

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE MEDICINA

Escuela de Tecnología Médica



TESIS PROFESIONAL

***Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención en
Bioanálisis Clínico Molecular, Hematología y Medicina Transfusional***

*“Determinación de capacidad inhibitoria de los sobrenadantes de Desemzia incerta
I2 contra patógenos bacterianos”*

Alumno: Juan José Saavedra Acevedo

Tutor: Victor Antonio García Angulo

Victor A. García A.

Firma tutor

Juan J. Saavedra

Firma alumno

Fecha: 15/07/2022

ACTA CURSO TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

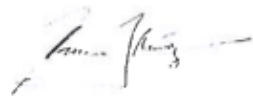
El **Sr. Juan José Saavedra Acevedo**, estudiante de Tecnología Médica con Mención en Bioanálisis Clínico Molecular, Hematología y Medicina Transfusional, cumpliendo con los requisitos establecidos en el plan de estudio, realizó durante el noveno semestre de la carrera, la Tesis Profesional titulada: **“Determinación de capacidad inhibitoria de los sobrenadantes de *Desemzia incerta* 12 contra patógenos bacterianos”**, dirigida por el **Prof. Víctor Antonio García**, académico del Programa de Microbiología y Micología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

La Escuela de Tecnología Médica designó para su corrección una Comisión integrada por: **Prof. Germán Hermosilla**, académico del Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y el **Prof. Juan Carlos Salazar**, académico del programa de Microbiología y Micología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

La calificación obtenida se detalla a continuación:

Corrector 1 Germán Hermosilla	6.56	25%
Corrector 2 Juan Carlos Salazar	5.50	25%
Tutor(es) Guía:		
Evaluación intermedia	6.60	25%
Nota final tutor	7.00	25%
Nota final tesis profesional	6.42	

En consecuencia el estudiante **Juan José Saavedra Acevedo**, aprueba satisfactoriamente la asignatura.



Prof. Rosana Muñoz Videla
Coordinador(a) curso
Trabajo de Investigación



Prof. Hernán Torres
P&C curso
Trabajo de Investigación

ÍNDICE

1. ÍNDICE	3
2. RESUMEN	5
3. INTRODUCCIÓN	6
3.1 Resistencia a los antibióticos	6
3.2 Identificación de bacterias con potencial inhibitorio en el Río Mapocho	7
3.3 Conocimiento actual sobre <i>Desemzia incerta</i>	8
3.4 Potencial de biosíntesis de metabolitos especializados en <i>Desemzia incerta I2</i>	9
4. HIPÓTESIS	13
5. OBJETIVO GENERAL	13
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
7. MATERIALES Y MÉTODOS	14
7.1 Obtención y purificación de los sobrenadantes de <i>D. incerta I2</i>	14
7.2 Experimentos de inhibición	15
7.2.1 Obtención del inóculo del patógeno	15
7.2.2 Experimento de inhibición evaluado en medio líquido	16
7.2.3 Ensayo de inhibición en medio sólido mediante diluciones seriadas	17
7.3 Determinación de la naturaleza y características de las moléculas inhibitorias del sobrenadante	18
7.3.1. Efecto de la temperatura sobre la acción inhibitoria del sobrenadante de <i>I2</i>	19
7.3.2 Ensayos de inhibición con evaluación del efecto de Proteinasa K en el sobrenadante de <i>I2</i>	20
7.3.3. Ensayo de inhibición en medio líquido, evaluación del efecto de la	21

filtración en el sobrenadante de <i>I2</i>	
7.4 Análisis estadístico	23
8. RESULTADOS	24
8.1. Evaluación de las condiciones de cultivo en la capacidad antimicrobiana del sobrenadante de <i>Desemzia incerta I2</i> .	24
8.2. Determinación de la viabilidad bacteriana mediante ensayo de dilución seriada en medio sólido	26
8.3. Caracterización del sobrenadante de <i>Desemzia incerta I2</i>	28
8.3.1. Efecto del tratamiento con calor en el sobrenadante de <i>I2</i>	28
8.3.2. Efecto del tratamiento con Proteinasa K sobre el efecto inhibitorio del sobrenadante de <i>I2</i>	29
8.3.3 Efecto de la filtración en el potencial inhibitorio del sobrenadante	31
9. DISCUSIÓN	34
10. CONCLUSIÓN	39
11. REFERENCIAS	40
12. ANEXOS	45

2. RESUMEN

Según la OMS una de las amenazas más importantes que enfrenta la salud pública en la actualidad es la resistencia a los antibióticos. Este problema solo ha empeorado en los últimos 70 años, por lo que investigadores a nivel mundial han redoblado esfuerzos para mejorar y encontrar nuevos antibióticos que puedan controlar a las bacterias multirresistentes.

Considerando esto, un grupo de investigadores de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile aislaron un par de bacterias del Río Mapocho con potencial de producir moléculas antimicrobianas. Una de estas bacterias, la cual fue denominada *Desemzia incerta I2*, tras estudios genómicos, es el objeto de estudio de esta investigación.

El objetivo de este estudio fue caracterizar de forma inicial el potencial inhibitorio del sobrenadante de un cultivo de *D. incerta I2*. Para ello, se determinaron las condiciones de cultivo que mejoran el efecto antimicrobiano del sobrenadante, utilizando como cepas indicadoras a los patógenos *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, en ensayos de inhibición del crecimiento en medio líquido. Por otra parte, se realizaron diferentes tratamientos del sobrenadante con el fin de obtener información preliminar respecto de la naturaleza química de la o las moléculas antimicrobianas presentes.

El análisis de los ensayos de inhibición del crecimiento mostró que el sobrenadante de *I2* reduce el crecimiento de los patógenos indicadores. Las condiciones de cultivo que mejoraron el efecto inhibitorio del sobrenadante fueron el cultivo con agitación e incubación de 24 horas. Con respecto a la naturaleza de la o las moléculas del sobrenadante, los ensayos de filtración sugieren que éstas tienen un tamaño menor a 10 KDa. Además, el tratamiento térmico moderado conservó el efecto inhibitorio del sobrenadante, mientras el tratamiento a 121°C por 15 minutos eliminó al completo esta capacidad. Lo anterior, junto con el hecho que el tratamiento con proteinasa K no afectó la capacidad para inhibir el crecimiento, sugiere la naturaleza no proteica detrás de la inhibición.

PALABRAS CLAVES: Antibiótico, Resistencia a antibióticos, Bacterias multirresistentes, Clusters de genes biosintéticos (CGB), *Desemzia incerta*, Metabolitos especializados, Potencial antimicrobiano.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Resistencia a los antibióticos

Con el descubrimiento y desarrollo de los antibióticos en la primera mitad del siglo XX, también han ido apareciendo microorganismos que son capaces de resistir a ellos. Desde el inicio del uso clínico de los primeros antibióticos se descubrieron bacterias que desarrollaron resistencia, como cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a las penicilinas en la década del 50. Y a pesar de que se han encontrado y desarrollado antibióticos cada vez más específicos, seguros y potentes, los microorganismos siguen generando o adquiriendo nuevas formas de resistencia. [1, 2]

Las consecuencias de estas bacterias multirresistentes son importantes en el área de la salud pública a nivel mundial e incluyen infecciones más graves con aumento de la mortalidad y costos asociados a salud, que se explica por estadías más largas, uso de medicamentos y terapias más costosas, etc. También es importante el hecho de que intervenciones o cirugías que en la actualidad son seguras puede que no lo sean en el futuro por la mayor probabilidad de adquirir infecciones intrahospitalarias intratables, siendo los pacientes inmunodeprimidos los más afectados. [3, 4]

En la actualidad la resistencia a los antibióticos corresponde a una de las 10 principales amenazas para la salud pública a nivel mundial, según la OMS [3]. Algunas de las mayores amenazas bacterianas son cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM), *Enterococcus sp.* resistentes a vancomicina, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y enterobacteriales resistentes a carbapenemasas, entre otros. [6]. Por esta razón, en 2015 en la Asamblea Mundial de la Salud se generó un plan de acción enfocado en mejorar los conocimientos asociados a resistencia antimicrobiana, reforzar la investigación y vigilancia y optimizar el uso de antibióticos y antimicrobianos en general, además de aumentar la inversión sostenible y los esfuerzos en el desarrollo de nuevos compuestos. [5]

Con el objetivo de encontrar nuevos antibióticos efectivos, a lo largo de la historia los investigadores han recurrido al ambiente que los rodeaba, en la búsqueda de nuevas moléculas inhibitorias contra los patógenos a los que se enfrentaban. Con el desarrollo de la tecnología se fue cambiando el enfoque a la modificación de los antibióticos con los que ya se contaba para obtener así nuevos, que fueran más potentes. Esto logró ser efectivo y tuvo un gran impacto, pero en los últimos años con el aumento exponencial de la resistencia descontrolada, se ha comenzado a mirar nuevamente hacia la naturaleza en lugares como suelos, ríos, lagos, fondos marinos, cuevas, pantanos, al interior de organismos vivos, entre otros, con el propósito de encontrar respuesta frente a los patógenos multirresistentes que afectan a la población mundial en la actualidad. [7]

3.2. Identificación de bacterias con potencial inhibitorio en el Río Mapocho

De manera reciente, en el laboratorio de Metabolismo Bacteriano de la facultad de Medicina de la Universidad de Chile recolectó y estudió muestras de agua desde el Río Mapocho en Santiago, descubriendo que la microbiota del río es capaz de inhibir el crecimiento de la bacteria patógena *Vibrio cholerae*. Desde estas muestras se aislaron 2 bacterias que presentan capacidad inhibitoria, las cuales fueron denominadas como *I1* e *I2*. Al hacer mediante co-cultivo en placa nuevos estudios, se observó que *I1* e *I2* además pueden inhibir a otros patógenos que incluyen a SARM, *K. pneumoniae*, *Escherichia coli* enterotoxigénica y *P. aeruginosa* (Fig 1). [8]

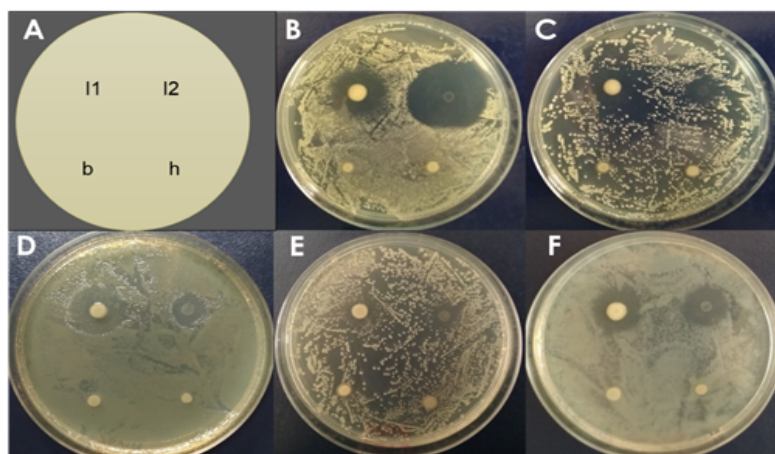


Figura 1: Ensayos de inhibición realizados con bacterias aisladas I1 e I2, contra bacterias patógenas. A:

Esquema de la posición en la placa de los microorganismos a evaluar. En la parte superior se encuentran las bacterias I1 e I2, en inferior b y h, microorganismos sin potencial inhibitorio utilizados como controles obtenidos desde el Río Mapocho. La ubicación se repite en todas las placas. En las placas siguientes se sembró estas bacterias junto con un césped del patógeno a evaluar en el orden siguiente: **B:** *S. aureus* ATCC 43300; **C:** *K. pneumoniae* BAA 1705; **D:** *V. cholerae* N16961; **E:** *E. coli* enterotoxigénica; **F:** *P. aeruginosa* PAO1. En cada placa se inoculó 1 uL de un cultivo de I1, I2, b y h. Las placas se incubaron por 24 horas [8]

Posteriormente se realizó la secuenciación del genoma de estas bacterias inhibidoras y mediante estudios de identificación basados en el genoma se denominó a las bacterias como *Pseudomonas* sp. I1 y *Desemzia incerta* I2. Este estudio se centra en la segunda especie con el fin de determinar el potencial antimicrobiano de su sobrenadante.

3.3. Conocimiento actual sobre *Desemzia incerta*

Desemzia incerta corresponde a una bacteria realmente poco conocida y estudiada a nivel mundial. Fue descubierta por primera vez en 1941 asociada al ovario de la cigarra *Tibicen linnei* (cigarra lyreman) por Steinhaus, quien la denominó inicialmente como *Bacterium incertum* [9]. Posteriormente en la década de los 50 se le incluyó erróneamente en el género de las *Brevibacterium*, tomando el nombre de *Brevibacterium incertum*. Nuevos estudios genéticos y de composición aminoacídica, de ácidos grasos, quinonas isoprenoides y otros en la década de los 90, permitieron determinar que realmente tenía más similitudes con el género *Carnobacterium*, aunque no eran suficientes estas similitudes como para considerarla dentro de este género, por lo que fue clasificada en un nuevo género, *Desemzia*, el cual cuenta con solo una especie, *Desemzia incerta*. [10]

D. incerta es parte del orden Lactobacillales, corresponden a bacilos gram positivos que se presentan sin agrupación aunque también puede ser en pares. Entre otras características *D. incerta* es microaerofílica, mesófila, no forma endosporas, posee metabolismo fermentativo y

produce ácido L-láctico desde glucosa. En pruebas bioquímicas destaca el que es oxidasa y catalasa negativa [10, 11, 12].

