-133).

Queladores de hierro

Son moléculas producidas por diferentes microorganismos que forman complejos con iones de metales pesados. Son moléculas como 2.3-hidroxilbenzoato o hidroximalato que quelan hierro (Parés I Farràs & Juárez Giménez, 2012, págs. 329-330).

1.9. Resistencia de microorganismos a antibióticos comunes

Desde hace millones de años las enfermedades infecciosas han cobrado innumerables vidas alrededor del mundo, pero aun con el descubrimiento de los antibióticos causan muerte, aproximadamente 17 millones de personas son afectadas, entre ellas se encuentran niños y ancianos. (Lima, y otros, 2012, págs. 466-471).

El monitoreo de enfermedades infecciosas desde la perspectiva de la salud pública se ve amenazado por la resistencia de microorganismos; los países en desarrollo son afectados

ampliamente puesto que las infecciones a las vías respiratorias y gastrointestinales provocan la elevación de la tasa de mortalidad (Pardo & Fernández, 2010, pág. 2).

Por otro lado el uso indiscriminado de los antibióticos, antisépticos y desinfectantes han concebido la supervivencia de microorganismos, logrando evitar la acción bactericida de ciertas sustancias, las bacterias son organismos biológicos que poseen mecanismos para adaptarse a diferentes medios que pueden llegar a ser muy hostiles. Es por ello que el uso de antibióticos ha generado de manera natural resistencia, contribuyen también factores que aumentan la expresión y diseminación de esta característica inherente (Cabrera, Gomez, & Zúñiga, 2007).

La resistencia a los antibióticos se genera de forma natural por la selección de especies resistentes entre las cepas susceptibles, también se puede definir como una mutación espontánea de genes, o por la transferencia de material genético mediante plásmidos provocando resistencia única (sensibilidad de una especie a un determinado tipo de antibiótico), múltiple, intra o inter especie (Pardo & Fernández, 2010, pág. 4).

En el Ecuador la resistencia microbiana se da por el mal uso de los antibióticos, ya que las farmacias se permiten expender parte de la receta, y no aplican la venta responsable de la dosis de los antibióticos completa.

1.9.1. Mecanismos de resistencias

En la tabla 4 se puede observar en forma sintetizada los diversos mecanismos de resistencia que puede producir el mal uso de los antibióticos en la célula.

Tabla 4.

Mecanismos de acción de los antibióticos y mecanismos de resistencia a los mismos

Antibiótico	Mecanismo de resistencia
Penicilinas, Cefalosporinas, Aztreonam, Imipenem, Bacitracin, Vaconmicina, Cicloseina, Fosfomicina	Modificaciones en los componentes de la pared celular. Producción de b-lactamasa. Disminución de la permeabilidad de la membrana externa. Fenómeno de tolerancia.
Quinolonas Nitrofurantoina Metronidazol Rifampicina	Mutaciones cromosómicas de ADN-girasa. Alteraciones en el mecanismo de penetración en la membrana de Gram negativos. Dificultades en la incorporación a la célula por alteraciones energéticas de la membrana citoplasmática. Incremento de la eliminación fuera de la bacteria por la acción de una proteína transportadora. Mutaciones en el blanco constituido por ARN-polimerasa.
Gentamicina Tetraciclina Clidamicina Macrólidos Ácido fusídico Cloranfenicol	Alteraciones en el transporte del antibiótico al interior de la célula Alteraciones en los ribosomas Por producción de una o varias enzimas inhibitorias capaces de modificar el proceso de transporte a través de la membrana Inactivación por la enzima intracelular cloranfenicol acetil transferasa
Sulfonamidas Trimetoprim Isoniacida	Producción de enzimas resistentes a la unión con la sulfonamida

Nota: Adaptado de *Magnitud e impacto de la resistencia a los antibióticos en Latinoamérica* (Pardo &

Fernández, 2010, pág. 7), por C. Egas y M. Tinajero, 2016.

Capítulo 2

Metodología

2.1. Material para el análisis

Para esta investigación se utilizaron muestras de suelo obtenidas de dos regiones del Ecuador, entre los meses de Abril y Mayo del 2015:

- Región Insular-Galápagos: Isla Santa Cruz, Puerto Ayora, Parroquia Bellavista, dentro de una Finca vía a los Guayabillos,
- Región Sierra: Provincia de Pichincha, Cantón Quito, Parroquia de Conocoto, Barrio San José; y de la Provincia de Tungurahua, Cantón Ambato, Parroquia de Cunchibamba, Barrio Loma Grande.

Las muestras fueron recolectadas, a una profundidad de 5-10 cm de la superficie del suelo, las mismas que fueron mantenidas en recipientes estériles, a 3°C de temperatura, hasta la realización del análisis en los laboratorios del CIVABI en la Universidad Politécnica Salesiana.

Según su aspecto físico, los suelos pueden ser del tipo limoso, poseen color café. Cabe recalcar que todas las muestras fueron extraídas de tierras de cultivos.

2.2. Fase 1: Aislamiento y purificación de cepas microbianas del suelo

Esta fase es necesaria para obtener cepas puras con las cuales se trabajará de mejor manera el resto de la investigación.

2.2.1. Preparación de una suspensión de suelo en agua estéril

En condiciones de esterilidad, se pesaron 10 g de la muestra de suelo para añadirla a un frasco con 90 ml de agua destilada estéril.

En el agitador orbital con control de temperatura modelo TE-420 INCUBADORA de marca TECNAL, se dejó en agitación continua durante 1 hora, a 110 revoluciones por minuto (RPM) y 26 °C.

2.2.2. Diluciones seriadas

Se prepararon tubos de ensayo estériles con 9 ml de agua destilada, para preparar las series de diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-16} .

Con una micropipeta se tomó 1000 μ l de la muestra total y se colocó dentro del tubo estéril, se homogenizó agitando el tubo repetidas veces, obteniendo una dilución de 10^{-1} , a partir de esta se repitió el proceso hasta llegar a la dilución de 10^{-16} .

2.2.3. Siembra de diluciones

Se utilizó dos medios de cultivo diferentes para la siembra de las diluciones: Potato Dextrose Agar (PDA) para favorecer el crecimiento de mohos y levaduras y Muller Hinton Agar para favorecer el crecimiento general de bacterias. Se preparó y esterilizó los medios, según las indicaciones del envase.

Manteniendo condiciones de esterilidad, se dispensó de 20-25 ml, de los medios, dentro de cajas petri. Aparte, con una micropipeta se tomó 1000 μ l, de cada dilución (10^{-1} hasta 10^{-16}), y se sembró sobre el medio, solidificado, mediante el método de dispersión, en el cual se utiliza un asa de Drigalsky, para esparcir el inóculo de manera homogénea en

todas direcciones de la superficie del agar. Se dejó en incubación las cajas durante 72 horas a 25 °C.

2.2.4. Aislamiento de microorganismos

Transcurridas las 72 horas de incubación, se seleccionó las cajas Petri donde se observa colonias aisladas, tomando como criterio de selección aquellas cajas donde se aprecia un número máximo de 300 unidades formadoras de colonias (ufc), también se tomó en cuenta los microorganismos que presentaron diferente color o forma a simple vista. A cada cepa pre-seleccionada se le asignó un código, según el siguiente criterio:

Ej.: PAG C001

PA: Proyecto Antibióticos

G: Sigla del lugar de muestreo (Galápagos)

C: Cepa aislada

001: numero en orden de aislamiento

Con un asa bacteriológica, se tomó una pequeña cantidad de la cepa pre-seleccionada y se inoculó en una nueva caja petri, mediante la técnica de estriado en placa de agar. Se repitió el proceso según la cantidad de cepas pre-seleccionadas. Se incubaron las cajas durante 24 horas a 35 °C. Si se observa que el crecimiento es homogéneo, se almacena; caso contrario se realiza una resiembra separando los diferentes microorganismos y asignando un nuevo código.

Se inoculó cada cepa pura dentro de 2 tubos pico de flauta con Muller Hinton Agar, para el mantenimiento del cepario, uno de los tubos se mantiene sin uso como muestra de

respaldo de la cepa aislada, a partir de éste se hace el mantenimiento del cepario. Se incubaron los tubos durante 24 horas a 35 °C, para después ser conservados dentro del refrigerador a 2°C. Cada mes se realizará este proceso con el fin de conservar la cepa activa.

2.3. Fase 2. Antibiograma cepas pre-seleccionadas

La siguiente fase se dividió en dos partes, con dos métodos distintos, con el fin de asegurar la selección de las cepas que producen antibióticos.

