

Trabajo Fin de Grado

Grado Biotecnología, 4º curso 2018/2019

Facultad de Ciencias Experimentales

PRODUCCIÓN DE SUSTANCIAS DE CARÁCTER ANTIMICROBIANO POR ACTINOBACTERIAS AISLADAS EN PROCESOS DE COMPOSTAJE

Autora:

María Matamala Montoya

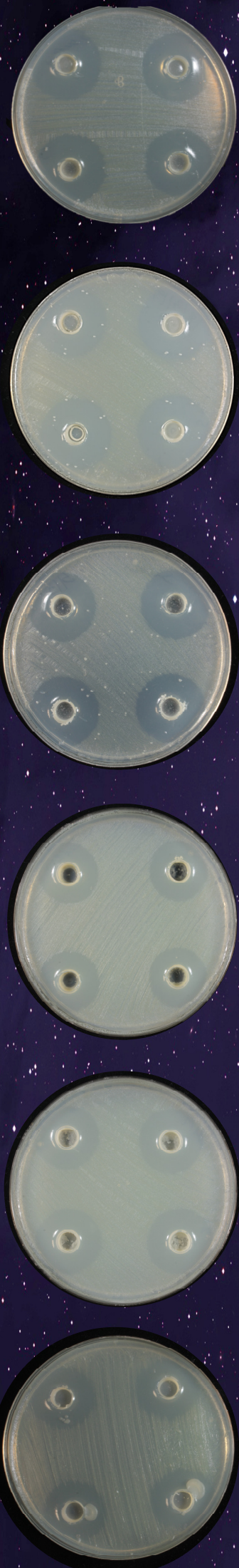
Directores:

José Joaquín Moreno Casco
Juan Antonio López González

Universidad de Almería

Departamento de Biología y Geología

Área de Microbiología



Agradecimientos

Era el verano de 2015 y yo no sabía muy bien en qué carrera iba a matricularme, ni dónde iba a cursarla. No sé si llamarlo destino o casualidad, pero una serie de factores se conjuraron para que yo cursara Biotecnología en la UAL y creo que es una de las mejores decisiones que he tomado. No solo he aprendido y me he sumergido en esta maravillosa carrera, si no que he tenido la oportunidad de conocer a personas con las que he compartido emociones, experiencias, me han visto crecer y me han ofrecido su apoyo en esta etapa que, más bien, ha sido una montaña rusa de emociones, pero a su vez, una de las etapas más intensas y bonitas de mi vida.

Desde el verano del segundo año de carrera tuve la suerte de enrolarme en el laboratorio de Microbiología. Tenía claro que me quería dedicar a la investigación y quería empezar a descubrir lo que era de verdad el trabajo en el laboratorio más allá de las prácticas de la carrera y, además, en el maravilloso mundo de la microbiología. Tengo que agradecer a todo el personal de laboratorio que desde el primer día me integraron en esta pequeña familia y que tanto me han enseñado y cuidado.

Para empezar, quiero dedicar mis agradecimientos a Joaquín, o más bien dicho, al que es mi “segundo padre”. Has sido y serás para mí siempre un referente, mi maestro Yoda, un profesor 10, que no solo sabe transmitir los conocimientos, si no que se ofrece al alumno para cualquier cosa que necesite. Además, has sido uno de los profesores a los que más he abierto mi alma por la confianza que transmites. Recuerdo esas conversaciones de primero de carrera cuando me encontraba en lo más bajo y me ayudaste a salir de ese pozo; sin nombrar otras innumerables veces que me has animado y apoyado. Me enseñaste a creer en mí misma ante todo sin importar lo que nadie me dijera, a poner el máximo esfuerzo para lograr mis objetivos, aunque tuviera que trabajar 24/7 y a luchar por los sueños, pero poniéndole al sueño un límite de fecha como tú dices. Eternamente te estaré agradecida por todo tu apoyo, porque quizá, si no hubiera sido por esas conversaciones, me hubiera hundido en lo más profundo en más de una situación. También te tengo que agradecer haberme aceptado en el laboratorio desde un principio con los brazos abiertos y haber sido el pilar fundamental de mi TFG que has dirigido con tanto empeño. Doy gracias al destino por haberme quedado en Almería a estudiar la carrera y haber tenido la oportunidad de conocerte. Eres de esas personas que deja huella y sé que esté donde esté te llevaré conmigo.