Desde su descubrimiento ha sido rara vez aislada. Una vez en la cuenca del lago Eras en el centro de España, se aisló una cepa capaz de producir carbonatos ricos en Mg [13]. También fue detectada en la microbiota del compost residual del cultivo del hongo *Agaricus spp.* [14]. Además fue aislada de un desierto helado en la India en conjunto con un diverso grupo de microorganismos [15] y en un alga marina de la uva [16]. En estos pocos estudios donde ha sido encontrada, no se evaluó la producción de moléculas antimicrobianas, lo que sugiere que tiene un potencial aún desconocido en esta área.

3.4. Potencial de biosíntesis de metabolitos especializados en *Desemzia incerta* 12

Los clusters de genes biosintéticos (CGB) corresponden a conjuntos de genes agrupados y organizados en genomas de bacterias que tienen como función la biosíntesis de metabolitos especializados. Estos metabolitos pueden corresponder a productos naturales con potencial inhibitorio como lo son las bacteriocinas o metabolitos secundarios que incluyen a terpenos, péptidos no ribosomales (NRPs) o policétidos (PK), entre otras clases [17, 18, 19]. Normalmente un CGB está compuesto por uno o más genes *core* (terpeno sintasa, sintasa de péptido no ribosomal, etc) que se encuentra acompañado por genes biosintéticos adicionales con funciones específicas dependiendo de qué molécula codifiquen. También puede haber genes asociados a transporte, protección, regulación, transcripción y otros sin función conocida (Fig. 2). [20]

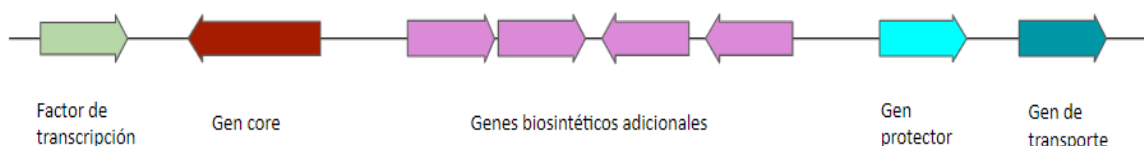


Figura 2: Componentes comunes de un cluster de genes biosintéticos. El gen *core* y los genes adicionales son los componentes mínimos que tienen los BGC, siendo la presencia de los demás variable. Modificado desde Keller N. 2019. [20]

Previo a este estudio, el grupo de investigadores que aisló a *D. incerta* en el Río Mapocho, realizó estudios genéticos con el uso de programas de minería genómica, con el propósito de obtener información respecto al potencial biosintético de metabolitos especializados y probables inhibidores producidos por esta bacteria. Se utilizó el programa BAGEL 4 para realizar un tamizaje en la búsqueda de genes para bacteriocinas, las cuales son moléculas peptídicas de origen ribosomal con capacidad antimicrobiana [21]. Esto debido a la relación filogenética de *D. incerta* con *Carnobacterium*, género del cual se sabe que cuenta con un abundante y variado espectro de bacteriocinas [22]. Sin embargo, no se encontró ningún gen similar a los de las bacteriocinas de las bases de datos, lo que indica que ninguna de las bacteriocinas codificadas por el género *Carnobacterium* se encuentra presente en *D. incerta* 12. Posteriormente, un análisis de minería genómica realizado por antiSMASH detectó la presencia de 2 CGB que codifican para la producción de terpenos (Fig. 3) y también un CGB para un policétido (Fig. 4). [8]

Los terpenos corresponden a un grupo grande y diverso de compuestos naturales derivados del ácido mevalónico y están compuestos por unidades de isopreno. Los terpenos son producidos principalmente en plantas, pero también se encuentran presentes en bacterias y otros microorganismos. Tienen varios efectos por lo que se utilizan como antitumorales, como materias primas de saborizantes o cosméticos, como pesticidas y también pueden poseer efectos antimicrobianos [23, 24].

Ambos clusters para terpenos identificados en *D. incerta* 12 cuentan con una Terpeno sintasa (TS) como gen *core*, pero el conjunto de genes biosintéticos adicionales es diferente en ambos clusters, lo que indica que producen derivados sesquiterpénicos diferentes entre sí (Fig. 3). Las terpenos sintasas de ambos clusters comparten identidad en un 29 % y un 44% con escualeno sintasa de otros microorganismos (*Phoma* sp. MF5453 y *Halobacillus halophilus* DSM 2266, respectivamente), lo que corresponde a un bajo porcentaje de identidad con sus homólogos más cercanos, lo que sumado al poco parecido de sus genes biosintéticos adicionales, podría reafirmar

el que los derivados sesquiterpénicos producidos por *D. incerta* son nuevos o muy diferentes a los ya conocidos. [8]

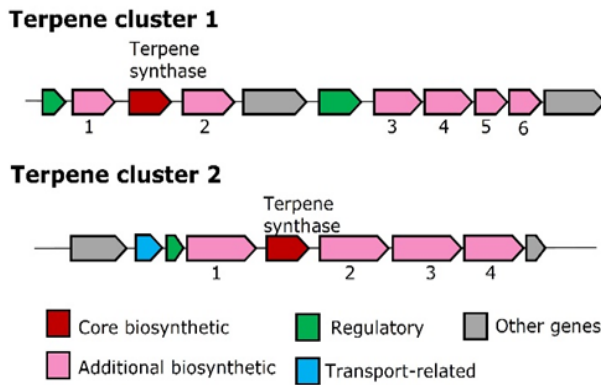


Figura 3: Clusters relacionados con la síntesis de terpenos encontrados en *D. incerta I2* con antiSMASH. Ambos tienen un gen *core* terpeno sintasa y genes biosintéticos adicionales y complementarios divididos en distintos colores según su categoría funcional. Funciones específicas: Terpeno 1: aldo-ceto

reductasa (1) acil-CoA deshidrogenasa (2, 4), acetil-CoA acetiltransferasa (3), 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa, enoil-CoA hidratasa (6). Terpeno 2: fitoeno desaturasa (1,2), aldehído deshidrogenasa (3), glicosil transferasa (4).

Los Policétidos son un grupo amplio de productos naturales producidos principalmente por bacterias, hongos y plantas. Son sintetizados por la acción de policétido sintasa (PKS). Se conoce que algunos policétidos tienen acciones antibacterianas o antimicóticas, además de otros efectos como la regulación de colesterol (lovastatina) o antiparasitario, lo que los convierte en metabolitos muy útiles en la medicina actual. [25]

El cluster de policétido presente en *D. incerta I2* cuenta con una PKS de tipo III (T3PKS), la cual tiene un 44% de identidad con EpaG, una T3PKS de *Kitasatospora sp. HKI 714* (Fig. 4). Fuera de ese porcentaje de identidad, los genes biosintéticos adicionales son diferentes respecto a cualquier otro cluster de policétido caracterizado, lo que indica que el cluster presente en *D. incerta I2* es nuevo y exclusivo de esta especie, por lo que produciría un policétido no conocido aún. [8]

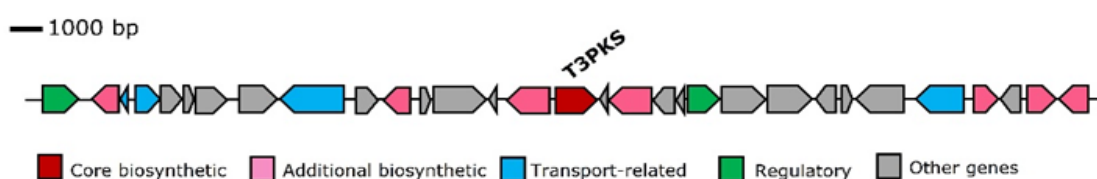


Figura 4: Cluster biosintético del policétido detectado en *D. incerta I2* por antiSMASH. Cuenta con una policétido sintasa de tipo III como gen *core* además de otros genes separados por color según grupo funcional.

El análisis hecho con la minería genómica indica que *I2* puede producir metabolitos secundarios nuevos, considerando que sus CGB tienen baja similitud con los ya caracterizados en las bases de datos. Este descubrimiento del potencial inhibitorio de *D. incerta I2* podría corresponder a un hallazgo importante. En bases de datos la información de esta bacteria es escasa, por lo que el potencial es aún inexplorado. Los ensayos de inhibición en placa sugieren que este aislado libera moléculas inhibitoras activas contra varias bacterias patógenas tanto gram positivas como gram negativas, sin embargo no se conoce más información sobre esta capacidad de inhibición. Los resultados de la minería genómica, sugieren que *I2* tiene la capacidad de producir metabolitos secundarios nuevos. Al mismo tiempo se observó que no presenta bacteriocinas similares a las del género *Carnobacterium*. Toda esta información es novedosa pero solo corresponde a los primeros datos obtenidos. Además, no se puede descartar que hayan otros clusters para moléculas inhibitoras que no fueron detectados en los análisis, como no se puede descartar el que *I2* posea bacteriocinas que son exclusivas para esta especie y desconocidas aún. Por esta razón es importante realizar más estudios para caracterizar la actividad inhibitoria de *D. incerta I2*.

Este estudio busca entregar los primeros datos y características experimentales sobre la capacidad antimicrobiana de los sobrenadantes producidos por *D. incerta I2*. Como el determinar en qué condiciones de cultivo de la bacteria esta expresa las moléculas con acción antimicrobiana en mayor cantidad o con mayor acción contra las bacterias a analizar. También se busca generar datos respecto de la naturaleza de estos metabolitos, que podrían corresponder a los encontrados en la minería genómica o no. El conocer de su naturaleza o características, podría facilitar los esfuerzos posteriores para encontrar la molécula específica o el conjunto de ellas, que tiene el efecto antibiótico, de forma más dirigida.

4. HIPÓTESIS

“El sobrenadante de *Desemzia incerta* I2 posee moléculas con capacidad antimicrobiana de amplio espectro.”

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia y características de las moléculas antimicrobianas presentes en el sobrenadante de *Desemzia incerta* I2.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- **Objetivo específico 1:**

Evaluar la capacidad antimicrobiana de sobrenadantes de *Desemzia incerta* I2 sobre *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* y determinar el efecto de las condiciones de crecimiento en dicha capacidad.

- **Objetivo específico 2:**

Determinar las características generales de los compuestos inhibidores presentes en el sobrenadante de *Desemzia incerta* I2.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Con el fin de lograr los objetivos propuestos y comprobar la hipótesis, se realizaron las siguientes actividades en el laboratorio.

7.1. Obtención y purificación de los sobrenadantes de *D. incerta I2*

El sobrenadante de *D. incerta I2* se obtuvo de cultivos en medio líquido. Durante el crecimiento de la bacteria, esta libera componentes al medio, donde se espera encontrar las moléculas antimicrobianas de amplio espectro que explicarían el efecto antimicrobiano de *I2* visto en los ensayos de inhibición en placa.

Para la obtención del sobrenadante, primeramente fue necesario sembrar en estrías la bacteria en placas de medio agar LB y se dejó crecer toda la noche en incubación a 30°C. Posteriormente se tomó mediante el uso de un asa, colonias de *I2* con las que se inocularon de 6 a 7 mL de medio líquido LB agregados previamente en un tubo falcon estéril de 15 mL. Este cultivo líquido se dejó crecer toda la noche hasta alcanzar la fase estacionaria. Se tomó 1 mL de este cultivo de *D. incerta*, se agregó en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se centrifugó a 12000 RPM en una centrífuga de mesa por 2 minutos, se eliminó el sobrenadante y se volvió a resuspender el pellet en LB fresco, ajustando la densidad óptica a 600 nm a 1,0. Se tomaron 100 uL de esta suspensión y se utilizaron para inocular 25 ml de LB fresco en tubos falcon de 50 mL. Éstos tubos fueron incubados en diferentes condiciones, con el propósito de determinar en cuál de las condiciones de crecimiento de la bacteria, se obtenían el sobrenadante con los mejores efectos inhibitorios contras las bacterias patógenas, contra las cuales se evaluaría su acción posteriormente.

Las condiciones de incubación evaluadas fueron 4, todas incluyeron una temperatura constante de 30°C y se varió el tiempo de incubación y la presencia o no de agitación. Las 4 condiciones consistieron en:

- Cultivo con agitación y 7 horas de incubación.
- Cultivo con agitación y 24 horas de incubación
- Cultivo sin agitación y 7 horas de incubación.
- Cultivo sin agitación y 24 horas de incubación.