Se utilizó como microorganismos de control de la actividad antibacteriana *Bacillus spizizenii* ATCC 6633 (Gram+) y *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9027 (Gram-). Los cuales se sembraron en medio Agar Nutritivo, crecimiento de 24 a 48 horas a 30 °C y conservación a 2°C dentro de una refrigeradora, para su continuo uso.

2.3.1. Método de rayado con palillos

Preparación del microorganismo sensible

Se inoculó cada cepa ATCC, en un tubo con 10 ml de medio Tryptic Soy Broth (TSB) estéril, y se dejó en incubación por 18 horas a 30 °C, según el método conocido como overnight.

Transcurrido el tiempo, dentro de la cámara de flujo laminar se realizó el ajuste de turbidez según la escala McFarland, agregando lentamente 1 ml de agua destilada estéril al tubo hasta obtener la turbidez semejante al de 0.5 McFarland, obteniendo una

suspensión bacteriana que contiene 1.5×10^8 UFC/mL, necesaria para este tipo de pruebas antimicrobianas.

Preparación de placas test

Se utilizó Agar Nutritivo, preparado según las instrucciones del fabricante y previamente esterilizado y mantenido a 45 ± 2 °C en baño maría.

Por separado, se adicionó el inóculo de *Bacillus spizizenii* ATCC 6633 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, tomando en cuenta que cada 25 ml de medio deben contener 1 mL de suspensión bacteriana 0,5 McFarland. Se agitó el medio con la suspensión bacteriana hasta su homogenización, luego se dispensó dentro de cajas petri y se dejó solidificar.

Las cepas pre-seleccionadas se sembraron haciendo líneas rectas de entre 1 y 2 cm, sobre la superficie de las placas test utilizando palillos estériles, 8-10 líneas por placa (Figura 2). Y se incubó a 25 °C durante 24 horas para permitir el crecimiento de los microorganismos aislados del suelo y la producción de antibiótico. Las placas se realizaron por triplicado.

Se observó el resultado y se seleccionaron las cepas que producen un halo de inhibición alrededor del rayado de los diferentes microorganismos.

Método de rayado con palillos

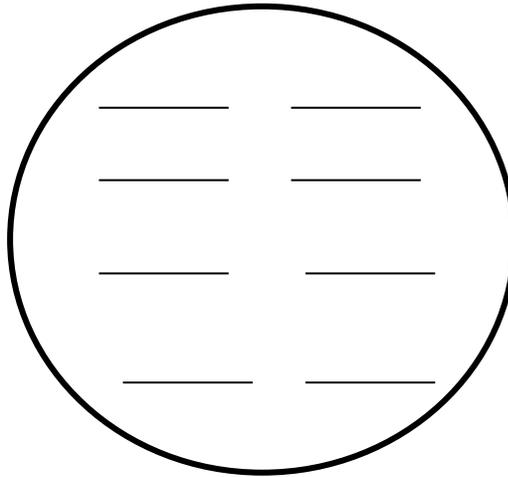


Figura 2. Esquema de la siembra con palillos

Elaborado por: C. Egas y M. Tinajero, 2016.

2.3.2. Método de “cilindros de agar”

Al seguir la metodología descrita por Serrano, Uzcátegui, & Panizo (2013, pág. 135), se realizó el mismo proceso detallado en el paso anterior, para la preparación de los microorganismos sensibles *Bacillus spizizenii* ATCC 6633 y *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9027.

Preparación de cepas seleccionadas

Las cepas que produjeron inhibición, resultado del método de rayado con palillos, son microorganismos que ciertamente tienen la capacidad de producir una molécula antibiótica, estos se sembraron en una caja petri nueva, en medio Muller Hinton Agar, y se incubaron por 24 horas a 35 °C.

Dentro de cámara de flujo laminar, se realizaron cilindros de agar que contienen el microorganismo, utilizando un perforador el cual tiene de 8 mm de diámetro. Se realizaron 5 perforaciones por placa.

Preparación de placas test

Las placas test con *Bacillus spizizenii* ATCC 6633 y *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9027, se prepararon de acuerdo al método descrito anteriormente, por triplicado.

Se colocaron los cilindros de agar sobre la superficie de las placas test, el cilindro fue invertido para que la cepa a prueba este en contacto con el microorganismo sensible. Se dejó en incubación por 4 días, variando 24 horas luz, 24 horas oscuridad, y así sucesivamente a temperatura ambiente de aproximadamente 25 ± 2 °C (Serrano, Uzcátegui, & Panizo, 2013).

2.3.3. Selección de microorganismos productores de antibióticos

Las cepas que produjeron un halo de inhibición fueron seleccionadas para continuar con el resto de los análisis, se tomaron los datos del diámetro del halo mediante el calibrador vernier o pie de rey.

2.4. Fase 3. Caracterización de las cepas productoras de antibióticos

Se trata de la caracterización fenotípica de las cepas aisladas, donde se conoce las características culturales de las cepas mediante tinción de Gram y la tinción cultural realizada con azul de metileno; y las características bioquímicas determinadas por las pruebas API (Microgen TM Gn A+B-ID System).

2.4.1. Tinción diferencial de Gram

Al considerar como base la metodología descrita por Santambrosio & Garibaldi (2009) esta prueba se realizó a las 24 horas de incubación de las cepas

Se tomó una pequeña cantidad de la cepa y se realizó un frotis, se añadió unas gotas de cristal violeta y reposó durante 1 minuto, posteriormente se retiró el exceso y añadió gotas de Lugol durante 1 minuto y se agregó alcohol-cetona durante 20 segundos. Por último se enjuagó con abundante agua destilada y se agregó gotas de safranina dejando reposar por 1 minuto para nuevamente enjuagar con agua destilada; finalmente se cubre la muestra con un cubre objetos y se observa al microscopio con el lente de 100X, de ser necesario se agrega una gota de aceite de inmersión.

Esta prueba se fundamenta en la diferencia de la estructura de la pared celular en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Al ser la pared de las gram-positivas es formada por varias capas interconectadas de peptidoglicano así como de ácido teicoico; la pared de las bacterias gram-negativas, contienen de 10%-20% de péptidoglicano y el resto de los componentes son fosfolípidos, lipopolisacáridos y lipoproteínas, por lo que no son resistentes a la decoloración (págs. 1-2).

2.4.2. Tinción con colorante Azul de Metileno

Se realizó esta tinción con el fin de observar la estructura celular de las cepas. Para ello:

Se tomó una pequeña cantidad de la cepa con el asa bacteriológica, colocándola sobre el porta objetos y se agrega 1 o 2 gotas de azul de metileno y se colocó un cubre objetos limpiando el exceso de colorante y se observó la muestra al microscopio con el lente de 100X, y se agregó una gota de aceite de inmersión.

2.4.3. Tinción de esporas

Se realizó un frotis de la cepa mediante, se fijó la muestra, posteriormente se cubrió la muestra con un pedazo de papel filtro, sujetado con pinzas, y se agregó varias gotas de colorante verde malaquita, se pasó sobre la llama del mechero dejando que emita vapores, agregando más colorante para evitar que se seque, el proceso se realizó durante 8 minutos, luego se enfrió por 5 minutos, posteriormente se lavó suavemente con agua destilada. Finalmente se agregó 1 gota de safranina durante 1 minuto, y se enjuagó con agua y observó al microscopio.

2.5. Cinética de crecimiento microbiano

Se tomó como base la metodología descrita por Carlone (2014, págs. 40-50) la estandarización del inóculo para ser utilizado cualitativa y cuantitativamente es un aspecto fundamental del método utilizado, siguiendo el procedimiento sugerido por CLSI. La suspensión microbiana es preparada y estandarizada con la lectura de la densidad óptica del espectrofotómetro (DO con $\lambda = 625$ nm para bacterias); para macrodilución, microdilución y diluciones en agar la DO comprende entre 0.08 y 0.11 que corresponde a $1 - 2 \times 10^8$ UFC²/ml para la bacteria; el uso de un inóculo con más cantidad de microorganismos provoca un aumento del valor numérico del MIC (falso negativo). Una alternativa menos exacta consiste en la comparación visual de turbidez del caldo de cultivo de la cepa examinada con la suspensión McFarland 0.5 (obtenida con $BaSO_4$ a la concentración de 0.01 M o con partículas de latex).

2.5.1. Temperatura óptima de crecimiento

Se llevó a cabo la determinación del crecimiento microbiano de cepas productoras de antibióticos, variando la temperatura a 18°C, 30°C, y 45°C, para lo cual:

Se inoculó por duplicado 3 UFC de cepa seleccionada en erlenmeyers con 75ml de medio TSB, se dejó en incubación a las diferentes temperaturas mencionadas, por separado, durante 5 días. Se realizaron mediciones diarias en el espectrofotómetro UV, tomando en cuenta los parámetros antes mencionados.