Otra de las personas que más ha estado conmigo en el día a día ha sido mi cotutor Juan. Son muchos los valores que te caracterizan, pero lo que ha hecho el trabajo en laboratorio más ameno ha sido la felicidad que transmites y el positivismo infranqueable hasta cuando las cosas no salían bien. Has sido la persona que más me ha enseñado lo que es trabajar en laboratorio, ya que aparte de haber sido mi profesor de prácticas durante 4 años, me has enseñado continuamente desde que entré en el laboratorio.

Por otra parte, los demás profesores de laboratorio han sido parte fundamental de esta familia. Paqui siempre divina y con una sonrisa, aunque llevara un día malo, te alegraba al saludarla en el laboratorio y siempre estaba pendiente a nosotros; Macarena es esa profe guay de la que podías hablar de microbiología y de temas mediáticos o filosóficos esas tardes de laboratorio en los tiempos de espera de los experimentos; Carmen, que lo mismo hacía ciencia en el laboratorio que te enseñaba a hacer un kéfir casero o María José que a pesar de no conocerla de antes, me demostró ser una gran persona y una gran científica. No quiero olvidar aquellas otras personas que ocupan un escalón elevado en su periodo de formación (las doctorandas) con las que he vivido tantas risas, momentos, que han sido más que compañeras de laboratorio y con las que he mantenido tantas conversaciones, que tenían la capacidad de hacer que el tiempo pasara más rápido, como María José Estrella, María Rosa, Ana Siles y Ana Toribio, gracias por acogerme tan bien. No menos importantes son los técnicos y todas esas personas que he visto pasar por laboratorio y han llegado a ser incluso amigos a los que también quiero dedicar mis agradecimientos.

Quienes también han sido parte fundamental durante este tiempo en el laboratorio han sido todos y cada uno de mis compañeros de clase que han realizado el TFG en microbiología. Me habéis hecho reír hasta llorar en más de una ocasión y he descubierto grandes personas que habían pasado más inadvertidas estos 4 años que llevamos juntos. Prácticamente, os he visto más que a mi familia y por ello el vínculo que ha creado la convivencia en el laboratorio ha sido muy bonito. Tengo que mencionar sobre todo a mi compañera Rosario, que es con la que más horas he pasado. El día de mañana cuando vea RM en algún lado me acordaré de nuestra firma característica para catalogar nuestro material o aquellas frases míticas y tardes de preparar “APHA a granel”.

No solo me han apoyado las personas del laboratorio, sino que, desde fuera, he contado con el apoyo inigualable de mi familia. Para empezar, quiero agradecer a mis padres que me han apoyado siempre en todas mis decisiones y en especial a mi madre que es la que más ha sufrido todos mis baches y a la vez más se ha alegrado por mí en mis victorias. A pesar de que, desde primero, yo haya querido volar e irme de casa, que sepas que valoro un montón todo tu amor y apoyo y que en el fondo te echaré de menos cuando vuele a buscar mi futuro. Me has criado y si he llegado hasta donde estoy (y más lejos que puedo llegar) es gracias a ti y es por ello que uno de los principales agradecimientos va dirigido a ti que eres una madre 10. También gracias a mi abuela que ha estado pendiente de mi progreso y a la que alguna vez he tenido la oportunidad de enseñarle las cosas que hago en laboratorio; y, es más, en algunas ocasiones ha sido la que mejor ha sido capaz de comprenderme. También quiero mencionar a mis primos Paco, Miguel Ángel, José.... y mi tía Isabel o mi tío José entre otros, porque siempre me han apoyado y creído en mi potencial para llegar lejos.

Por último, quiero agradecer a mis amigas y amigos de la carrera y de fuera, que más cercanos han estado a mí y que son unos cuantos para mencionar, pero ellos saben quiénes son. Gracias

por escucharme una y mil veces, por consolarme y animarme, por todos los momentos que hemos vivido y los que nos quedan por vivir.

Es mucho más que GRACIAS lo que tengo que dar a la vida por haber tenido la suerte de cursar una carrera que desconocía y que finalmente se reveló maravillosa, gracias por la suerte que he tenido y por poder conocer a todas y cada una de las personas que han formado parte de mi vida en esta etapa. No hubiera sido lo mismo sin todos vosotros y eso es lo que marca la diferencia de los buenos recuerdos que me acompañarán siempre.