Cumplidos los tiempos de incubación los tubos fueron centrifugados por 10 minutos a 6000 RPM, se descartó el pellet y el sobrenadante fue filtrado con membranas de 22 µm con el fin de eliminar las bacterias remanentes que podrían interferir en el análisis.

7.2. Experimentos de inhibición:

7.2.1. Obtención del inóculo del patógeno

Para la realización de los ensayos o experimentos de inhibición se necesitó de 2 bacterias patógenas que correspondieron a los indicadores del potencial antimicrobiano del sobrenadante. Las bacterias patógenas que se utilizaron son *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina ATCC 25923, la cual corresponde a una bacteria gram positiva, y *Pseudomonas aeruginosa* PA01, la cual es una bacteria gram negativa.

Para la obtención del inóculo a utilizar de las bacterias patógenas, se sembraron estas el día previo en placas de agar LB. De estos cultivos se tomaron colonias, se agregaron a LB fresco y se ajustaron a una D.O. 600 nm igual a 0,2. Esta suspensión bacteriana se diluyó 1:100 para obtener el inóculo a utilizar.

7.2.2. Experimento de inhibición evaluado en medio líquido

Con el fin de determinar el potencial inhibitorio de los sobrenadantes obtenidos en la primera sección de métodos, se realizaron experimentos de inhibición en medio líquido. Este experimento permitió determinar el sobrenadante con mejor efecto antimicrobiano.

Para este experimento se utilizaron ambos patógenos, *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Como control negativo de inhibición se utilizó el sobrenadante de la bacteria *h*, un aislado de río sin potencial inhibitorio según ensayos de inhibición en placa. Las condiciones de incubación para obtener el sobrenadante de *h* correspondieron a 30°C + agitación y 24 horas de incubación.

Se utilizaron 6 tubos Falcon de 15 mL para cada bacteria. En cada tubo se evaluó cada 1 de los sobrenadantes (5, siendo 4 de *I2* y uno de *h*), además de un tubo que contenía solo LB para ver el crecimiento normal de la bacteria sin presencia de un posible inhibidor. En estos tubos se agregó 4 mL de sobrenadante, más 4 mL de LB esteril y 50 uL de un inóculo de cada patógeno, estandarizado a 0.2 de densidad óptica y diluido 1:100. En el tubo control sin sobrenadante, se agregaron 8 de LB estéril más los mismos 50 uL de la bacteria patógena (Fig. 5).

También se prepararon 5 tubos controles, uno para cada sobrenadante. A los que se les agregó 100 uL de sobrenadante a un volumen de 5 mL de LB estéril, los que se incubaron en paralelo al experimento para corroborar la esterilidad de los sobrenadantes obtenidos.

Por último se incluyó un tubo al que solo se le agregó 5 mL de LB que se utilizó como control de esterilidad del medio de crecimiento. Los 18 tubos totales fueron incubados a 37°C con agitación.

Para evaluar el crecimiento en los tubos se realizaron 4 mediciones. A las 3, 6 y 8 horas se midió la densidad óptica a 600nm de los 12 tubos de estudio. Mientras que la última medición se realizó a las 24 horas, esta vez para los 18 tubos. Los tubos controles de esterilidad se utilizaron como referencia de utilidad del experimento y sus datos de densidad óptica no se muestran en los resultados.

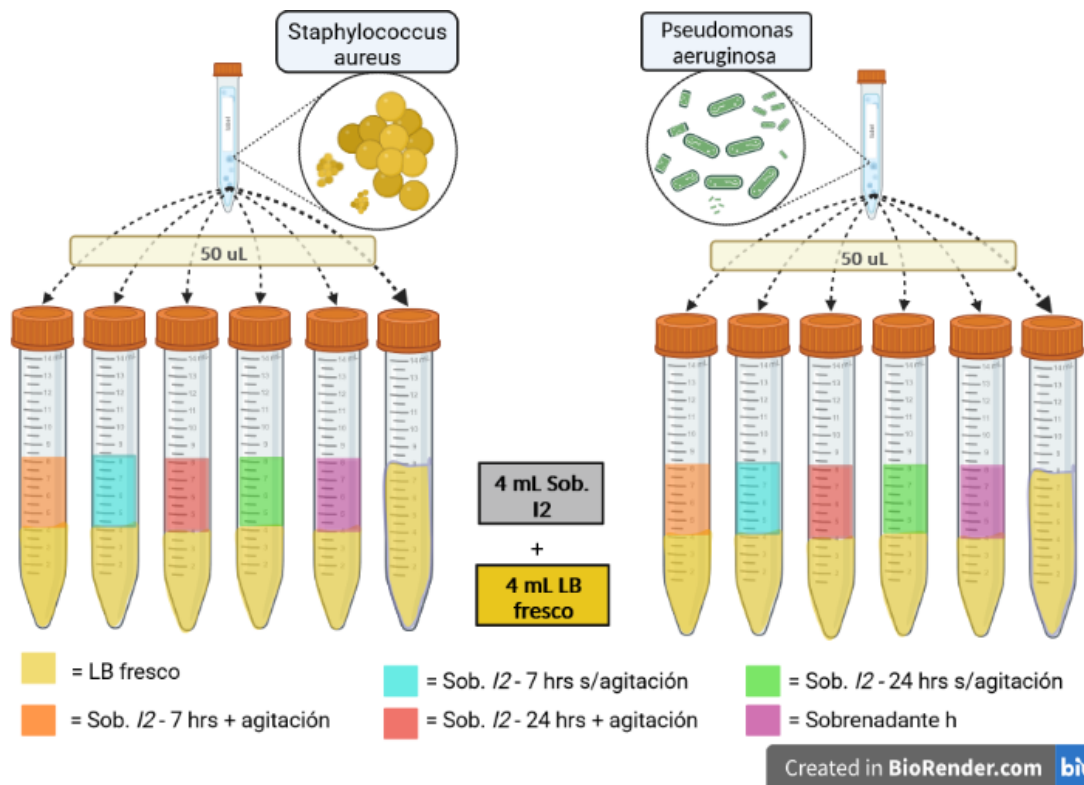


Figura 5: Tubos y sus contenidos utilizados en el experimento de inhibición de crecimiento. Los tubos controles para esterilidad no son ejemplificados.

Con los resultados de las curvas de inhibición, fue posible determinar cuál sobrenadante de las 4 condiciones de cultivo evaluadas, tiene el mayor potencial inhibitorio. Este fue escogido y utilizado para realizar los experimentos posteriores.

7.2.3. Ensayo de inhibición en medio sólido mediante diluciones seriadas

Con el propósito de evaluar el efecto antimicrobiano del sobrenadante, se realizaron experimentos de viabilidad de los patógenos en presencia del sobrenadante. Para este experimento se utilizó solo el sobrenadante con el mejor efecto inhibitorio y los patógenos *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Se procedió a montar el mismo experimento del paso anterior, con 4 mL del sobrenadante, 4 mL de LB fresco y 50 µL del inóculo del patógeno estandarizado y diluido, con 1 tubo para cada patógeno. Además, se contó también con los tubos controles de crecimiento que

contenían 8 mL de LB más los 50 uL de los patógenos. Estos tubos fueron dejados en incubación a 37 °C con agitación.

Desde el tubo de control de crecimiento ya inoculado, se tomaron 100 uL que fueron sembrados en una placa de agar LB mediante el uso de asa rastrillo. También se tomaron otros 100 uL que se depositaron en 900 uL de LB para hacer una primera dilución. Desde este tubo se tomaron 100 uL para depositarlos en un nuevo eppendorf con LB y hacer la segunda dilución. Desde ambos tubos se tomaron 100 uL y se sembraron en placas de agar LB con asa rastrillo. Estas placas se utilizaron para determinar el inóculo inicial.

A las 3 y 6 horas minutos desde iniciada la incubación, se tomaron 100 uL de los tubos que contaban con el sobrenadante, los tubos experimentales, los cuales fueron sembrados en placas de agar LB con un asa rastrillo. También se tomaron 100 uL más que fueron depositados en un tubo eppendorf el cual ya contaba con 900 uL de LB fresco para hacer la primera dilución. El tubo fue homogeneizado y se tomaron 100 uL que se depositaron en un nuevo tubo eppendorf con 900 uL de medio LB fresco, esta correspondió a la segunda dilución. De las 2 diluciones se tomaron 100 uL que fueron sembrados en placas de agar LB mediante asa rastrillo. Esto se realizó para ambas bacterias, teniendo en total 3 placas sembradas en dilución seriada para cada cultivo de bacterias por cada tiempo de muestreo. Todas las placas sembradas se dejaron en una incubadora a 37°C. Mientras que los tubos se dejaron en incubación por 24 horas, para corroborar que se mantuviera la inhibición por el sobrenadante. Al finalizar la incubación overnight de las placas se realizó el conteo de colonias para el posterior análisis de viabilidad.

7.3. Determinación de la naturaleza y características de la o las moléculas inhibitorias del sobrenadante

En esta etapa del proyecto se evaluaron 3 características del sobrenadante. En la primera se buscó conocer si el efecto del sobrenadante se veía afectado tras tratar este con calor, lo que indicó la

termoestabilidad de las moléculas presentes. En la segunda característica evaluada se intentó determinar el efecto de un tratamiento con proteinasa K en el sobrenadante, lo que podría decirnos si las moléculas son de naturaleza proteica o no dependiendo del resultado. Por último se determinó el efecto de la filtración del sobrenadante con filtros de 2 tamaños diferentes, 10 y 50 KDa. Esto nos entregó información del tamaño de las moléculas con potencial antimicrobiano en el sobrenadante .

7.3.1. Efecto de la temperatura sobre la acción inhibitoria del sobrenadantes de I2

Se evaluó la termoestabilidad de los probables componentes antimicrobianos del sobrenadante. El sobrenadante utilizado fue el obtenido tras 24 horas de incubación a 30°C más agitación. El sobrenadante obtenido fue separado en 3 partes, 12 mL aproximadamente fueron llevados al autoclave y se les aplicó una temperatura de 121°C por 15 minutos, a otros 12 mL se les aplicó un tratamiento de calor de 95°C por 10 minutos y mientras que la tercera muestra se mantuvo sin ningún tratamiento.

Posteriormente para evaluar si el tratamiento afectó a los componentes del sobrenadante se realizaron curvas de crecimiento, siguiendo la misma metodología expuesta en la sección 2 de métodos. En cada tubo se agregó 4 mL de LB y 4 de los sobrenadantes tratados o sin tratamiento, más 50 uL del inóculo del patógeno (Fig. 6). Se realizó un tubo por sobrenadante por cada patógeno. Estos tubos se dejaron en incubación a 37°C con agitación y se realizaron mediciones de densidad óptica a las 3, 6, 8 y 24 horas. Se incluyeron tubos controles para la esterilidad de cada sobrenadante, donde se tomó 100 uL de cada 1 y se agregaron a 5 mL de LB fresco. De estos no se realizaron mediciones sólo a las 24 horas para comprobar esterilidad y sus datos no se muestran.

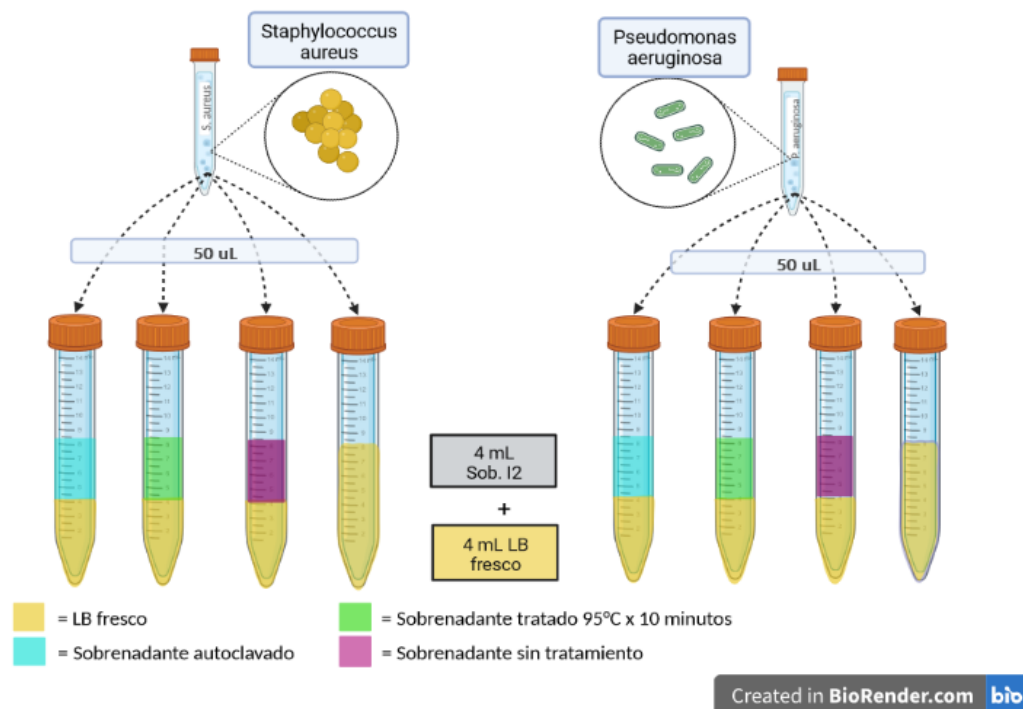


Figura 6: Esquema de los tubos y contenidos utilizados en el experimento de las curvas de inhibición en líquido con sobrenadante tratado con calor. Para cada bacteria se incluyó un tubo con cada sobrenadante y un tubo solo con LB con 8 mL, para evidenciar el crecimiento normal.