2.5.2. pH óptimo de crecimiento

Se realizó la determinación del crecimiento microbiano en cepas productoras de antibióticos a diferentes valores de pH 5, 6, 7 y 8 ± 0.2 para lo cual:

Se inoculó por duplicado 3 UFC de cepa seleccionada en un erlenmeyer con 75ml de medio TSB, se dejó en incubación a temperatura óptima, resultado del proceso anterior, durante 5 días, se realizó mediciones diarias en el espectrofotómetro UV, tomando en cuenta los parámetros antes mencionados.

2.6. Producción del antibiótico

Se consideró como base la metodología descrita por Boubetraa, & otros (2013, pág. 224).

Medio ISP2

Se preparó 1000ml de ISP2 pesando 4.0 g de extracto de levadura, 10.0 g. de extracto de malta y 4.0 g. de dextrosa. Se reguló el pH del caldo hasta llegar a 8.6 ± 0.2 , posteriormente se lleva hasta a ebullición para finalmente se autoclava.

Medio antibiótico N°5

Se preparó 1000 ml de medio antibiótico pesando 1.5 g. de extracto de carne, 6.0 g de extracto de peptona de gelatina, 3.0 g. de extracto de levadura y 15.0 g. de agar. Se reguló el pH del medio hasta llegar a 8.6 ± 0.2 , posteriormente se lleva hasta a ebullición para finalmente autoclavar.

2.6.1. Actividad antimicrobiana

Como una prueba preliminar se evaluó el potencial antibiótico de las cepas seleccionadas en caldo ISP2 durante 10 días, con el fin de elegir el tiempo de cultivo favorable para la producción de antibióticos. Los matraces Erlenmeyer de 250 ml, que contenían 50 ml de medio previamente inoculados con 3 ml de caldo con pre-cultivo de las cepas seleccionadas con el mismo medio, y se incubó a 30 °C durante 2 días. Los cultivos se incubaron en un agitador rotatorio (150 rpm) a 30 °C durante 10 días. La producción de antibióticos fue examinada todos los días.

Posteriormente se repitió la prueba incrementando el volumen de medio, para lo cual se utilizó frascos boeco de 500 ml que contenían 250 ml de medio previamente inoculados con 15 ml de caldo con pre cultivo de las cepas seleccionadas con el mismo medio, y se incubó a 30 °C durante 2 días. Los cultivos se incubaron en un agitador rotatorio (150 rpm) a 30 °C durante 10 días. La producción de antibióticos fue examinada todos los días. La actividad antimicrobiana en el caldo de cultivo se monitorizó mediante el ensayo de difusión en pocillo de agar utilizando *Bacillus spizizenii* ATCC 6633 y *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9027 como patógenos.

Para saber la concentración del pre-inoculó se tomó como base la metodología descrita por Becton & Company (2005, págs. 1-3) para preparar y comparar Estándares de McFarland (Tabla 5), que se utilizan como patrones de turbidez en la preparación de suspensiones de microorganismos. Se agita los patrones en un vórtex mecánico, mediante una luz adecuada, se comparó la turbidez de la suspensión bacteriana con la turbidez del patrón, sosteniendo los tubos contra un fondo blanco con líneas negras horizontales de contraste, y se observa según la concentración del patrón en relación a la concentración de células por ml.

Tabla 5.

Preparación de Estándares de McFarland

Estándar N°	Volumen (ml) BaCl ₂ (1.175%)	H ₂ SO ₄ (1%)	Equivalente en N° de bacterias/ml (x10 ⁸)
0.5	0.5	99.5	1.5
1	1.0	99.0	3
2	2.0	98.0	6
3	3.0	97.0	9
4	4.0	96.0	12
5	5.0	95.0	15
6	6.0	94.0	18
7	7.0	93.0	21
8	8.0	92.0	24
9	9.0	91.0	27
10	10.0	90.0	30

Nota: Tomado de *McFarland Turbidity Standard N°5* (Becton & Company, 2005, págs. 1-3).

2.6.2 .Método de difusión en pocillo de agar

Se tomó como base la metodología descrita por Febina, Rachel, & Shenbagarathai (2014, pág. 3) puesto que se colocó 60ul del sobrenadante en el pozo, realizado con pipetas pasteur en medio antibiótico N°5 previamente inoculado con *Bacillus spizizenii* ATCC 6633 y *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9027. Para obtener el área de inhibición

total se resta el área del pocillo (28.3 mm²). Los experimentos se realizaron por triplicado.

2.7. Pruebas Bioquímicas Microgen™ Gn A+B-ID System

Se requirió de un cultivo de cepas bacterianas puras, de 18-24 horas, previo se realizó la prueba de oxidasa y posteriormente se emulsionó un inóculo de una colonia en 3 ml de solución salina estéril a 0.85% y se colocó de 3-4 gotas de inóculo en los micro pocillos tanto en GN A y GN B, retirando tiras adhesivas sin desecharlas.

Después de la inoculación en los pozos 1, 2,3 y 9 (GN A) y en los pozos 20 y 24 (GN B) se colocó de 3-4 gotas de aceite mineral estéril (si es oxidasa positivo no colocar aceite mineral en el pocillo 20); se selló los pocillos con las tiras adhesivas e incubaron de 35 °-37° C.

GN A: Posteriormente se adicionó reactivos y la lectura de resultados para los organismos oxidasa negativos se realizó el procedimiento a las 24 horas, mientras para oxidasas positivas a las 48 horas. Se agregó 2 gotas de reactivo de Kovac en el pocillo 8. Luego de 60 segundos se registraron los resultados (rojo/positivo); en el pocillo 10 se colocó una gota de VP I y una gota VP II y se revisó resultados transcurrido de 15 a 30 minutos (rojo/rosa oscuro/positivo); en el pocillo 12 se agregó 1 gota de reactivo TDA bien 12 y se revisó resultados después de 60 segundos (rojo, cereza/ positivos); y adicional para la prueba de oxidasas positivos se colocó en el pocillo 7, 1 gota de Nitrato A y 1 de Nitrato B observaron los resultados a los 60 segundos (rojo/positivo).

GN B: El pocillo 13 indica positivo por el color negro cuando hay licuefacción de gelatina. La arginina también se interpreta de manera diferente después de 24 horas y 48 horas incubaciones:

24 horas (enterobacterias)

48 horas (oxidasa organismos positivos)

Amarillo = Negativo

Amarillo / verde = Negativo

Verde / azul = Positivo

Azul = Positivo

2.8. Extracción y purificación de antibióticos

El caldo de cultivo se centrifugó para separar la biomasa bacteriana, posteriormente se retiró el sobrenadante y se colocó en un embudo de separación con la misma cantidad de diclorometano, el cual extrajo el medio, dejando como resultado las mezclas antibióticas. Posteriormente se disolvió las mezclas en 1 ml de metanol y se bioensayó contra *Bacillus spizizenii* ATCC 6633 y *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9027 como patógenos. Utilizando el ensayo de difusión en pocillo de agar.

2.9. Espectro infrarrojo de los antibióticos obtenidos

Al utilizar la metodología de Baran & Etcheverry (1983, pág. 95), se realizó la técnica de micro pastillas de Bromuro de Potasio (KBr), los ensayos fueron realizados por duplicado, donde se pesó un gramo de KBr y compactándolo en una pastilla bañada por una gota del antibiótico purificado previamente diluido en metanol (hasta 100mg/ml) se procedió a la lectura.

Capítulo 3

Resultados y discusión

3.1. Del aislamiento y purificación de microorganismos productores de antibióticos

A partir de las muestras de suelo obtenidas de la Región de Insular y la Región Sierra, se aisló un total de 27 cepas purificadas y codificadas; 8 de ellas provenientes de Galápagos Isla Santa Cruz, Puerto Ayora, Parroquia Bellavista, 14 de la Provincia de Tungurahua, Cantón Ambato, Parroquia de Cunchibamba y las 5 restantes de la Provincia de Pichincha, Cantón Quito, Parroquia de Conocoto (Anexo 1).

Se seleccionaron cajas con menor carga microbiana de máximo 300 UFC/g y se observó diferente forma, tamaño y color, según Camacho, y otros (2009, págs. 1-2) las unidades formadoras de colonia (UFC/g) pueden ser provenientes de un microorganismo o de una agrupación de estos, de ahí que su aislamiento es indispensable.

Del total de cepas seleccionadas 21 crecieron en Muller Hinton, un medio general, que según Acumedia (2011, pág. 1) es utilizado para el aislamiento primario de especies y proporciona un desarrollo satisfactorio de la mayoría de los patógenos no exigentes; 6 de las 27 cepas se aislaron en Agar Dextrosa Papa que según (Cadeño, 2004) es un medio donde crecen microorganismos exigentes (hongos y levaduras).