“El destino puede desencadenar un giro en la historia por mucho empeño que pongas en controlar”

Índice

Resumen.....	5
Abstract	6
I. Introducción	7
1-Biotransformación mediante compostaje de residuos orgánicos	7
a) Fases del proceso de compostaje	7
b) Parámetros de control del proceso de compostaje	9
c) Microbiota implicada en compostaje.....	12
2-Producción de antimicrobianos naturales: antibióticos	13
a) Mecanismos de acción de los antibióticos.....	13
b) Antibióticos producidos por actinobacterias	18
2-Probleática asociada al empleo de antibióticos	19
a) Mecanismos de resistencia	19
b) Agentes patógenos resistentes a los antibióticos.....	20
c) Prevención de resistencias.....	22
II. Objetivos	25
III. Materiales y Metodología	25
1-Diseño experimental.....	25
2-Microorganismos del ensayo.....	26
a) Actinomicetos.....	26
b) Patógenos humanos.....	30
2-Medios de cultivo.....	30
3-Obtención de la colección de actinomicetos de muestras del compostaje	31
4-Diseño experimental para detección de cepas productoras de antimicrobianos	31
5- Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) con extractos acelulares de las actinobacterias productoras de sustancias antimicrobianas.....	34
6- Correlación entre CMI y diámetros de halos de inhibición. Análisis estadístico.	37
7- HPLC	37
IV. Resultados y Discusión.....	37
1-Enfrentamiento con extractos celulares.....	38
1.1. Experimentos para seleccionar metodología adecuada	38
1.2. Enfrentamientos <i>in vivo</i>	39
2-Determinación de la concentración mínima inhibitoria	43
3-Correlación CMI y halos de inhibición. Análisis estadístico.	45
4- Cromatografía	47
V. Conclusiones	49
VI. Bibliografía	50
Anexos.....	57

Resumen

La resistencia de los patógenos a algunos de los antibióticos actuales supone un problema que azota crecientemente en siglo XXI. Para superar este problema es necesario la búsqueda de nuevos antibióticos. Los actinomicetos presentes en el proceso de compostaje suponen una fuente de antibióticos aún inexplorada en su totalidad.

Esta investigación parte de 230 actinobacterias obtenidas en procesos de compostaje de materiales lignocelulósicos. Estos aislados se enfrentaron *in vivo* a los patógenos humanos tipo *E. coli* (Gram-negativo) y *S. aureus* (Gram-positivo), con el fin de conocer su posible efecto antagonista. Una vez seleccionadas aquellas cepas potenciales productoras de antibióticos, se realizó una prueba de concentración mínima inhibitoria (CMI) empleando extractos acelulares procedentes del crecimiento microbiano y se analizaron estadísticamente los resultados del ensayo *in vivo* y del ensayo de CMI para seleccionar las 2 cepas con mejor actividad antimicrobiana. Finalmente, a estas cepas se les realizó un protocolo de extracción de antibióticos y se realizó un análisis molecular por HPLC para identificar los compuestos bioactivos.

Un 17,3% de cepas evaluadas en el ensayo fueron productoras de sustancias antimicrobianas, entre los que se incluyen diversos géneros: *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Jonesia*, *Microbacterium*, *Nocardiopsis*, *Salinibacterium*, *Streptomyces*, *Cellulosimicrobium*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, y *Rhodococcus*. En el ensayo de CMI, se detectaron cepas microbianas capaces de generar inhibición del crecimiento de los patógenos tipo incluso en diluciones de 1:4 y 1:8 del extracto acelular. Por otra parte, los resultados obtenidos en la cromatografía revelan la presencia preliminar de una importante cantidad de compuestos bioactivos presentes en las cepas analizadas *Cellulosimicrobium funkei* y *Microbacterium hidroxicarborans*, entre los que se incluyeron compuestos con actividad antibiótica, anticancerígena y otras patologías destacadas.

Palabras clave: *Actinobacteria*, Antibióticos, Compostaje, Compuestos Bioactivos, CMI.

Abstract

Pathogenic resistance to some current antibiotics supposes an increasingly problem in the 21st century. To overcome this problem, it is needed the search of new antibiotics. Compost actinomycetes are an antibiotics source still unexplored at all.

This research arises from 230 actinomycetes obtained from composting processes of lignocellulosic materials. These isolates were confronted *in vivo* against type human pathogens: *E. coli* (Gram-negative) and *S. aureus* (Gram-positive), with the objective of know a possible antagonistic effect. One selected those potential antibiotic producer strains, a test of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was performed using acellular extracts coming from bacterial growth and the results of *in vivo* assay and MIC assay were analyzed statistically to choose 2 strains with the best antimicrobial activity. Finally, an antibiotic extraction protocol was performed on these strains and a molecular analysis was accomplished by HPLC to identify the bioactive compounds.