7.3.2 Efecto del tratamiento con Proteinasas K sobre la acción inhibitoria del sobrenadante de *I2*

Otra condición estudiada fue el efecto de la proteinasas K sobre la capacidad inhibitoria del sobrenadante.

Considerando que la proteinasas K es una enzima serín proteasa inespecífica y de amplio espectro, se buscó determinar de forma preliminar si el componente antimicrobiano presente en el sobrenadante es de naturaleza proteica. Obtenido el sobrenadante a utilizar en el experimento y siguiendo los mismos pasos explicados previamente, se procedió a separarlo en 3 fracciones. La primera de 9 mL, no tuvo tratamiento alguno, por lo que permitió evaluar el efecto como tal del sobrenadante para posteriormente hacer las comparaciones del efecto. A la segunda fracción de 9 mL fue agregado 18 µL de la proteinasas K concentrada a 1000X, la cual fue activada mediante un

tratamiento con calor a 50°C por 1 hora. La última fracción de 9 mL de sobrenadante fue sometida al mismo tratamiento con calor, aunque sin agregar la proteínasa, para así evaluar el efecto por sí solo de este tratamiento al sobrenadante.

Listos los tratamientos se realizó el experimento de inhibición mediante las curvas de crecimiento en líquido siguiendo el mismo formato explicado en la parte 2 de la metodología. En este caso se utilizaron 3 sobrenadantes, 2 tratados y uno sin tratamiento, además del tubo con solo LB que se utilizó como control de crecimiento. (Fig. 7). En este caso solo se determinó la densidad óptica a las 24 horas de iniciado el experimento.

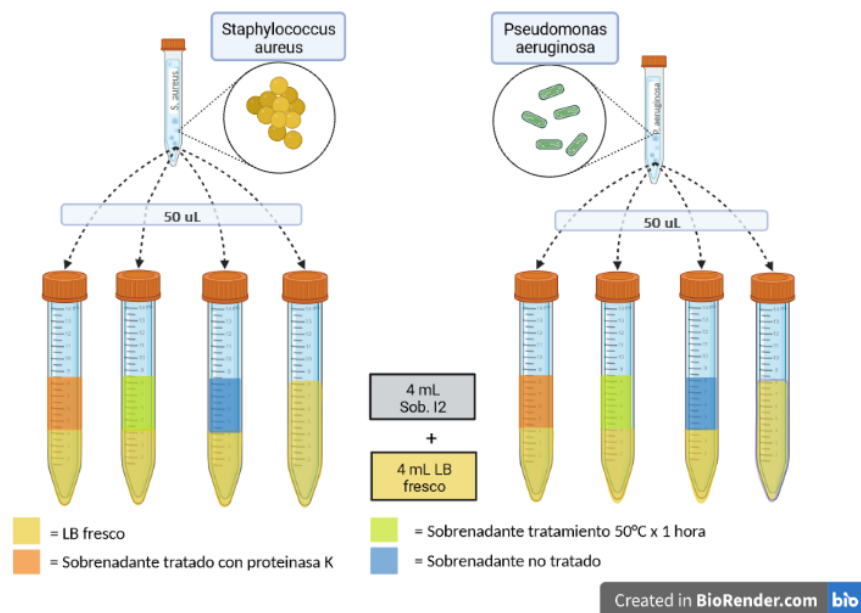


Figura 7: Esquema con los tubos y su contenido, utilizados en el experimento de evaluación del efecto de la proteínasa K en el sobrenadante. Los tubos fueron incubados durante 24 horas, a 37°C con agitación.

7.3.3. Efecto de la filtración sobre la acción inhibitoria del sobrenadante de I2

La condición final evaluada, fue el efecto de la filtración en el potencial inhibitorio del sobrenadante de I2.

El sobrenadante fue obtenido siguiendo los mismos pasos de la sección 1 de la sección de métodos. Se utilizaron filtros Millipore Amicon concentradores de tamaño de poro de 50 KDa y 10 KDa. El sobrenadante fue separado, 10 mL fueron filtrados, generando 2 fracciones. Considerando que la mayoría del volumen atravesó por el filtro, la parte concentrada que no lo atravesó fue recuperada y reconstituida con LB fresco (con aproximadamente 10 mL, para que ambas fracciones quedaran con el mismo volumen final), para de esta forma tener sobrenadante que se encuentre filtrado y uno que cuente con las moléculas que no fueron capaces de atravesar el filtro. También se contó con un volumen del sobrenadante original que no fue filtrado.

Se realizó el mismo experimento de la curva de crecimiento en medio líquido, siguiendo los mismos pasos explicados previamente en la sección 2 de la sección de métodos. En este experimento se midió la densidad óptica pasadas las 24 horas desde iniciada la incubación de los tubos, a 37°C con agitación. Se presenta un esquema con los tubos utilizados y sus respectivos controles. (Fig. 8 y 9)

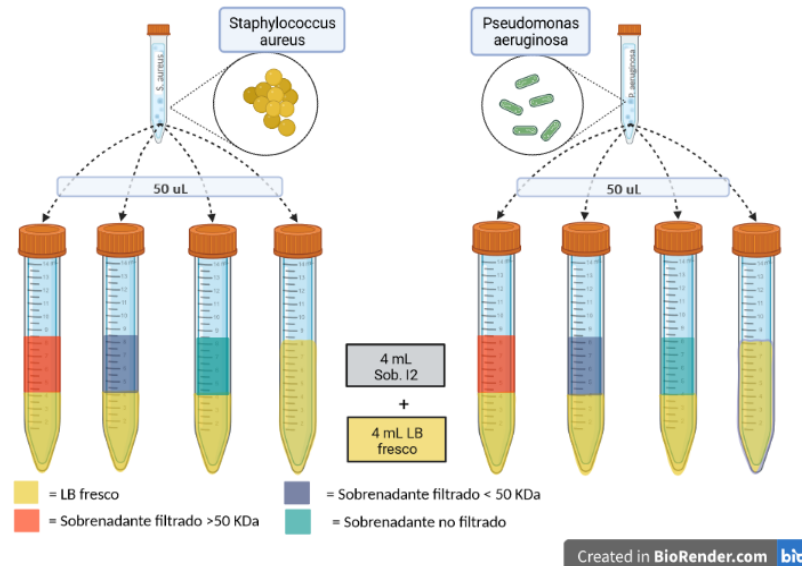


Figura 8: Esquema de los tubos utilizados y su contenido, en el experimento de las curvas de inhibición con evaluación del efecto de la filtración con membrana de poro de 50 KDa.

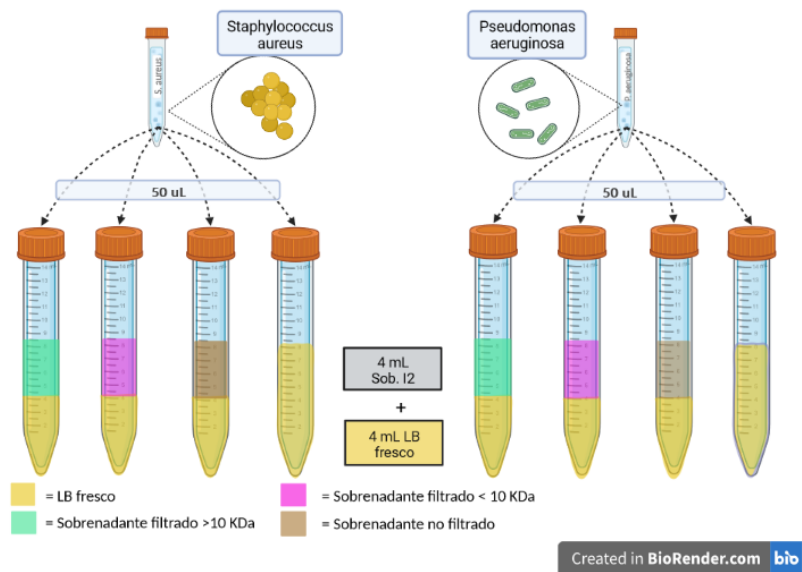


Figura 9: Esquema de los tubos utilizados y su contenido, en los ensayos de inhibición en medio líquido con evaluación del efecto de la filtración con membranas de poro de 10 KDa.

7.4 Análisis estadístico

Fue realizado con la plataforma GraphPad Prism, con estudio de t test. Como valor de significancia se utilizó un $p < 0.05$.

8. RESULTADOS

8.1. Evaluación de las condiciones de cultivo en la capacidad antimicrobiana del sobrenadante de *Desemzia incerta* I2.

Se obtuvo sobrenadante de *D. incerta* I2 cultivada en diferentes condiciones. El objetivo fue evaluar el efecto de las condiciones de crecimiento en la capacidad antimicrobiana del sobrenadante.

De forma previa al inicio de la fase experimental, se sabía que I2 es capaz de crecer en un amplio rango de temperaturas, esto por ser una bacteria ambiental, además de haberse realizado experimentos de crecimiento en diferentes temperaturas entre los 25°C y los 37°C en el laboratorio. Por esta razón se escogió una temperatura dentro de este rango para hacer crecer al microorganismo, para luego obtener su sobrenadante y utilizarlo en los experimentos posteriores. Esta temperatura correspondió a 30°C. Con esta temperatura constante, se evaluaron cuatro condiciones de crecimiento, donde lo que varió correspondió al tiempo de incubación y la aplicación o no de agitación.

La bacteria se inoculó según lo descrito en la metodología. De los tubos se obtuvo el sobrenadante después de 7 y 24 horas de crecimiento con y sin agitación. Además se inoculó siguiendo el mismo proceso un cultivo con el aislado bacteriano *h*, el cual no tiene efecto antimicrobiano y se utilizó como control negativo. Esta bacteria se dejó crecer por 24 horas en agitación para luego obtener su sobrenadante.

Posteriormente. Se determinó el efecto inhibitorio de los sobrenadantes, obtenidos bajo diferentes condiciones de cultivo, sobre el crecimiento de ambos patógenos. Para ello, se inocularon 50 uL de los patógenos *S. aureus* y *P. aeruginosa* obtenidos según lo explicado en la

primera sección de los métodos, en tubos falcon con 4 mL de LB fresco más 4 mL del sobrenadante a evaluar, se cultivó a 37°C con agitación y se determinó la densidad óptica de los cultivos a diferentes tiempos. Se determinó así, si el sobrenadante tiene efecto antimicrobiano y en qué condición se observan los mejores resultados, además de evaluar si el efecto inhibitorio es de amplio espectro de antimicrobiano o no. Los resultados son presentados en la figura 10.

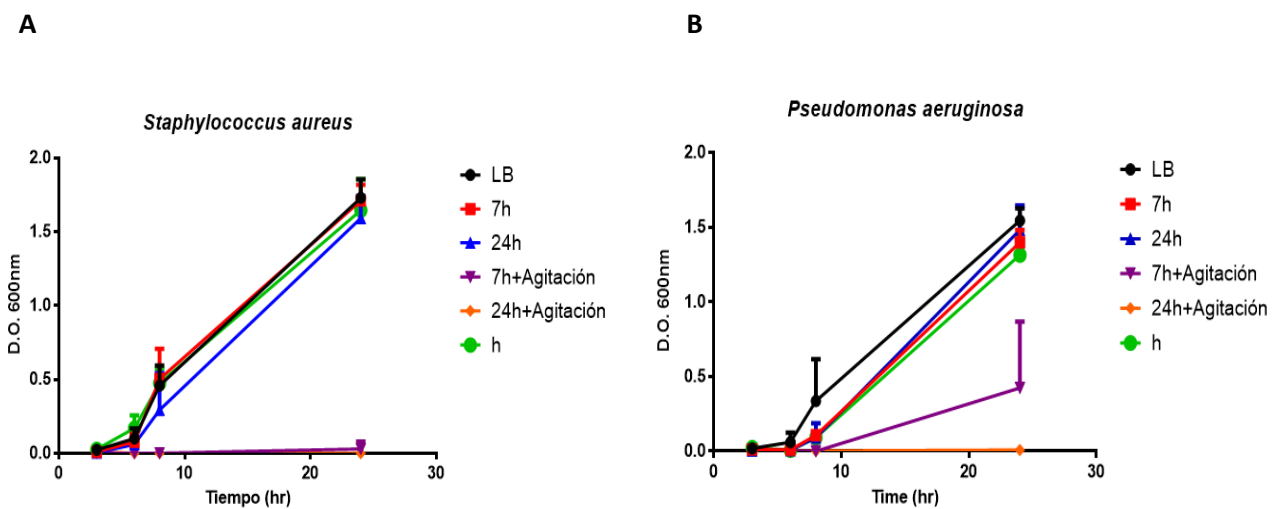


Figura 10: Curva de crecimiento de *S. aureus* y *P. aeruginosa*, para cada condición estudiada. Se evaluó el crecimiento en medio líquido LB, conteniendo uno de los 4 sobrenadantes de *I2* obtenidos en diferentes condiciones de cultivo o el sobrenadante de *h*, según se indica a la izquierda de cada gráfica. Los cultivos de los patógenos se incubaron a 37°C con agitación. Se realizaron mediciones de densidad óptica a 600 nm a las 3, 6, 8 y 24 horas. **A:** Curvas de crecimiento de *S. aureus*. **B:** Curvas de crecimiento de *P. aeruginosa*. Los datos mostrados son el promedio y la desviación estándar de tres replicados independientes.