Al analizar las 27 cepas aisladas, por el método de rayado con palillos, solamente 11 produjeron un halo de inhibición alrededor de la línea de siembra (anexo 2). Por lo tanto

se realizó la primera selección, en función de la capacidad de los microorganismos para producir sustancias antibióticas.

3.2. De la capacidad de producir halos de inhibición por los microorganismos preseleccionados

Al momento de realizar en las 11 cepas la prueba de estrés: utilizando el método de cilindros de agar, descrito en la metodología, se escogieron 6, por presentar halo de inhibición. De estas, solamente 1 cepa fue capaz de producir posibles sustancias inhibitorias en contra de *Bacillus spizizenii* y *Pseudomona aeruginosa*. Las demás cepas solo inhibieron a uno de los dos microorganismos (anexo 3). Según Vázquez, Santana, & Serrano (2002, págs. 245-246) se debe a que no todos los antibióticos tienen el mismo espectro de acción contra distintos gérmenes, existiendo entonces antibióticos de espectro reducido y de amplio espectro (útiles para microorganismos Gram positivos y Gram negativos).

El criterio para determinar la mejor cepa productora de antibióticos fue el tamaño del halo formado por cada una de las mismas. Por tal razón, se realizó análisis de varianza, Tukey, el cual permitió comparar los halos de inhibición (área en mm²), obtenidos por repetición. Cabe recalcar que se eliminaron valores atípicos para evitar resultados no reales.

Análisis de varianza (Tukey) en los halos formados contra *Bacillus spizizenii*

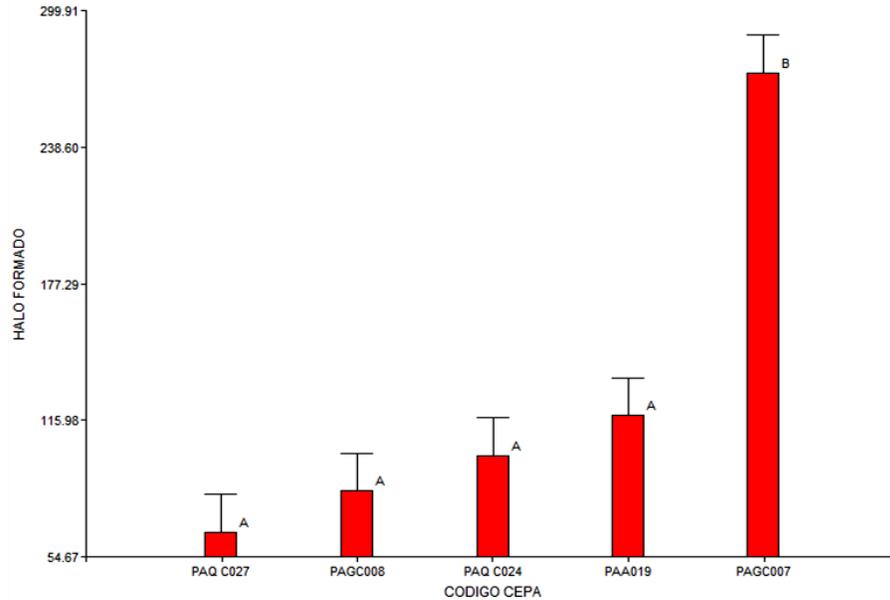


Figura 3. Media de los halos de inhibición producidos contra *Bacillus spizizenii*

Nota: Obtenido del programa InfoStat (Di Rienzo, y otros, 2014), por M. Tinajero y C. Egas, 2016

En las figuras 3 y 4, se interpreta con una letra la media de los halos de inhibición producidos por cada cepa, la letra “A” representa a las cepas que no son diferentes significativamente, en cuanto a la medida de su halo, mientras la letra “B” destaca por ser diferente, a las demás. Es decir, en el caso de la Figura 3, la cepa PAG C007 produce halos más grandes contra *Bacillus spizizenii*, y en la Figura 4, para *Pseudomona aeruginosa* es la cepa PAQ C023.

Análisis de varianza (Tukey) en los halos formados contra *Pseudomonas aeruginosa*

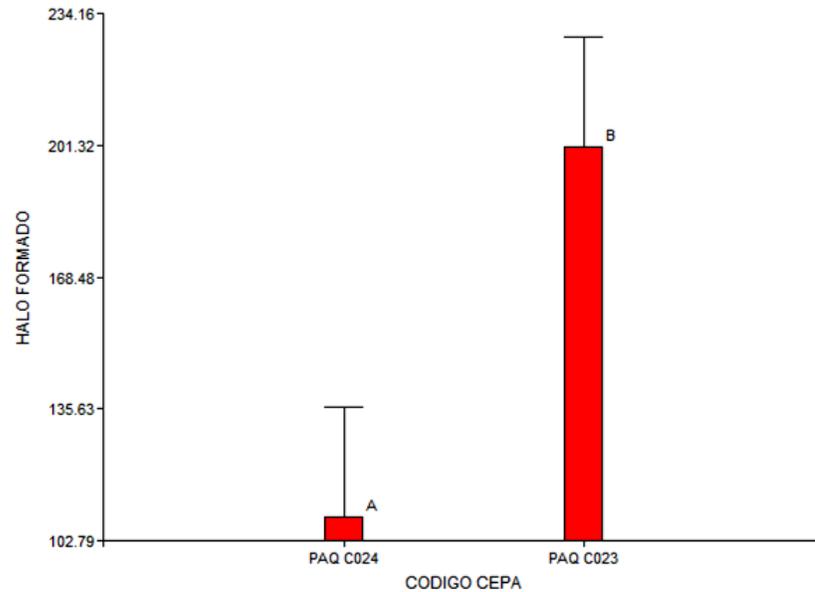


Figura 4. Media de los halos de inhibición producidos contra *Pseudomonas aeruginosa*

Nota: Obtenido del programa InfoStat (Di Rienzo, y otros, 2014), por M. Tinajero y C. Egas, 2016.

3.3. De la caracterización morfo-cultural de las cepas

Las cepas aisladas fueron sometidas a un análisis morfo-cultural, donde cada una presenta características propias como se observa en la tabla 6. Según Pirez & Mota (2010, pág. 23) dependen de la movilidad bacteriana y de su pared rígida; las de aspecto homogéneo y de textura uniforme, son características de microorganismos de tipo salvaje recientemente aislados de su hábitat natural. La tinción de Gram fue negativa para todas las bacterias aisladas, de igual manera la tinción de esporas.

Tabla 6.

Caracterización Morfocultural de cepas productoras de antibiótico

Código	Forma	Color	Superficie	Borde	Gram	Esporas
PAG C007	Circular	Amarrillo	Planoconvexa	Redondeada	Negativa	Negativa
PAG C008	Circular	Beige	Planoconvexa	Redondeada	Negativa	Negativa
PAA C019	Circular	Amarillo	Planoconvexa	Redondeada	Negativa	Negativa
PAQ C023	Irregular	Blanco	Umbilicada	Ondulada	Negativa	Negativa
PAQ C024	Irregular	Amarillo	Planoconvexa	Lisa	Negativa	Negativa
PAQ C027	Irregular	Blanca	Convexa	Ondulada	Negativa	Negativa

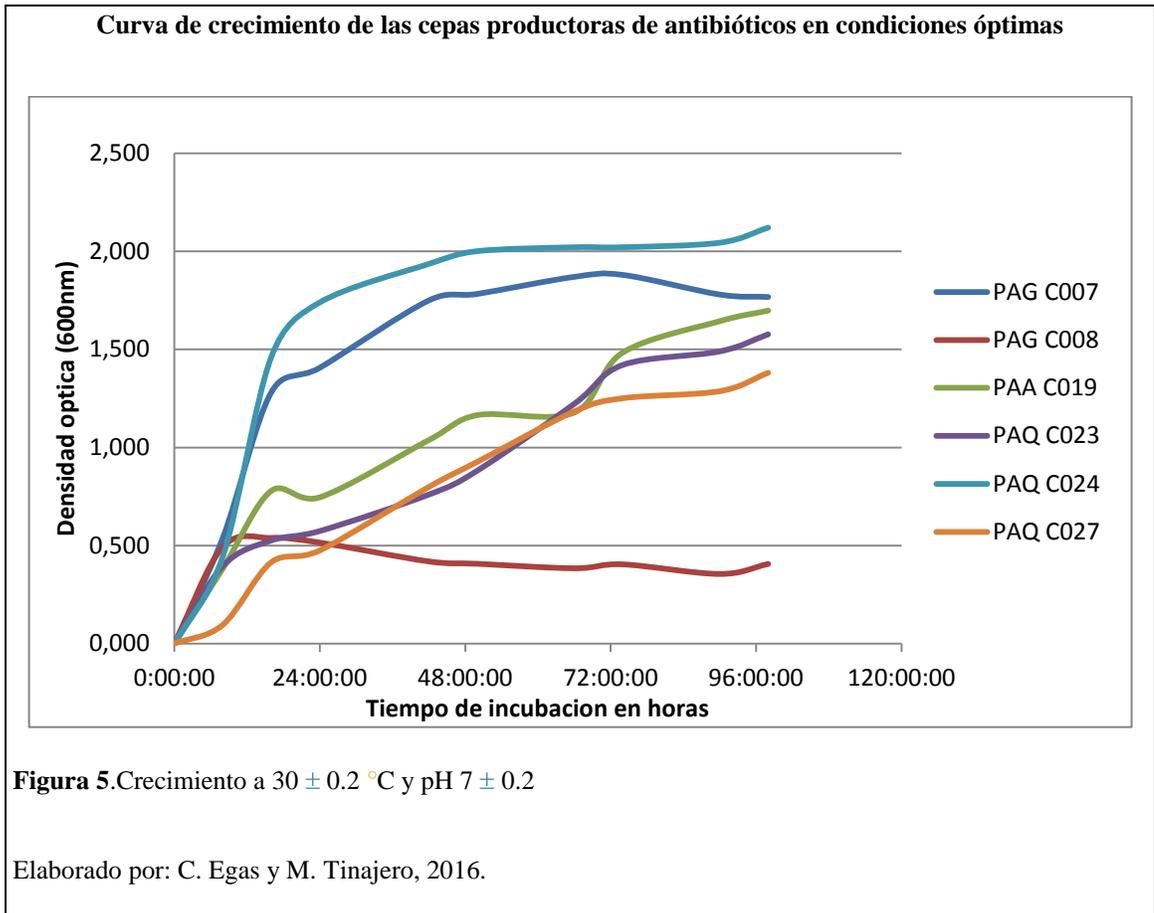
Nota: Elaborado por C. Egas y M. Tinajero, 2016.

3.4. Cinética de crecimiento

Se determinó que las condiciones óptimas de crecimiento, para todas las cepas seleccionadas, fue a 30 ± 0.2 °C y pH 7 ± 0.2 (Anexo 7). Como lo mencionan, Arias & Lastra (2009, págs. 19-21), puede tratarse de microorganismos mesófilos, dado que estos crecen a temperaturas entre 10 - 45°C, siendo excelente entre 20 – 40 °C, y neutrófilos, ya que su pH interno es de 7.5, y que para mantener esta condición se necesita que el pH externo, es decir el medio de cultivo, esté entre 5.5 y 8.5.

Como se puede observar en la figura 5, la curva de crecimiento en condiciones óptimas tiene una fase de adaptación corta, una fase exponencial rápida en las cepas PAG C007, PAG C008 y PAQ C024, en el resto de las cepas es prolongada, existe también una fase estacionaria estable en la mayoría de cepas, lo cual corrobora el éxito de las condiciones óptimas ya que, la muerte de individuos se compensa con la aparición de otros nuevos;

en esta grafica no se alcanza a mostrar la fase de muerte de las cepas, pero eso no quiere decir que no exista una, según Koneman & Allen (2008, pág. 191) el crecimiento cesa por falta de nutrientes en el medio, o la acumulación de sustancias toxicas o inhibitorias.



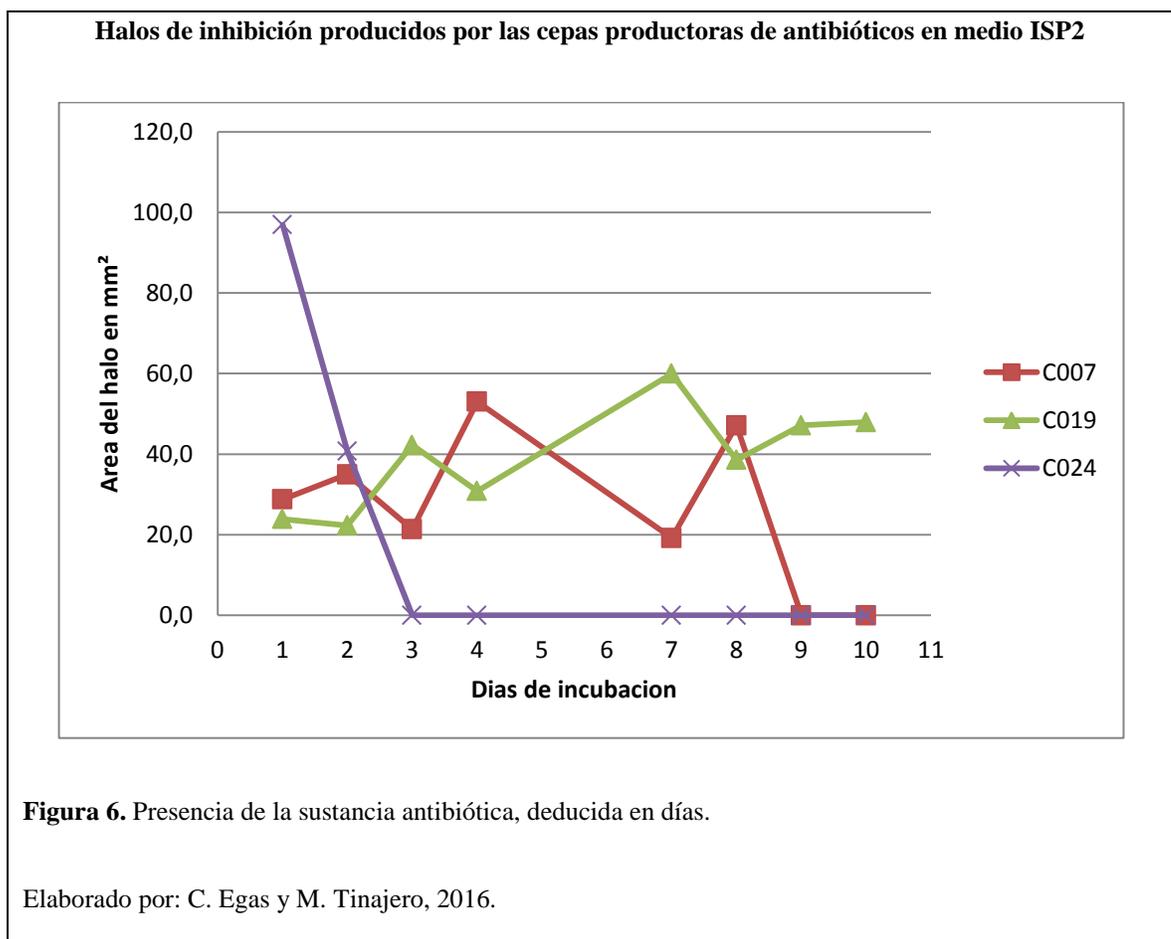
Las gráficas de las otras temperaturas y pH ensayados, que sirvieron para diferenciar las condiciones óptimas de crecimiento, se encuentran en los anexos 8-9.

3.5. Producción de la sustancia antibiótica

De las 6 cepas seleccionadas anteriormente, se escogieron 3 cepas, ya que produjeron antibiótico en el medio ISP2, en un volumen de 50ml. Como mencionan Messaoudi, Bendahou, Benamar, & Abdelwouhid (2015, pág. 440), este medio estimula mejor la

producción de antibióticos por parte del microorganismo, ya que provee energía y eleva la fermentación gracias a los componentes que constituyen el medio.

La presencia de antibiótico fue medido en halos de inhibición, producido diariamente durante diez días consecutivos. En la figura 6 se puede observar que el mejor día de producción de antibiótico para PAG C007 fue el día 4, para PAA C019 el día 7, y para PAQ C024 el primer día. Sharon, Rachel, & Shenbagarathai (2014, pág. 509) mencionan que la capacidad de los microorganismos para formar antibióticos no es una propiedad fija, así que puede incrementarse o disminuirse por completo por diferentes condiciones de nutrientes en el medio de cultivo, esto podría explicar la inestabilidad que tienen las líneas que representan a las cepas en el gráfico.



Es importante mencionar que tanto la cepa PAG C007 como PAQ C024 dejan de producir halo de inhibición, al noveno y tercer día respectivamente. Según Hernández, Alfaro, & Arrieta (2003, págs. 47-48) el microorganismo produce, como parte de su metabolismo, sustancias tóxicas que impiden su reproducción y por lo tanto mueren, en este caso la acumulación de sustancias antibióticas producidas en el medio evita que, el propio microorganismo que las produce, pueda multiplicarse.