En la figura 10 se puede ver el crecimiento normal de los patógenos en medio LB, medio apropiado para su crecimiento. Se observa como el crecimiento en el sobrenadante de *h* se acerca al normal en LB, algo que también es posible apreciar con los sobrenadantes obtenidos en cultivos sin agitación (tanto a 7 como a 24 horas), donde no hubo inhibición del crecimiento de los patógenos después de las 24 horas de incubación. Por otra parte, con ambos sobrenadantes obtenidos tras incubación con agitación, se produjo una inhibición del crecimiento de ambos

patógenos. Aunque es importante destacar, que para *P. aeruginosa* el sobrenadante obtenido tras 7 horas de incubación presenta una menor capacidad de inhibición respecto del sobrenadante obtenido tras 24 horas, ya que se observa un crecimiento menor hacia el final del tiempo de incubación (Fig. 10B). Por esta razón, se puede afirmar que el sobrenadante obtenido a las 24 horas con agitación posee un efecto inhibitorio mayor en comparación con los otros tres sobrenadantes de *I2*, no observándose crecimiento de ninguna de las 2 bacterias patógenas utilizadas. Por estas razones, este fue el sobrenadante escogido para realizar los experimentos posteriores.

8.2. Determinación de la viabilidad bacteriana mediante ensayo de dilución seriada en medio sólido

Con el propósito de determinar si la inhibición del crecimiento bacteriano producida por este sobrenadante era de efecto bacteriostático o bactericida, se procedió a evaluar su acción mediante determinación de viabilidad del patógeno en los cultivos por ensayos de dilución seriada en placas de agar LB.

Para realizar esto se obtuvo el sobrenadante tras la incubación de *I2* por 24 horas con agitación a 30°C. Posteriormente se trataron los cultivos de *S. aureus* y *P. aeruginosa* de manera similar al experimento anterior con este sobrenadante y se midió la viabilidad a las 3 y 6 horas post-inoculación para *S. aureus* y *P. aeruginosa*. También se sembraron placas agar LB con un inóculo inicial de los patógenos, con el propósito de tener una estimación de cuántas bacterias fueron inoculadas en los tubos a analizar en un comienzo. Los resultados son presentados en la figura 11.

Efecto sobrenadante I2 vs patógenos

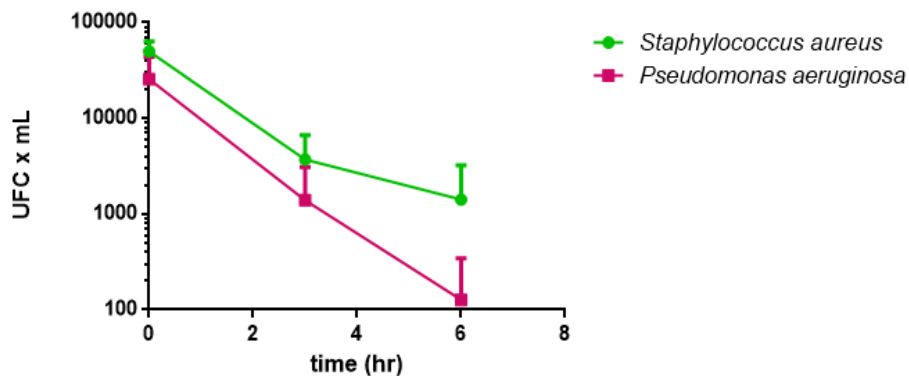


Figura 11: Determinación del efecto del sobrenadante de I2 en bacterias patógenas, mediante determinación de viabilidad por dilución seriada. Gráfica con escala logarítmica del número estimado de UFC presentes por mL. La estimación se realizó mediante conteo de colonias de diluciones seriadas en placa. Promedio y desviación estándar de 3 repeticiones en condiciones de incubación de 37°C con agitación.

Los resultados obtenidos en la figura 11 muestran una progresiva reducción en el número de UFC por mL para ambas bacterias, desde el momento en que fueron puestos los tubos a incubar hasta que pasaron las 6 horas, momento en que se hizo la última siembra y dilución seriada. La reducción es continua pero en ningún momento llega a 0. Con *P. aeruginosa* se aprecia el mejor resultado, con una disminución que se acerca a la eliminación total, lo que es posible observar en la gráfica, sobreviviendo solo un 0,49% de las UFC promedio iniciales tras las 6 horas de incubación del sobrenadante y el patógeno. En el caso de *S. aureus*, hay una reducción marcada de las UFC por mL pero que no llega al porcentaje de eliminación observado con la otra bacteria, ya que en promedio sobrevivió un 2,82% de las UFC iniciales tras las 6 horas de incubación. El que no se llegara a la reducción total, implica que el sobrenadante no eliminó todas las bacterias presentes. Una tabla con los resultados extendidos se encuentra en anexos.

8.3. Caracterización del sobrenadante de *Desemzia incerta* I2.

Respecto al segundo objetivo, se buscó conocer diferentes características de la naturaleza de las posibles moléculas antimicrobianas del sobrenadante de I2, esto mediante la evaluación del efecto de tratamientos con calor, con enzima proteolítica y filtración sobre la capacidad inhibitoria del sobrenadante.

8.3.1. Efecto del tratamiento con calor en el sobrenadante de I2

El objetivo del experimento con el tratamiento con calor consistió en determinar si el sobrenadante se ve afectado por tratamientos térmicos y por ende conocer si los metabolitos implicados en la inhibición por *D. incerta* I2 son termorresistentes. El sobrenadante fue sometido a dos diferentes tratamientos térmicos: 121°C por 15 minutos (mediante el uso de autoclave) y exposición a 95°C por 10 minutos. Posteriormente, con los sobrenadantes tratados se procedió a montar el experimento de la forma descrita en la sección de métodos. En cada tubo se colocaron 4 mL de sobrenadante más 4 mL de LB fresco y se inocularon con 50 uL de las bacterias patógenas, utilizando cada uno de los sobrenadantes tratados por separado y un tubo control con sobrenadante sin tratamiento térmico. Los tubos se incubaron a 37 °C por 24 horas y se midió la densidad óptica a 600 nm. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 12.

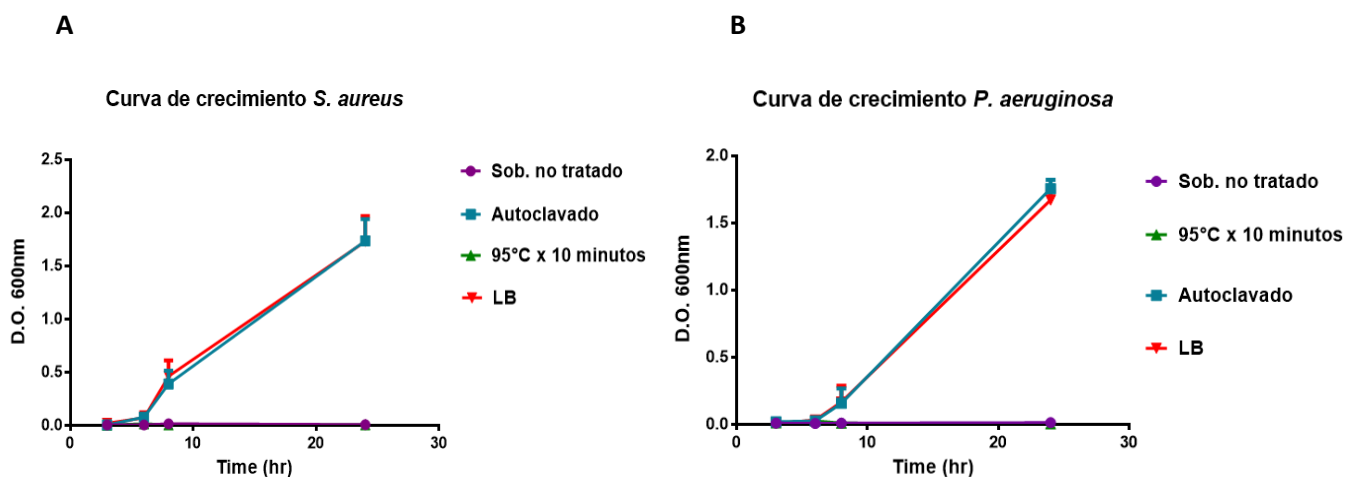


Figura 12: Evaluación del efecto de tratamientos de calor en la capacidad inhibitoria del sobrenadante de *I2* frente a los patógenos *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Se realizaron mediciones de densidad óptica a las 3, 6, 8 y 24 horas, con condiciones de incubación de 37°C más agitación. Se evalúa crecimiento en LB, LB + sobrenadante no tratado, LB + sobrenadante tratado a 121°C por 15 minutos y LB + sobrenadante tratado a 95°C por 10 minutos. **A:** Curva de crecimiento de *S. aureus* para cada condición evaluada. **B:** Curva de crecimiento de *P. aeruginosa* para cada condición evaluada. Crecimiento promedio de 3 repeticiones independientes.

Se puede observar en la figura 12 que para ambas bacterias se obtuvieron resultados similares. El crecimiento en LB muestra el crecimiento normal de ambos patógenos, lo que permite realizar la comparación con aquellas condiciones donde no hubo mayor efecto inhibitorio, mientras que el crecimiento en LB + sobrenadante no tratado se usó como referencia de capacidad inhibitoria. Los resultados muestran que en el caso del sobrenadante tratado con 95°C por 10 minutos no se evidencia mayor diferencia con el sobrenadante no tratado, lo que indica que a esta temperatura y con el tiempo de tratamiento no se alteran los componentes que producen el efecto antimicrobiano del sobrenadante. Sin embargo, en el caso del sobrenadante tratado en el autoclave se observa una pérdida total del efecto inhibitorio y la curva de crecimiento es similar a la del crecimiento normal en LB.

Estos resultados sugieren que la o las moléculas antimicrobianas presentes en el sobrenadante son lábiles a 121 °C por 15 minutos, pero resistentes al tratamiento a 95°C por 10 minutos.

8.3.2. Efecto del tratamiento con Proteinasa K sobre el efecto inhibitorio del sobrenadante de *I2*

Para el segundo experimento, el objetivo fue conocer si el sobrenadante se veía afectado al ser tratado con Proteinasa K, lo que indicaría que las moléculas antimicrobianas producidas por *I2* son de naturaleza proteica.

El sobrenadante fue sometido a 2 tratamientos, el primero correspondió al con la proteínasa K en conjunto con un tratamiento con calor a 50°C por 1 hora para la activación de la proteasa. El segundo tratamiento correspondió a la exposición con calor a 50°C por 1 hora pero sin la presencia de la proteasa, para conocer el efecto en solitario de este tratamiento por calor.

En cada tubo se colocaron 4 mL de sobrenadante, 4 mL de LB fresco y se inocularon 50 uL de los patógenos, utilizando los sobrenadantes tratados por separado. También se agregó un tubo con sobrenadante sin tratamiento con la proteasa como control de inhibición y un tubo solo con LB y el patógeno como control de crecimiento. Los tubos se incubaron a 37°C y se midió la densidad óptica pasadas las 24 horas. Los resultados son presentados en la figura 13.