3.6. De la extracción del antibiótico

El día de mayor producción de antibiótico, en 500ml, para la cepa PAG C007 fue el octavo, para PAA C019 fue el noveno y para PAQ C024 fue el séptimo. Cabe recalcar que los pre-inóculos utilizados dieron el siguiente resultado en la escala de McFarland (tabla 7).

Tabla 7.

Turbidez de la suspensión bacteriana

Código	Estándar McFarland	Equivalente en N° de Bacterias/ml x 10⁸
C007	5	15 x 10 ⁸
C019	5	15 x 10 ⁸
C024	5	15 x 10 ⁸

Nota: Elaborado por: C. Egas y M. Tinajero, 2016.

La diferencia del tiempo de producción se debe según Anaya (2003, pág. 115), a que los antibióticos son productos de procesos metabólicos de gran valor durante el crecimiento en condiciones experimentales, donde su producción en ciertas colonias microbianas cultivadas puede ser tardía debido a que según Leo (2009, pág. 23), el crecimiento bacteriano, puede ser asincrónico puesto que cada microorganismo se encuentra en un punto diferente del ciclo, por esta razón es que en una población se encuentran células que acaban de dividirse, otras replican su ADN, otras comienzan la división celular.

Se realizó el escalamiento del proceso anterior, en 500 ml de medio ISP2 y se obtuvo los pesos de mezclas antibióticas que se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 8.

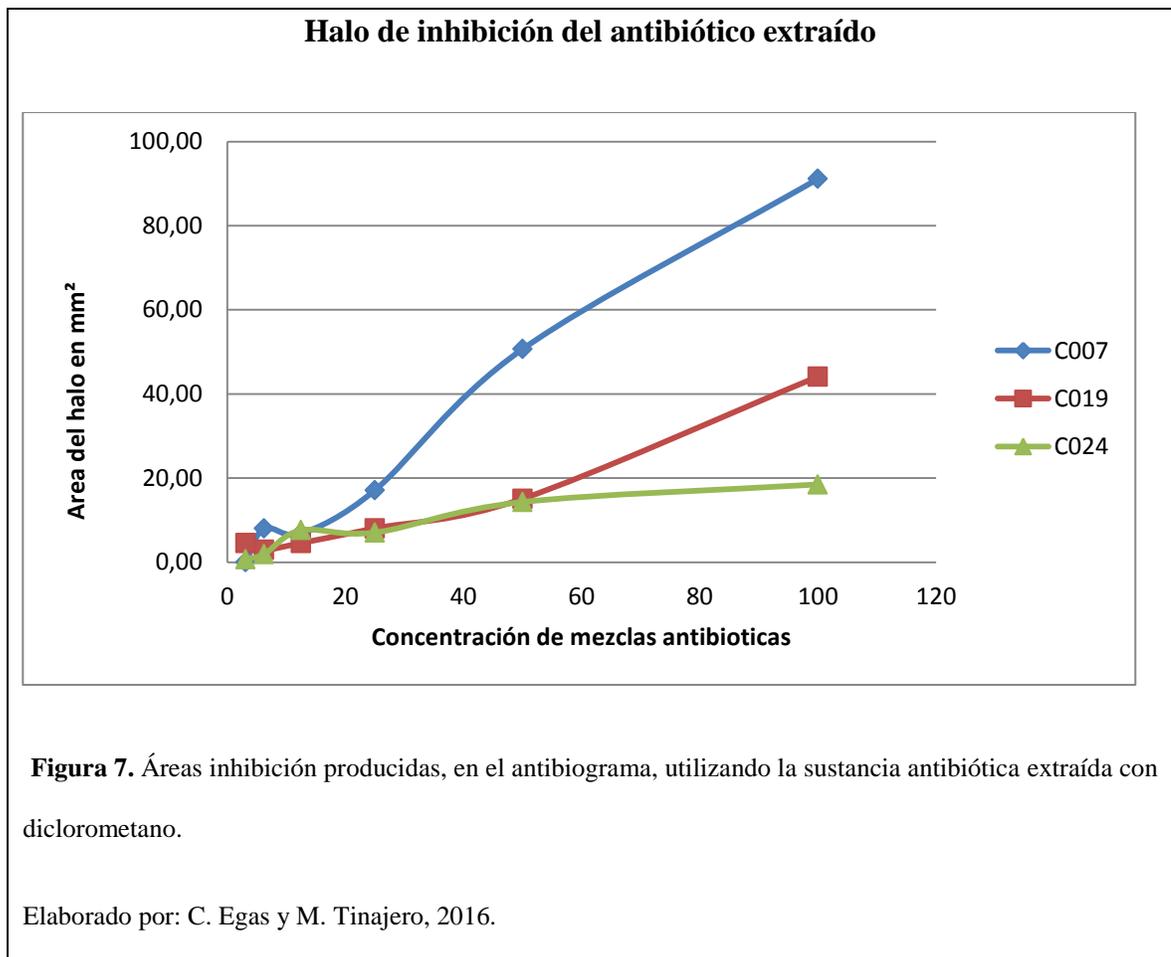
Peso del antibiótico en gramos

Código	Cantidad de antibiótico en gramos
PAG C007	0.0218
PAA C019	0.0601
PAQ C024	0.0564

Nota: Elaborado por: C. Egas y M. Tinajero, 2016.

La figura 7 muestra los halos de inhibición del antibiótico extraído en función de la concentración disuelta en metanol (100, 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.125 %), el cual indica que al aumentar la concentración de antibiótico, aumenta paralelamente el área del halo de inhibición así obtenemos actividad antimicrobiana significativa al 100 % en las tres cepas. La cantidad de antibiótico depende de la cepa que lo produce y del solvente que se utiliza para su extracción (Pumarola, 1999, pág. 62). Los antibióticos al ser

termolábiles necesitan un solvente el cual debe poseer un punto de ebullición hasta 40 °C puesto que al aumentar la temperatura, la presión de vapor aumenta, formando burbujas en el líquido una vez ocurrido esto la temperatura permanece constante y el líquido comienza a evaporarse (Jaramillo, 2007), obteniendo así el peso en gramos del antibiótico.



3.7. Resultado de las pruebas bioquímicas

El kit de identificación Microgen™ GnA+B-ID System realizado a la cepa PAG C007 reveló un 86.79% de probabilidad de pertenecer a la especie *Burkholderia cepacia*

(anexo 4), de igual manera la cepa PAQ C024 reveló un 99.51% de probabilidad de ser *Burkholderia cepacia* (anexo 6). Es una especie aeróbica, que no forma esporas, es recta o ligeramente curvada, en forma de bacilo, es una bacteria Gram negativa. Como lo mencionan Parra, Centeno, & Araque (2009, págs. 1-2), ésta es una bacteria con gran potencial para el control biológico de microorganismos fitopatógenos, su actividad inhibitoria se atribuye a la producción de metabolitos secundarios como la cepacina, pirrolnitrina, altericidina y otros compuestos volátiles y no volátiles aún no identificados.

La cepa PAA C019 reveló 100% de probabilidad de ser un *Xanthomona maltophilia* (anexo 5). Según Gutiérrez, Reyes & Corona (2007, págs. 91-92) esta cepa actualmente es llamada *Stenotrophomona maltophilia*; en los medios de cultivo son colonias lisas de color amarillo con su centro color blanco, y su temperatura optima de crecimiento es 30-35 °C. Según Juliet & Fernández (2006, pág. 247) es un Bacilo Gram negativo pequeño, oxidasa negativo, que se desarrolla de manera rápida en los medios de cultivo, sus colonias son rugosas de 3 a 5 mm de diámetro. Su hábitat principal es el acuático y el suelo, en las plantas y en los animales, es un bacilo no esporulado (Cercenado, 2006, págs. 1-2), lo cual corrobora la caracterización morfocultural y la cinética de crecimiento previamente descrita.

3.8. Espectro infrarrojo

Al analizar el espectro infrarrojo de cada antibiótico extraído de las cepas: PAA C007 y PAG C019 se detectaron grupos similares entre los espectros de los dos antibióticos (anexo 10). Los grupos funcionales presentes fueron: N-H (3400-3500), C-H (2700-3000) y C=O (1630-1695) con una cadena lateral con doble enlace. No constan en las

gráficas grupos hidroxilo (OH). Anaya, Espinosa, & Cruz (2001, pág. 37) mencionan que las características químicas de un antibiótico, formado por el metabolismo secundario, deriva del grupo de los aminoácidos, puesto que estos dan origen a estos compuestos, de ahí la importancia de encontrar el grupo funcional amino dentro de los espectros, esto podría confirmar con certeza la presencia de la sustancia antibiótica, extraída a partir de microorganismos del suelo.

En el antibiótico de PAQ C024, la formación del compuesto fue menor, ya que los picos del N-H son imperceptibles (anexo 10), esto puede tener relación a la masa atómica de la sustancia ya que, según Serrano (2004, págs. 2-6), las masas atómicas menores tienden a originar frecuencias de mayores tamaños; además se puede recalcar que si bien el antibiótico fue extraído del medio, aún no se encuentra en forma pura menciona que las vibraciones en moléculas poliatómicas son mucho más complejas que en una molécula diatómica simple que sólo puede vibrar en un modo, y es por esta razón que los picos formados no se pueden apreciar de mejor manera (págs. 5-10).

No existe evidencia de anillos bencénicos, por lo tanto se presume que el antibiótico no es familia de las tetraciclinas, por consiguiente, la cadena estructural sería alifática y no aromática; al tener un espectro bacteriano reducido se presume que pertenece a la familia de las Polimixinas y Bacitracinas (Antibióticos Poli peptídicos), que según la Universidad Autónoma de Madrid (2010, pág. 65) tienen un espectro limitado, son alifáticos y de origen natural.

Es importante aclarar que el compuesto ensayado no es puro por lo que pudo haber rastros del solvente u otras impurezas.

Conclusiones

Del total de 27 cepas aisladas, a partir de suelos de la región Insular-Galápagos y la región Sierra-Norte, 6 manifestaron su capacidad de producir sustancias antibióticas, (PAG C007, PAG C008, PAA C019, PAQ C023, PAQ C024 y PAQ C027), en *Bacillus spizizenii* (ATCC 6633), una bacteria Gram positiva. Ninguna cepa mostró inhibición contra *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 9027), Gram negativa.

Al caracterizar las 6 cepas productoras de antibióticos, se obtuvo, que se tratan de bacterias Gram negativas, no formadoras de esporas, y en forma de bacilos. Su crecimiento óptimo en medio líquido se da a una temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.2$, con un pH neutro de 7 ± 0.2 .

A pesar de que las 6 cepas produjeron halos de inhibición, evidenciando la producción de sustancias antibióticas, al utilizar el medio ISP2, se logró extraer el antibiótico dentro del líquido únicamente en las cepas: PAG C007, PAA C019 y PAQ C024. Se comprobó la producción de antibióticos, mediante pruebas de Screening con muestras diarias del medio de cultivo, donde se desarrollaban las cepas.

Al realizar el escalamiento del cultivo de las 3 cepas productoras de antibióticos, se obtuvo el peso en gramos de mezclas antibióticas, a partir de 500 ml de medio ISP2: dando como resultado 0.0218 g para PAG C007, 0.0601 g para PAA C019 y 0.0564 g para PAQ C024.

Se identificó bioquímicamente las 3 cepas productoras de antibióticos con el kit de identificación Microgen™ GnA+B-ID System, determinando la probabilidad de que la cepa PAA C019 corresponda a la especie *Xanthomona maltophilia*, en un 100% y las cepas PAG C007 y PAQ C024, correspondan a la especie *Burkholderia cepacia*, en un 86.79% y 99.51 % respectivamente.

En una concentración del 100%, del antibiótico extraído con diclorometano y reconstituido con metanol, la cepa PAG C007 produjo un halo de inhibición de 91.12 mm², PAA C019 produjo un halo 44.12 mm² y PAQ C024 un halo de 18.49 mm². Estimando que la cepa PAG C007 produce una sustancia antibiótica con mayor inhibición frente a *Bacillus spizizenii*, a 30 ° C y pH 7±0.2.

Recomendaciones

Continuar la investigación, sobre la producción antibiótica de las cepas PAG C008, PAQ C023 y PAQ C027, dentro de un medio diferente al Yeast extract - malt extract broth (ISP2), como por ejemplo Krasilnikov's synthetic broth (KSB), Nutrient broth (NB), Starch casein broth (SCB), Tryptone yeast extract broth (ISP1) e Inorganic salt starch broth (ISP4).

Se sugiere realizar el escalamiento del proceso en las cepas PAG C007, PAA C019 y PAQ C024, con volúmenes mayores del medio, dentro de un biorreactor, para obtener mayor cantidad de mezclas antibióticas.

Confirmar el género y la especie a la cual pertenecen las cepas productoras de antibióticos, mediante otras pruebas de caracterización genética como: como el análisis el PCR.

Realizar el proceso de extracción, utilizando otros tipos de solventes orgánicos como: n-butanol, dicloro - heptano, acetato de etilo, hexano, cloroformo, entre otros, por la dificultad local de obtener grandes volúmenes de solventes controlados por el ente regulatorio.

Es necesario purificar el antibiótico extraído, mediante cromatografía en columna, que permite aislar los compuestos deseados de mezcla y cromatografía líquida (HPLC), para obtener los antibióticos puros y poder realizar la determinación estructural mediante RMN u otras técnicas.

Los resultados de los espectros son la base para realizar análisis químicos posteriores respecto a la estructura del antibiótico, pero se debería repetir el proceso con el antibiótico purificado para evitar que los restos de medio u otros metabolitos interfieran.

Referencias

- Acumedia. (2011). Muller Hinton Agar (7101). *Neogen Corporation*, 1.
- Anaya, A. (2003). *Ecología Química*. Mexico: Plaza y Valores.
- Anaya, A. L., Espinosa, F., & Cruz, R. (2001). *Relaciones químicas entre organismos: aspectos básicos y perspectivas de su aplicación*. Mexico : Plaza y Valdes S.A.
- Arias, E., & Lastra, J. (2009). *Cinética del crecimiento*. Argentina : El Cid Editor | apuntes.
- Baran, E., & Etcheverry, S. (1983). El Espectro Infrarrojo de la Bleomicina. *Acta Fann. Bonaerense*, 95.
- Becton, D., & Company. (2005, 02). McFarland Turbidity Standard N°5. *Patrón de Turbidez BBL preparado*. España.
- Boubetraa, D., Sabaoua, N., Zitounia, A., Bijani, C., Lebrihid, A., & Mathieue, F. (2013). Taxonomy and chemical characterization of new antibiotics produced by *Saccharothrix SA198* isolated from a Saharan soil. *Microbiological Research*, 224.
- Cabrera, C., Gomez, R., & Zúñiga, A. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Medica*, 149-158.
- Cadeño, V. (2004). Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. *CIP*, 20-21.

- Camacho, A., Giles, M., Ortegón, A., Palao, M., Serrano, B., & Velázquez, O. (2009). Cuenta en placa de bacterias. *Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos*, 1-2.
- Camacho, V. J. (2001). Los antimicrobianos en la práctica médica. 6-7.
- Carlone, N. (2014). *Microbiología Farmacéutica*. Napoli: Edises.
- Cercenado, E. (2006). *Stenotrophomonas maltophilia*: Un Patógeno Nosocomial Emergente. *CEIMC*, 1-2.
- Chaparro, A. (2010). Aislamiento e identificación de Metabolitos Producidos por la cepa nativa SPG321 DE *Mucor circinelloides* y la evaluación de su actividad antimicrobiana. *Tesis inedita de Magister en Microbiología*, 15-16.
- De baets, S., Vandedrinck, S., & Vandamme, E. (2000). *Vitamins and related biofactors*. London: Academic.
- Evans, E. G., Heritage, J., & Killington, R. A. (1999). *Microbiology in Action*. Port Chesterr, NY, USA: Cambridge University Press.
- Febina, S., Rachel, D., & Shenbagarathai, R. (2014). Optimization of antibiotic production by marine actinomycetes streptomyces sp. KOD10. *Academi Science*, 3.
- Florez, A. (2007). Perfiles de susceptibilidad/resistencia a antibióticos en bacterias del ácido láctico y bifidobacterias. Caracterización molecular de genes de resistencia. *CSIC*, 3.