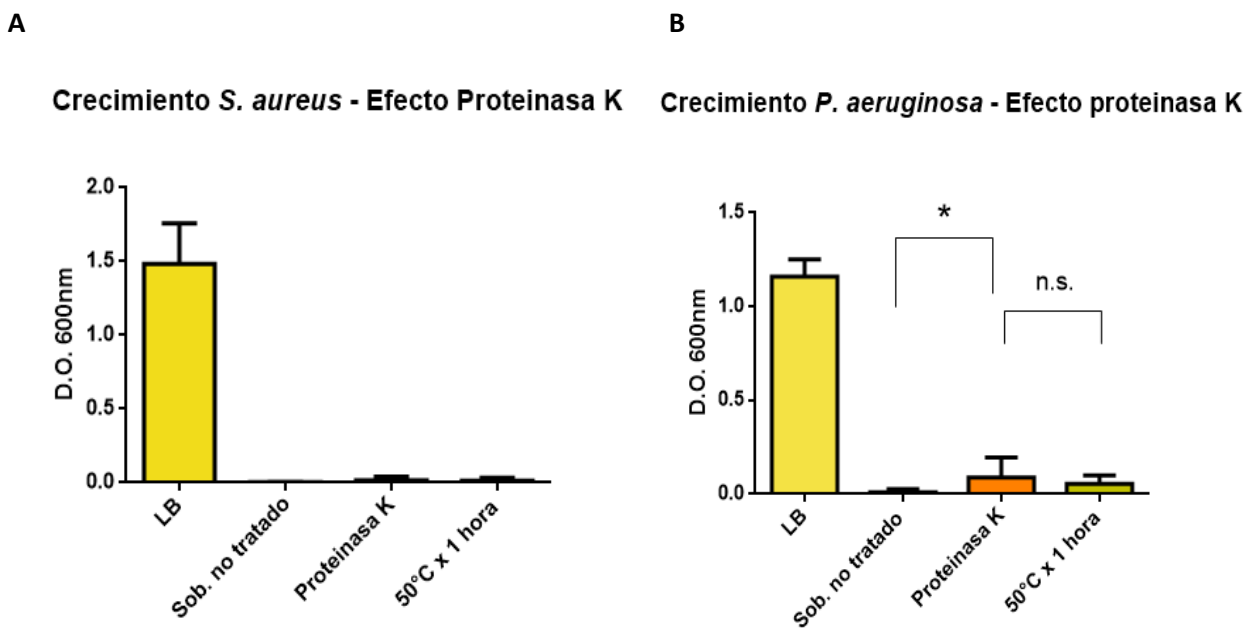


Figura 13: Evaluación del efecto de Proteínasa K en la capacidad antimicrobiana del sobrenadante de *I2*, en las bacterias *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Crecimiento promedio de 3 repeticiones independientes, a las 24 horas de incubación a 37°C con agitación. **A:** Crecimiento de *S. aureus* en los diferentes sobrenadantes. **B:** Crecimiento de *P. aeruginosa* en los diferentes sobrenadantes. n.s.= no significativo. *= Estadísticamente significativo para un valor de $p < 0.05$.

En el caso de *S. aureus*, se puede observar en la figura 13A que el sobrenadante no tratado es capaz de inhibir el crecimiento de la bacteria y al realizar el tratamiento con calor y agregar la proteínasa K, no se pierde el efecto inhibitorio del sobrenadante. Por otra parte en la figura 13B con *P. aeruginosa*, se ve un poco de mayor variabilidad en los resultados del efecto inhibitorio al aplicar los tratamientos al sobrenadante, en especial con la proteínasa K ya que pareciera haber un ligero crecimiento, aunque en general el efecto inhibitorio pareciera mantenerse en su mayoría con la adición de la proteasa. A nivel del análisis estadístico, se observa una significancia entre el resultado obtenido en el sobrenadante con la proteasa y el del sobrenadante sin tratar, lo que indicaría que el sobrenadante vio afectado su efecto por la acción de la proteasa. Por otro lado, no se observa significancia entre los resultados del sobrenadante tratado con proteínasa K y el tratado con calor a 50°C

Que el sobrenadante no se vea afectado mayormente por el tratamiento con la proteasa, podría indicar que las moléculas inhibitorias presentes en el sobrenadante de *I2* en su mayoría no son de naturaleza proteica.

Todos los valores obtenidos en cada repetición de los experimentos descritos en esta sección se indican en la Tabla de la sección Anexo.

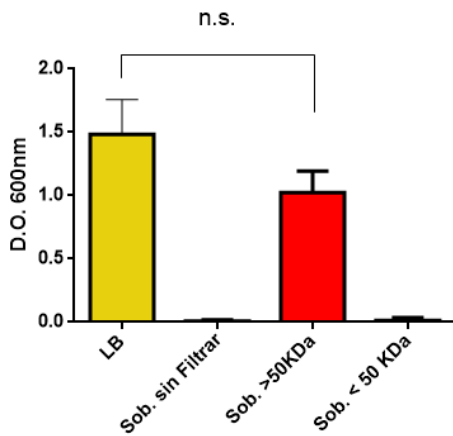
8.3.3 Efecto de la filtración en el potencial inhibitorio del sobrenadante

En el último experimento, el objetivo fue evaluar el efecto de la filtración en la capacidad antimicrobiana del sobrenadante de *I2*. En este caso se utilizaron 2 filtros de tamaño de poro de 50 KDa y 10 KDa, por lo que tras los procesos de concentración y filtración de los sobrenadantes se contó con 4 fracciones, una fracción de tamaño de moléculas superior a 50 KDa, una de menor de 50 KDa, una de tamaño superior a 10 KDa y una inferior a 10 KDa.

Con las 4 fracciones del sobrenadante se procedió a realizar el experimento. Para cada sobrenadante a examinar se utilizó un tubo donde se agregó 4 mL de este, más 4 mL de LB fresco y 50 uL del patógeno, para cada uno de los patógenos. También se incluyeron tubos con el sobrenadante no filtrado, el cual se utilizó para determinar el efecto normal del sobrenadante sin tratamiento alguno, además del tubo solo con LB como medio de crecimiento del patógeno normal sin inhibición. Los resultados son presentados en la figura 14.

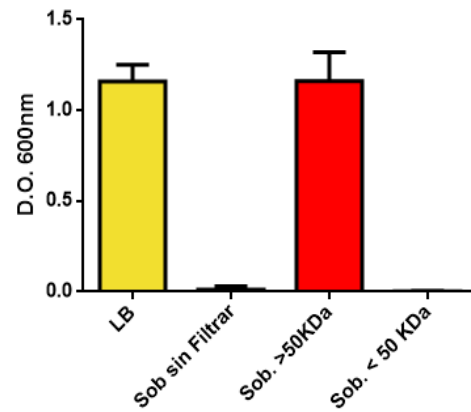
A

Crecimiento de *S. aureus* - efecto filtración 50 KDa



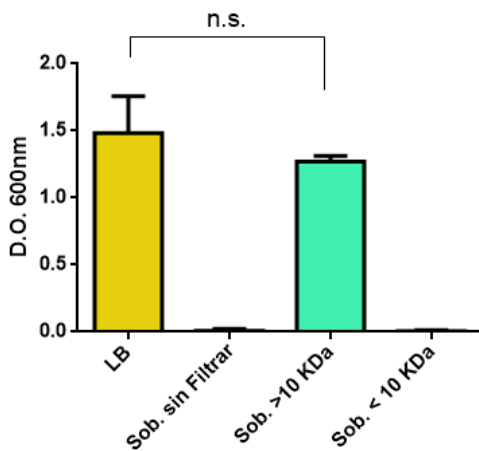
B

Crecimiento *P. aeruginosa* - efecto filtración 50 KDa



C

Crecimiento *S. aureus* - efecto filtración 10 KDa



D

Crecimiento *P. aeruginosa* - efecto filtración 10 KDa

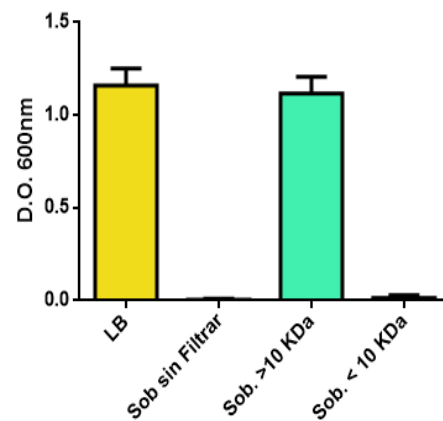


Figura 14: Determinación del efecto de la filtración del sobrenadante *I2* con filtros de tamaño de poro 50 KDa y 10 KDa, evaluado en patógenos *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Crecimiento promedio de 3 repeticiones a las 24 horas, con condiciones de incubación de 37°C y agitación. **A:** Crecimiento de *S. aureus* en LB fresco, sobrenadante sin filtrar, fracción mayor y menor a 50 KDa. **B:** Crecimiento de *P. aeruginosa* en LB fresco, sobrenadante sin filtrar, fracción mayor y menor a 50 KDa. **C:** Crecimiento de *S. aureus* en LB, sobrenadante sin filtrar, fracción mayor y menor a 10 KDa. **D:** Crecimiento de *P. aeruginosa* en LB, sobrenadante sin filtrar, fracción mayor y menor a 10 KDa. n.s.= no significativo. *= Estadísticamente significativo para un valor de $p < 0.05$.

En la figura 14A y 14B se puede ver para ambos patógenos como el efecto del sobrenadante se pierde en la fracción mayor a 50 KDa y este crecimiento se acerca al normal observado en LB. En el análisis estadístico se observó que la diferencia de resultados entre el crecimiento en LB y en la fracción mayor a 50 KDa no es significativa, lo que se puede interpretar como que se perdió el efecto del sobrenadante en ambos casos a pesar de la ligera diferencia de resultados. Por otra parte, en la fracción menor a 50 KDa del sobrenadante se mantiene la inhibición de crecimiento observada en el sobrenadante no filtrado. Esto nos indica que los metabolitos producidos por *I2* con efecto inhibitorio, presentes en el sobrenadante son menores de 50 KDa de tamaño.

En las figuras 14C y 14D, similar con lo ocurrido con la filtración de los 50 KDa, se observa una fracción del sobrenadante tras filtrar con tamaño de poro de 10 KDa, que mantiene el efecto inhibitorio del crecimiento para ambas bacterias, mientras que la otra lo pierde. En el sobrenadante de la fracción superior a 10 KDa no se observa inhibición y el resultado se acerca al obtenido con LB. El análisis estadístico indicó que no había significancia entre los resultados de LB comparado con el sobrenadante de la fracción mayor a 10 KDa, por lo que se entiende que se perdió el efecto inhibitorio con la filtración. Por otra parte no hay crecimiento de *S. aureus* y *P. aeruginosa* en la fracción menor a 10 KDa. Esto indica que las moléculas inhibitorias de *I2* presentes en el sobrenadante son de tamaños menores a 10 KDa.

9. DISCUSIÓN

El avance de la resistencia bacteriana a nivel mundial en los últimos años, que trae consigo el aumento de los costos y la mortalidad, ha provocado la intensificación por parte de los investigadores en la búsqueda de nuevos antibióticos capaces de controlar las infecciones y enfermedades que son causadas por estos patógenos.

D. incerta I2, que es una bacteria muy poco conocida, fue aislada desde muestras de agua del Río Mapocho, y dentro de los primeros estudios realizados fue capaz de provocar inhibición en placa a diferentes bacterias patógenas. Considerando esto y en un esfuerzo por aportar en la búsqueda de nuevos antibióticos, se buscó en este trabajo determinar el potencial antimicrobiano de *I2* mediante el estudio de su sobrenadante.

Desde un inicio el objetivo fue obtener un sobrenadante libre de bacterias para poder así evaluar su efecto contra las bacterias patógenas *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Posteriormente, se procedió a determinar la condición en la que se obtenía el mayor efecto antimicrobiano del sobrenadante. Considerando que *I2* es una bacteria ambiental, además de su capacidad de crecer en un rango amplio de temperaturas, se decidió establecer una temperatura única de 30°C para los cultivos de *I2* a lo largo de la fase experimental. Esta temperatura también es acorde a lo observado en otros estudios donde se determinó la temperatura óptima de crecimiento de bacterias de ambientes acuáticos como son fiordos marítimos o aguas subterráneas, la cual consistió al rango de 18°C a 30°C. Esta información entregó sustento a la decisión tomada respecto a esta variable. [26][27].