- García, R., & Gamboa, M. (2006). Microorganismos acuáticos: una farmacia por visitar. *Red Ciencia Ergo Sum*, 186-189.
- Gutiérrez, C. A., Reyes, E., & Corona, F. (2007). *Stenotrophomona maltophilia*, una bacteria multirresistente. *Asociación Mexicana de Medicina Critica y Terapia Intensiva*, 91-92.
- Hernández, A., Alfaro, I., & Arrieta, R. (2003). *Microbiología Industrial*. Costa Rica : EUNED.
- Herver, C., Giles, I., & Akhtad, M. (1983). The sequence of an antibiotic resistance gene from an antibiotic producing bacterium . *Elsevier Science Publishers B.V.*, 67.
- Hogg, S. (2013). *Essential Microbiology* (2nd Edition ed.). Somerset, NJ, USA: John Wiley & Sons.
- Jaramillo, O. (2007). Estados de la Materia; Líquidos. *Notas Fisico-Químicas*, 6.
- Juliet, C., & Fernández, A. (2006). *Stenotrophomonas Maltophilia*. *Scielo*, 247.
- Kapoor, K. (2010). *Illustrated Dictionary of Microbiology*. Jaipur, India: Oxford Book Company.
- Kim, S.-K. (2013). *Marine Microbiology: Bioactive Compounds and Biotechnological Applications*. Somerset, NJ, USA: John Wiley & Sons.
- Koneman, E., & Allen, S. (2008). *Koneman. Diagnóstico Microbiológico*. Argentina: Editorial Medica Panamericana.

- Lancini, G., Parenti, F., & Gallo, G. G. (1995). *Antibiotics: A Multidisciplinary Approach*. New York: Plenum Press.
- Leo, Q. (2009). Concepto y expresión matemática del crecimiento bacteriano. *Microbiología Clínica*, 23.
- Leveau, J. Y., & Bouix, M. (2010). *Microbiología Industrial*. Zaragoza: ACRIBIA, S.A.
- Lima, R., Reis, I., Kassawara, M., Kassawara, M., Azevedo, J., & Araújo, J. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Elsevier*, 466–471.
- Logan, N. A. (2009). *Bacterial Systematics*. Hoboken, NJ, USA: Wiley-Blackwell.
- Marinelli, F., & Molinari, F. (2006). *Las fermentaciones en la producción de metabolitos secundarios de interés farmacéutico*. Italia.
- Mendoza Zepeda, R. (2010). *Antimicrobianos 2002*. México: Instituto Politécnico Nacional.
- Messaoudi, O., Bendahou, M., Benamar, I., & Abdelwouhid, D.-E. (2015). Identification and preliminary characterization of non-polyene antibiotics secreted by new strain isolated from sebka of Kenadsa, Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 438-455.
- Montaño, N., Sandoval, A., Camargo, S., & Sánchez, J. (2010). Los microorganismos: pequeños gigantes. *Elementos* 77, 15-23.
- Navarra, U. (2009). Control de microorganismos. In W. J. SPICER, *Microbiología clínica y enfermedades infecciosas*. (2ª ed.) (pp. 1-3). España: Elsevier.

- Nielsen, M. N., & Winding, A. (2002). *Microorganisms as indicators of soil health*. Denmark: National Environmental Research Institute.
- Nogales, B. (Mayo de 2005). La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. *Ecosistemas 14*, 41-42.
- Nunan, N., Wu, K., Young, I. M., Crawford, J. W., & Ritz, K. (2002). Spatial distribution of bacterial communities and their relationships with the micro-architecture of soil. *FEMS Microbiology Ecology 44*, 203-2015.
- Pardo, R., & Fernández, A. (2010). Magnitud e impacto de la resistencia a los antibióticos en Latinoamérica. En P. R. Pardo, & A. Fernández-Cruz, *Magnitud e impacto de la resistencia a los antibióticos en Latinoamérica* (págs. 145-152). Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Parés I Farràs, R., & Juárez Giménez, A. (2012). Metabolismo Secundario. En P. Ramon, & A. Juárez Giménez, *Bioquímica de los microorganismos* (págs. 323-350). Reverte.
- Parra, E., Centeno, S., & Araque, Y. (2009). Actividad antifúngica de Burkholderia cepacia aislada de maíz amarillo (Zea mays L.) bajo diferentes condiciones de cultivo. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 1-2.
- Patiño, D. (2006). ¿Por qué las bacterias se hacen resistentes a la acción de los antibióticos? *Umbral Científico*, 5-11.
- Pirez, M. C., & Mota, M. (2010). Morfología y estructura bacteriana. In *Temas de bacteriología y virología médica* (p. 23).

- Prabakaran, G. (2010). *Introduction to Soil and Agricultural Microbiology*. Mumbai: Himalaya Publishing House.
- Procópio, R., da Silva, I., Martins, M., Azevedo, J., & Araujo, J. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 466–471.
- Puigdomenech, G. L. (2009). *Microbiología: concepto e historia*. Argentina : El Cid Editor | apuntes.
- Pumarola, A. (1999). *Microbiología y parasitología médica*. Barcelona(España): Masson, SA.
- Quintana, A. (2002). Antibióticos. In *Bases Microbiológicas del uso de antimicrobianos* (pp. 2-4). CEFA.
- Ramírez, J. (2009). Antibióticos. En J. Ramírez, *Historia biotecnológica* (págs. 13-20). El Cid Editor | apuntes.
- Ramos, J. A. (2004). Microorganismos del suelo. En F. Bautista, H. Delfin, J. L. Palacio, & M. d. Delgado, *Técnicas de muestreo para manejadores de recursos naturales* (págs. 185-193). México D. F.: Dirección General de Estudios de Posgrado.
- Ruiz, B., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M., . . . Langley, E. (2010). Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. *Critical Reviews in Microbiology*, 146-167.
- Ruiz, J. (2001). El asombroso reino de los hongos. *Avance y Perspectiva* , 275-281.

- Salyers, A., Wilson, B., Whitt, D., & Winkler, M. (2011). Antimicrobial Compounds. En *Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach* (3rd ed., págs. 317-372). Washington, DC, USA : ASM Press.
- Sánchez, L., Sáenz, E., Pancorbo, J., Lanchipa, P., & Robert, Z. (2004). Betalactámicos – Carbapenems–Aminoglucósidos - Macrólidos. In *Antibióticos Sistémicos en Dermatología* (p. 7). Perú.
- Sánchez-Fernández, R., & Sánchez-Ortiz, B. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Scielo*, 132-133.
- Santambrosio, E. O., & Garibaldi, P. (2009). Tinción y observación de microorganismos. 1-2.
- Saravana Kumar, P., Duraipandiyamb, V., & Ignacimuthu, S. (2014). Isolation, screening and partial purification of antimicrobial antibiotics from soil *Streptomyces* sp. SCA 7. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 435-446.
- Segarra, J. (1997). De antibiosis a Antibioticoterapia: Una realidad Farmacoecologica . In LLULL. País Vasco (Vitoria).
- Seija, V., & Vignoli, R. (2006). *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. México: Femur.
- Serrano, J. A., Uzcátegui, M. d., & Panizo, M. M. (2013). Condiciones de cultivo que fomentan la producción de sustancias antimicrobianas en actinomicetos

- patógenos y del suelo. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 134-139.
- Serrano, J. L. (2004). Espectroscopía infrarroja A 1-Equipos y preparación de muestras. *Instrumentación y métodos de análisis químico*. UPCT.
- Sharon, F., Rachel, D., & Shenbagarathai, R. (2014). Optimization of antibiotic production by marine Actinomycetes *Streptomyces* sp. KOD10. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 506-510.
- Singh, U. S., & Kapoor, K. (2010). *Microbial Biotechnology*. Jaipur, India: Oxford Book Company.
- Thieman, W., & Palladino, M. (2010). *Introducción a la biotecnología*. Madrid: Pearson Educación S.A.
- Ugur, A., & Ceylan, O. (2010). Isolation and screening of novel antibiotic producing *Streptomyces* from southwest Turkey soils. En A. Mendez-Vilas, *Science and Technology Against Microbial Pathogens: Research, Development and Evaluation* (págs. 406-410). Singapore, SGP : World Scientific Publishing Co. .
- Universidad Autónoma de Madrid. (2010). Tetraciclinas, Cloranfenicol y Antibióticos Polipeptídicos. *Departamento de farmacología y Terapéutica Facultad de medicina*. Madrid.
- Varela, G. (2008). *Fisiología y metabolismo bacteriano*. CEFA.
- Vázquez, J. I., Santana, M. L., & Serrano, J. S. (2002). *Farmacología práctica: para las diplomaturas en ciencias de la salud*. Madrid: Ediciones Diaz de Santos, S.A.

Wassenaar, T. (2011). *Bacteria: The Benign, the Bad, and the Beautiful*. New Jersey: John Wiley & Sons.

Wu, C., Kim, H. K., van Weze, G. P., & Choi, Y. H. (2015). Metabolomics in the natural products field – a gateway to novel antibiotics. *Drug Discovery Today: Technologies*, 11–17.

Zotchev, S. B. (2012). Antibiotics. En N. Civjan, *Natural Products in Chemical Biology* (págs. 269-271). Somerset, NJ, USA: John Wiley & Sons.