Por otra parte, se escogió variar los tiempos de incubación y la aplicación o no de agitación como variables de obtención de los sobrenadantes, determinándose como mejores condiciones el cultivo de *I2* a 30°C por 24 horas con agitación. La agitación se ha utilizado como una forma de airear o agregar oxígeno al medio donde se está experimentando el crecimiento de la bacteria. Acá se evaluó si es que tenía un efecto en el crecimiento y producción/liberación de moléculas antimicrobianas. En la literatura los casos son variados, habiendo microorganismos que ven

potenciada su producción de metabolitos secundarios, como otros que no. En el caso de *D. incerta* 12 se obtuvieron resultados que indican un mejor efecto al aplicar esta condición en el crecimiento, lo que tendría sentido si se tiene en cuenta la característica microaerófila/aerófila de esta bacteria indicada en la literatura [10], que implica que en un ambiente con oxígeno la bacteria se desarrolla mejor. [28][29]

La agitación tuvo su impacto en el efecto, como también lo tuvo el variar el tiempo de incubación. Se observó mayor consistencia en el sobrenadante de 24 horas de incubación respecto del de 7 horas, que no siempre tenía el mismo efecto. En la figura 10 se ve como ambos sobrenadantes inhibieron el crecimiento de ambas bacterias, pero en el caso de *P. aeruginosa* (Fig. 10B), el sobrenadante de 7 horas parece perder un poco del efecto, lo que se puede observar la medición de las 24 horas donde se aprecia crecimiento del patógeno. El mejor efecto inhibitorio observado tras incubación de 24 horas indica que los metabolitos secundarios de 12 son producidos mayormente en la fase estacionaria de crecimiento, lo que va en línea general con lo que sucede con otros microorganismos. [30]

El sobrenadante presentó un buen efecto contra los patógenos, lo que permitió inhibir su proliferación, pero como se pudo ver en la figura 11, el sobrenadante no eliminó completamente las bacterias que fueron inoculadas. Con *P. aeruginosa*, la reducción del número de colonias fue más importante considerando la supervivencia promedio del 0,5% de las UFC del inóculo inicial, lo que podría indicar un mayor efecto del sobrenadante en esta bacteria si es que se compara con *S. aureus*, donde el 2,8% de las UFC promedio iniciales sobrevivieron tras las 6 horas de incubación. Aunque el porcentaje de supervivencia es mayor en *S. aureus*, sigue siendo un valor importante, más si se tiene en cuenta que el inóculo inicial promedio es prácticamente el doble al que se contó con *P. aeruginosa* (50000 UFC vs 25600 UFC). Los resultados obtenidos para ambos patógenos demuestran que el sobrenadante presenta un efecto inhibitorio importante, considerando que en

ambos casos sobrevivieron menos del 5% del total de las unidades formadoras de colonias promedio que fueron inoculadas en el inicio del experimento. Esta importante reducción en las 6 horas de evaluación podría indicar un efecto bactericida de los metabolitos presentes en el sobrenadante, pero para afirmarlo con seguridad sería necesario realizar experimentos más largos, además de conocer más información de las moléculas inhibitorias, como su mecanismo de acción. También habría que evaluar el efecto de la concentración, ya que podría ser que en ciertas concentraciones se comporte como bacteriostático y en otras como bactericida. [31]

Teniendo el sobrenadante con mejor efecto, fue posible avanzar a la siguiente objetivo donde se buscó determinar la naturaleza de los metabolitos presentes en el sobrenadante.

Se evaluaron primero los tratamientos con temperaturas. Analizando los resultados de la figura 12, fácilmente se puede afirmar que la fracción tratada a 95°C por 10 minutos mantuvo el efecto inhibitorio y no se vio afectada por el tratamiento, mientras que la fracción tratada a 121°C por 15 minutos perdió la capacidad inhibitoria lo que significa que los metabolitos secundarios presentes fueron degradados. A pesar de que estos no resistieron el tratamiento en el autoclave, es posible afirmar que los metabolitos son termoestables considerando que fueron capaces de resistir temperaturas altas cercanas a los 100°C. Algunos metabolitos conocidos por ser termoestables son las bacteriocinas de tipo I y II, que como otra característica relevante se sabe que son de tamaño pequeño (menor a 10 KDa). [32][33]

La segunda característica de la naturaleza a evaluar fue determinar qué sucede al tratar el sobrenadante con proteinasa K. Los resultados obtenidos en la figura 13, en general muestran que el sobrenadante tiene prácticamente el mismo resultado con tratamiento como sin el. Con *S. aureus* no hay variación con la proteinasa respecto al sobrenadante no tratado. Con *P. aeruginosa* pareciera haber crecimiento y es que se obtuvo un resultado promedio de absorbancia de casi 0,1. El análisis realizado a nivel estadístico, indica que hay un valor significativo de p menor a 0.05 al

analizar los resultados obtenidos entre el sobrenadante tratado con la proteasa y el no tratado. Esto tiene como implicancia que los resultados son suficientemente diferentes, como para establecer el que se perdió una parte del efecto del sobrenadante al ser tratado con la proteasa K lo que hizo crecer al patógeno. En otras palabras, el sobrenadante pareciera verse afectado por la proteasa lo suficiente como para que se observe un pequeño crecimiento de *P. aeruginosa*.

Respecto al segundo análisis estadístico realizado, entre el sobrenadante tratado con proteasa y el tratado con calor a 50°C, no presenta significancia estadística, lo que sumado al resultado anterior, podría entenderse como que no es posible diferenciar los efectos producidos por ambos tratamientos, pudiendo establecer que no solo es el efecto de la proteasa, sino también del tratamiento con calor, sumado al anterior, el que provoca el crecimiento visto en los experimentos con *P. aeruginosa*.

A nivel general podría decirse que el sobrenadante de I2 no perdió el efecto con la proteasa K, pues hay una diferencia de crecimiento claramente observable en la figura 13 entre el crecimiento normal en LB y el obtenido con el sobrenadante con el tratamiento, lo que podría indicar que probablemente los metabolitos producidos por la bacteria y liberados en el sobrenadante no son en su mayoría de origen proteico. Las proteasas degradan las proteínas y sus derivados, por lo que si las moléculas antimicrobianas de I2 fueran metabolitos de este tipo, se hubieran degradado y por ende el efecto se hubiera perdido por completo. El que *P. aeruginosa* creciera en el sobrenadante podría indicar que su efecto es causado por más de una molécula, pudiendo haber metabolitos secundarios de tipo proteico que son también causantes de una parte de este efecto inhibitorio.

Hay que agregar también que hay metabolitos secundarios, como algunas bacteriocinas, que son resistentes al tratamiento con enzimas proteasas como la proteasa K. Esto ocurre especialmente con las bacteriocinas de tipo 1 y 2, que destacan también por su tamaño y por ser termorresistentes. Esta información es importante considerarla ya que no se puede descartar que

I2 produzca bacteriocinas propias no descubiertas en los análisis que sean como tal las moléculas causantes del efecto antimicrobiano producido por *I2* en los patógenos indicadores, a pesar de su naturaleza [32][33]. En otra investigación de similar metodología, se obtuvo un resultado distinto al realizar el tratamiento con proteinasa K, lo que nos dice que tales moléculas muy probablemente corresponden a moléculas de naturaleza proteica, a diferencia de nuestra investigación donde pareciera que los metabolitos secundarios encontrados son de naturaleza no proteica o bacteriocinas pequeñas. [34]

El último parámetro estudiado correspondió a la filtración. El sobrenadante fue pasado por filtros de tamaño de poro de 50 KDa y 10 KDa con los resultados expuestos en la figura 14.

La filtración de 50 KDa mostró el mismo resultado para ambas bacterias, donde la fracción menor a 50 KDa fue la que mantuvo el efecto mientras la otra la perdió. Al separar por 10 KDa se observó un resultado similar a la filtración de mayor tamaño y es que una fracción mantuvo el efecto inhibitorio, siendo la fracción menor a 10 KDa la que mantuvo la inhibición al crecimiento.

Los resultados de ambos experimentos, se pueden unir en una sola idea ya que apuntan al mismo resultado general, que las moléculas inhibitorias de *D. incerta I2* presentes en el sobrenadante son de un tamaño menor a 10 KDa, por lo que se pueden considerar como moléculas pequeñas. Los resultados de los análisis estadísticos realizados en este experimento no son significativos, lo que implica que la diferencia no es lo suficiente grande entre ambos resultados como para afirmar que en uno de estos no hay inhibición y en el otro si. De ambos se puede obtener como información que el sobrenadante como tal perdió el efecto y permitió el crecimiento de la bacteria.

Las moléculas inhibitorias son de tamaño menor a 10 KDa, esto podría tener relación con los resultados obtenidos en los anteriores experimentos. En conjunto este resultado sugiere que el sobrenadante de *D. incerta I2* podría contener metabolitos secundarios pequeños como bacteriocinas de tipo I o II, si se tiene en consideración la similitud de las características de estas últimas y los resultados obtenidos en los distintos experimentos. [32]

10. CONCLUSIÓN

Esta investigación logró obtener resultados relevantes. Respecto a estos, se concluye que para *Desemzia incerta I2* la presencia de aireación, obtenida a través de la agitación a nivel experimental, corresponde a un estímulo positivo para la liberación de moléculas antimicrobianas. Junto con la agitación, una incubación más larga también permite la obtención de mayor actividad inhibitoria.

Las metabolitos liberados por *I2* y presentes en el sobrenadante obtenido demostraron tener potencial antimicrobiano de amplio espectro, pues el sobrenadante fue capaz de inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*), como Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*).

Respecto a la naturaleza de las moléculas, se observó que el sobrenadante no se vió afectado por el tratamiento a 95°C por 10 minutos, no se vio afectado mayormente por el tratamiento con la proteinasa K y mantuvo su efecto inhibitorio solo en la fracción menor a 10 KDa tras ser filtrado. Esto permite concluir que las moléculas producidas por *I2* son termoestables, no parecen ser de tipo proteico y son de tamaño menor a 10 KDa. También tales características podrían indicar la presencia de bacteriocinas pequeñas.

Considerando los resultados expuestos, se acepta que *D. incerta I2* posee moléculas con capacidad antimicrobiana de amplio espectro.

A pesar de los resultados prometedores, es importante seguir realizando nuevos estudios sobre *Desemzia incerta I2* y su potencial antimicrobiano. Esta información obtenida es relevante, pero aún queda mucho por conocer sobre esta bacteria y sus compuestos antimicrobianos. Esta investigación puede utilizarse como base para próximos y futuros estudios respecto a *I2*, que según se puede evidenciar en nuestro estudio, produce metabolitos secundarios con potencial inhibitorio. Tendría especial relevancia el realizar una caracterización del sobrenadante y conocer más del metabolito específico que cuenta con capacidad antimicrobiana, el cual podría presentar relevancia en clínica en unos años.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Belloso WH; (2009). Historia de los antibióticos. Revista Hospital Italiano Buenos Aires. Disponible en: https://www1.hospitalitaliano.org.ar/multimedia/archivos/noticias_attachs/47/documentos/7482_102-111-belloso.pdf
2. Gonzáles Mendoza J, Maguiña Vargas C, Gonzáles Ponce F; (2019). La resistencia a los antibióticos: un problema muy serio. Acta médica Perú. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1728-59172019000200011&script=sci_arttext&lng=en
3. Organización Mundial de la Salud. (2020). Resistencia a los antimicrobianos. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
4. Organización mundial de la salud. (2018). Resistencia a los antibióticos. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antib%C3%B3ticos>
5. Organización mundial de la salud. (2015). PLAN DE ACCIÓN MUNDIAL SOBRE LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255204/9789243509761-spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
6. Organización mundial de la salud. (2017). La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
7. Santos-Aberturas J, Vior N; (2022). Beyond Soil-Dwelling Actinobacteria: Fantastic Antibiotics and Where to Find Them. MDPI. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2079-6382/11/2/195/htm>

8. Iñiguez DG. (2021) Identificación y caracterización de genes para la síntesis de metabolitos especializados y bacteriocinas de *Pseudomonas sp. I1* involucrados en la capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos microbianos. Universidad de Chile
9. Steinhaus EA. (1941) A study of the bacteria associated with thirty species of insects. J Bacteriol. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/jb.42.6.757-790.1941>
10. Stackebrandt E, Schumann P, Swiderski J, Weiss N. 1999. Reclassification of *Brevibacterium incertum* (Breed 1953) as *Desemzia incerta* gen. nov., comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. vol 49 Pt 1. Disponible en: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-49-1-185;jsessionid=eFGJVObTHxzJWOdvCmEzT2q.mbslive-10-240-10-120>
11. DOE Joint genome institute - IMG. (2015). *Desemzia incerta* DSM 20581 . Disponible en: https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/m/main.cgi?section=TaxonDetail&page=taxonDetail&taxon_oid=2622736579
12. BacDive. (2021). *Desemzia incerta* DSM 20581. Disponible en: <https://bacdive.dsmz.de/strain/2272>
13. Sanz-Montero ME, Cabestrero Ó, Sánchez-Román M; (2019). Microbial Mg-rich carbonates in an extreme alkaline lake (Las Eras, Central Spain). Front Microbiol. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.00148>
14. Ntougias, S, Zervakis, G I, Kavroulakis N, Ehaliotis C, and Papadopoulou K K; (2004). Bacterial diversity in spent mushroom compost assessed by amplified rDNA restriction analysis and sequencing of cultivated isolates. Syst. Appl. Microbiol. Vol 27, Pag 746–754. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0723202005703167?via%3Dihub>
15. Yadav A , Sacha SG, Verma P, Tyagi SP, Kaushik R, and Saxena AK; (2015). Culturable diversity and functional annotation of psychrotrophic bacteria from cold desert of Leh

- Ladakh (India). *World J. Microbiol. Biotechnol.* Vol 31, Pag 95–108. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-014-1768-z>
16. Singh AA, Singh AK, Nerurkar A. (2020). Bacteria associated with marine macroorganisms as potential source of quorum-sensing antagonists. *J Basic Microbiol.* Vol 60, Pag 799–808. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jobm.202000231>
 17. Martinet L, Naômé A, Deflandre B, Maciejewska M, Tellatin D, Tenconi E, et al. (2019). A single biosynthetic gene cluster is responsible for the production of bagremycin antibiotics and ferroverdin iron chelators. *MBio.* Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.01230-19>
 18. Medema MH, Kottmann R, Yilmaz P, Cummings M, Biggins JB, Blin K, et al. (2015). Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster. *Nat Chem Biol.* Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC5714517/>
 19. Xu L, Ye KX, Dai WH, Sun C, Xu LH, Han BN; (2019). Comparative Genomic Insights into Secondary Metabolism Biosynthetic Gene Cluster Distributions of Marine Streptomyces. *MDPI*; Disponible en: <https://www.mdpi.com/1660-3397/17/9/498/htm>
 20. Keller NP. (2019). Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nat Rev Microbiol.* Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC6381595/>
 21. Simons A, Alhanout K, Duval RE. (2020). Bacteriocins, antimicrobial peptides from bacterial origin: Overview of their biology and their impact against multidrug-resistant bacteria. *Microorganisms.* Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC7285073/>
 22. Begrem S, Ivaniuk F, Gigout-Chavalier F, Kolypczuk L, Bonnetot S. (2020). New Insight into Antimicrobial Compounds from Food and Marine-Sourced *Carnobacterium* Species through Phenotype and Genome Analyses. *Mdpi.com.* Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-2607/8/7/1093>

23. Guimarães AC, Meireles LM, Lemos MF, Guimarães MCC, Endringer DC, Fronza M, et al. (2019). Antibacterial activity of terpenes and terpenoids present in essential oils. *Molecules*. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6651100/>
24. Yang W, Chen X, Li Y, Guo S, Wang Z, Yu X. (2020). Advances in pharmacological activities of terpenoids. *Nat Prod Commun*. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1177/1934578x20903555>
25. Miyanaga A. (2017). Structure and function of polyketide biosynthetic enzymes: various strategies for production of structurally diverse polyketides. *Biosci Biotechnol Biochem*. 81; 2227–36. Disponible en: <https://academic.oup.com/bbb/article/81/12/2227/5954401>
26. Undabarrena A, Beltrametti F, Claverías F, González M, Moore E, Seeger M, Cámara B; (2016). Exploring the Diversity and Antimicrobial Potential of Marine Actinobacteria from the Comau Fjord in Northern Patagonia, Chile. *Frontiers in Microbiology*. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01135/full>
27. Männistö MK, Puhakka JA; (2002). Psychrotolerant and microaerophilic bacteria in boreal groundwater. *FEMS Microbiology Ecology*, Vol. 41, Pag 9 - 16. Disponible en: <https://academic.oup.com/femsec/article/41/1/9/530962>
28. Fenice M, Barghini P, Selbmann L, Federici F; (2012). Combined effects of agitation and aeration on the chitinolytic enzymes production by the Antarctic fungus *Lecanicillium muscarium* CCFEE 5003. *Microbial Cell Factories*. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22270226/>
29. Massaldi H, Bessio MI, Suárez N, Tereixa E, Rossi S, Ferreira F; (2010). Features of bacterial growth and polysaccharide production of *Streptococcus pneumoniae* serotype 14. *Biotechnol Appl Biochem*. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19891609/>
30. Kumar V, Ahluwalia V, Saran S, Kumar J, Kumar Patel A, Singhania R; (2021). Recent developments on solid-state fermentation for production of microbial secondary

- metabolites: Challenges and solutions. *Bioresource Technology*, Vol 323. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S096085242031840X>
31. Pankey GA, Sabbath LD; (2004). Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections. *Clinical Infectious Diseases*, Vol 38, Pag 864–870. Disponible en: <https://academic.oup.com/cid/article/38/6/864/320723>
 32. Meade E, Slattery MA, Garvey M; (2020). Bacteriocins, Potent Antimicrobial Peptides and the Fight against Multi Drug Resistant Species: Resistance Is Futile?. *Antibiotics*. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7168330/>
 33. Zangeneh M, Khorrami S, Khalegui M; (2020). Bacteriostatic activity and partial characterization of the bacteriocin produced by *L. plantarum* sp. isolated from traditional sourdough. *Food Sci Nutr*. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7684595/>
 34. Cole A, Sundar M, López A, Forsman A, Yooseph S, Cole AM; (2021). Identification of Nasal Gammaproteobacteria with Potent Activity against *Staphylococcus aureus*: Novel Insights into the “Noncarrier” State. *ASM Journals*. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mSphere.01015-20>

12. ANEXOS

1. Tabla extendida de los resultados del experimento de viabilidad para *S. aureus*. Conteo destacado en verde correspondió al amplificado para obtener las UFC x mL de esa repetición. Se intentó utilizar la dilución más grande en la mayoría de los casos donde fue posible. El promedio de los resultados de UFC x mL es el valor utilizado en la gráfica.

	UFC x mL	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²													
Inóculo inicial	<table border="1"> <tr><td>38200</td></tr> <tr><td>65000</td></tr> <tr><td>47000</td></tr> <tr><td>X: 50067</td></tr> </table>	38200	65000	47000	X: 50067	<table border="1"> <tr><td>3820</td></tr> <tr><td>6500</td></tr> <tr><td>4700</td></tr> </table>	3820	6500	4700	<table border="1"> <tr><td>382</td></tr> <tr><td>-</td></tr> <tr><td>-</td></tr> </table>	382	-	-	<table border="1"> <tr><td>40</td></tr> <tr><td>65</td></tr> <tr><td>47</td></tr> </table>	40	65	47
38200																	
65000																	
47000																	
X: 50067																	
3820																	
6500																	
4700																	
382																	
-																	
-																	
40																	
65																	
47																	
+3 horas	<table border="1"> <tr><td>5800</td></tr> <tr><td>1600</td></tr> <tr><td></td></tr> <tr><td>x:3700</td></tr> </table>	5800	1600		x:3700	<table border="1"> <tr><td>580</td></tr> <tr><td>160</td></tr> <tr><td></td></tr> </table>	580	160		<table border="1"> <tr><td>58</td></tr> <tr><td>16</td></tr> <tr><td></td></tr> </table>	58	16		<table border="1"> <tr><td>10</td></tr> <tr><td>4</td></tr> <tr><td></td></tr> </table>	10	4	
5800																	
1600																	
x:3700																	
580																	
160																	
58																	
16																	
10																	
4																	
+ 6 horas	<table border="1"> <tr><td>2700</td></tr> <tr><td>130</td></tr> <tr><td></td></tr> <tr><td>x:1415</td></tr> </table>	2700	130		x:1415	<table border="1"> <tr><td>270</td></tr> <tr><td>13</td></tr> <tr><td></td></tr> </table>	270	13		<table border="1"> <tr><td>27</td></tr> <tr><td>1</td></tr> <tr><td></td></tr> </table>	27	1		<table border="1"> <tr><td>2</td></tr> <tr><td>0</td></tr> <tr><td></td></tr> </table>	2	0	
2700																	
130																	
x:1415																	
270																	
13																	
27																	
1																	
2																	
0																	
% de UFC restantes tras 6 horas		2,82%															

2. Tabla extendida de los resultados del experimento de viabilidad para *P. aeruginosa*.

Conteo destacado en verde correspondió al amplificado para obtener las UFC x mL de esa repetición. Se intentó utilizar la dilución más grande en la mayoría de los casos donde fue posible. El promedio de los resultados de UFC x mL es el valor utilizado en la gráfica.

	UFC x mL	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²													
Inóculo inicial	<table border="1"> <tr><td>19300</td></tr> <tr><td>11500</td></tr> <tr><td>46000</td></tr> <tr><td>X: 25600</td></tr> </table>	19300	11500	46000	X: 25600	<table border="1"> <tr><td>1930</td></tr> <tr><td>1150</td></tr> <tr><td>4600</td></tr> </table>	1930	1150	4600	<table border="1"> <tr><td>193</td></tr> <tr><td>115</td></tr> <tr><td>-</td></tr> </table>	193	115	-	<table border="1"> <tr><td>9</td></tr> <tr><td>19</td></tr> <tr><td>46</td></tr> </table>	9	19	46
19300																	
11500																	
46000																	
X: 25600																	
1930																	
1150																	
4600																	
193																	
115																	
-																	
9																	
19																	
46																	
+3 horas	<table border="1"> <tr><td>30</td></tr> <tr><td>850</td></tr> <tr><td>3300</td></tr> <tr><td>X:1393</td></tr> </table>	30	850	3300	X:1393	<table border="1"> <tr><td>3</td></tr> <tr><td>85</td></tr> <tr><td>330</td></tr> </table>	3	85	330	<table border="1"> <tr><td>0</td></tr> <tr><td>17</td></tr> <tr><td>33</td></tr> </table>	0	17	33	<table border="1"> <tr><td>0</td></tr> <tr><td>0</td></tr> <tr><td>2</td></tr> </table>	0	0	2
30																	
850																	
3300																	
X:1393																	
3																	
85																	
330																	
0																	
17																	
33																	
0																	
0																	
2																	
+ 6 horas	<table border="1"> <tr><td>0</td></tr> <tr><td>0</td></tr> <tr><td>380</td></tr> <tr><td>x:127</td></tr> </table>	0	0	380	x:127	<table border="1"> <tr><td>0</td></tr> <tr><td>0</td></tr> <tr><td>38</td></tr> </table>	0	0	38	<table border="1"> <tr><td>0</td></tr> <tr><td>0</td></tr> <tr><td>7</td></tr> </table>	0	0	7	<table border="1"> <tr><td>0</td></tr> <tr><td>0</td></tr> <tr><td>3</td></tr> </table>	0	0	3
0																	
0																	
380																	
x:127																	
0																	
0																	
38																	
0																	
0																	
7																	
0																	
0																	
3																	
% de UFC restantes tras 6 horas		0,49%															

3. Resultados extendidos del experimento de evaluación del efecto de la proteinasa K en el sobrenadante de /2. La gráfica fue construida con el promedio y la desviación estándar.

	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio	Desviación estándar
SA + Sobrenadante con Proteinasa K (50°C x 1 hora)	0	0.044	0.002	0.015	0.020
SA + Sobrenadante tratado 50°C por 1 hora	0	0.035	0.002	0.012	0.016
PA + Sobrenadante con Proteinasa K (50°C x 1 hora)	0.208	0.058	0.001	0.089	0.087
PA + Sobrenadante tratado 50°C por 1 hora	0.084	0.076	0.003	0.054	0.036
SA + Sobrenadante no tratado	0.004	0.001	0.003	0.003	0.001
PA + Sobrenadante no tratado	0	0.030	0.002	0.011	0.014

4. Resultados extendidos del experimento de evaluación del efecto de la filtración (50 KDa) en el sobrenadante de /2. La gráfica se construyó con el promedio y la desviación estándar.

Repetición 50 KDa	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio	Desviación estándar
SA + Sobrenadante > 50 KDa	1.164	1.073	0.836	1.024	0.138
SA + Sobrenadante < 50 KDa	0	0.039	0.004	0.014	0.018
PA + Sobrenadante > 50 KDa	1.310	1.180	0.993	1.161	0.130
PA + Sobrenadante < 50 KDa	0	0.005	0.002	0.002	0.002
SA + Sobrenadante sin filtrar	0	0.018	0.005	0.007	0.007
PA + Sobrenadante sin filtrar	0	0.033	0.002	0.012	0.015
LB + SA	1.294	1.363	1.797	1.485	0.222
LB + PA	1.080	1.139	1.260	1.160	0.074

5. Resultados extendidos del experimento de evaluación del efecto de la filtración (10 KDa) en el sobrenadante de /2. La gráfica se construyó con el promedio y la desviación estándar.

Repetición 10 KDa	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio	Desviación estándar
SA + Sobrenadante > 10 KDa	1.314	1.272	1.225	1.270	0.036
SA + Sobrenadante < 10 KDa	0	0.016	0	0.005	0.007
PA + Sobrenadante > 10 KDa	1.120	1.203	1.025	1.116	0.072
PA + Sobrenadante < 10 KDa	0	0.031	0.010	0.014	0.013
SA + Sobrenadante sin filtrar	0	0.026	0.003	0.010	0.011
PA + Sobrenadante sin filtrar	0	0.011	0.002	0.004	0.005

Carta de autorización de tesis

Santiago de Chile, 15 de Julio de 2022

A quien corresponda,

Por medio de la presente carta, el tutor, el Dr. Víctor García Angulo, RUT 24.611.495-1, AUTORIZA a Juan José Saavedra Acevedo, RUT 20.137.474-K, estudiante de la carrera de Tecnología Médica de la Universidad de Chile, a entregar el escrito final de la tesis profesional para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención en Bioanálisis Clínico Molecular, Hematología y Medicina Transfusional. El trabajo se titula "DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD INHIBITORIA CONTRA PATÓGENOS BACTERIANOS DE LOS SOBRENADANTES DE *Desemzia incerta* I2". Esta tesis fue desarrollada en las instalaciones del Programa de Microbiología, del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Financiado por el proyecto Regular N° 1220433 del Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT).

Sin otra particular se despide atentamente



DR. VÍCTOR GARCÍA

Programa de Microbiología

Instituto de Ciencias Biomédicas

Facultad de Medicina

Universidad de Chile