17.3% of strains evaluated in the experiment were producers of antimicrobial substances, including various genera: *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Jonesia*, *Microbacterium*, *Nocardiopsis*, *Salinibacterium*, *Streptomyces*, *Cellulosimicrobium*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, and *Rhodococcus*. In the MIC assay, microbial strains able to generate growth inhibition of the type pathogens were detected even in dilutions of 1:4 and 1:8 of the acellular extract. On the other hand, the results obtained in chromatography reveal the preliminary presence of a significant amount of bioactive compounds presence in the analyzed strains (*Cellulosimicrobium funkei* and *Microbacterium hydroxycarborans*), among which were included compounds with antibiotic activity, anticancer and other prominent diseases.

Key words: *Actinobacteria*, Antibiotics, Composting, Bioactive compounds, MIC.

I. Introducción

1-Biotransformación mediante compostaje de residuos orgánicos

La gestión inadecuada de los residuos orgánicos generados en la sociedad actual representa una seria amenaza para el medio ambiente (Neher *et al.*, 2013). Una solución a este problema es la aplicación de labores de reutilización, reciclado y valorización de estos residuos en el proceso de compostaje. Este proceso supone un método sostenible de bioconversión de desechos orgánicos en compost libre de patógenos para usos agrícolas. Al final de este proceso, los microorganismos patógenos son eliminados principalmente como consecuencia del calor generado en la pila, aunque intervienen otros factores como la toxicidad de los productos de conversión, la producción de antibióticos y compuestos volátiles o el antagonismo microbiano (Andrews *et al.*, 1994).

El compostaje por definición es un proceso biooxidativo en el que se produce la transformación biológica de compuestos orgánicos sólidos por humificación parcial y mineralización que genera un producto denominado compost. En este proceso de biodegradación existe una compleja sucesión de poblaciones de microorganismos aeróbicos que incluyen variedad de bacterias, actinobacterias y hongos (Belyaeva *et al.*, 2012).

a) Fases del proceso de compostaje

En el proceso de compostaje se pueden distinguir cuatro fases diferenciadas (**Figura I.I**). Esta separación se establece principalmente por la evolución de la temperatura y otros factores ambientales y nutricionales (Moreno *et al.*, 2013):

Fase mesófila, (10-40 °C): En esta fase predominan bacterias y hongos mesófilos y termotolerantes y se prolonga de 2 a 8 días. Durante esta fase, principalmente se produce la degradación de sustratos solubles y de fácil degradación, lo que conduce a la formación de ácidos orgánicos, descenso del pH y generación de calor, que hace que la temperatura de las pilas se incremente notablemente.

Fase termófila, (40-70 °C): Dominada por bacterias termorresistentes, esporuladas. Se puede observar en esta etapa un predominio de actinobacterias. Pueden encontrarse también hongos termorresistentes y termófilos. Se incrementa la producción de CO₂, H₂O y compuestos inorgánicos como consecuencia de la actividad microbiana. La duración de esta fase puede variar de días a meses, según el material de partida, las condiciones climáticas, la posición geográfica y otros factores. Se caracteriza por un incremento progresivo de pH debido a la metabolización de proteínas y la consiguiente liberación de amoníaco (Sánchez-Monedero *et al.*, 2001). Las bacterias termófilas, así como las mesófilas, actúan sobre la hemicelulosa,

celulosa y lignina, descomponen una variedad importante de compuestos orgánicos y reducen el azufre inorgánico (Laich, 2011).

Fase de enfriamiento, (20-40 °C): En este periodo de varias semanas, la actividad microbiana disminuye debido a la limitación nutricional, ya que la mayor parte de las fuentes carbonadas han sido consumidas en etapas anteriores, aunque continúa la degradación de la materia orgánica polimérica.

Fase de maduración, (temperatura ambiente): En esta fase adquieren protagonismo los hongos mesófilos, procedentes del entorno o supervivientes de la fase termófila (esporas) y la cantidad de bacterias mesófilas disminuye debido a la limitación en la fuente de carbono. También participan protozoos, nematodos y miriápodos que contribuyen a dotar al material de una estructura menos compactada. Esta fase puede durar meses y en ella se producen metabolismos basados en la actividad proteolítica, amonificante, amilolítica y celulolítica (Jurado *et al.*, 2014). Además, se han identificado especies fijadoras libres de nitrógeno, desnitrificantes, y sulfato reductoras. Sin embargo, el principal acontecimiento de la etapa de maduración se basa en la generación de reacciones secundarias de condensación y polimerización de compuestos carbonados para la formación de ácidos húmicos y fúlvicos, que poseen propiedades tampón y mantienen el pH neutro (Moreno y Mormeneo, 2011).

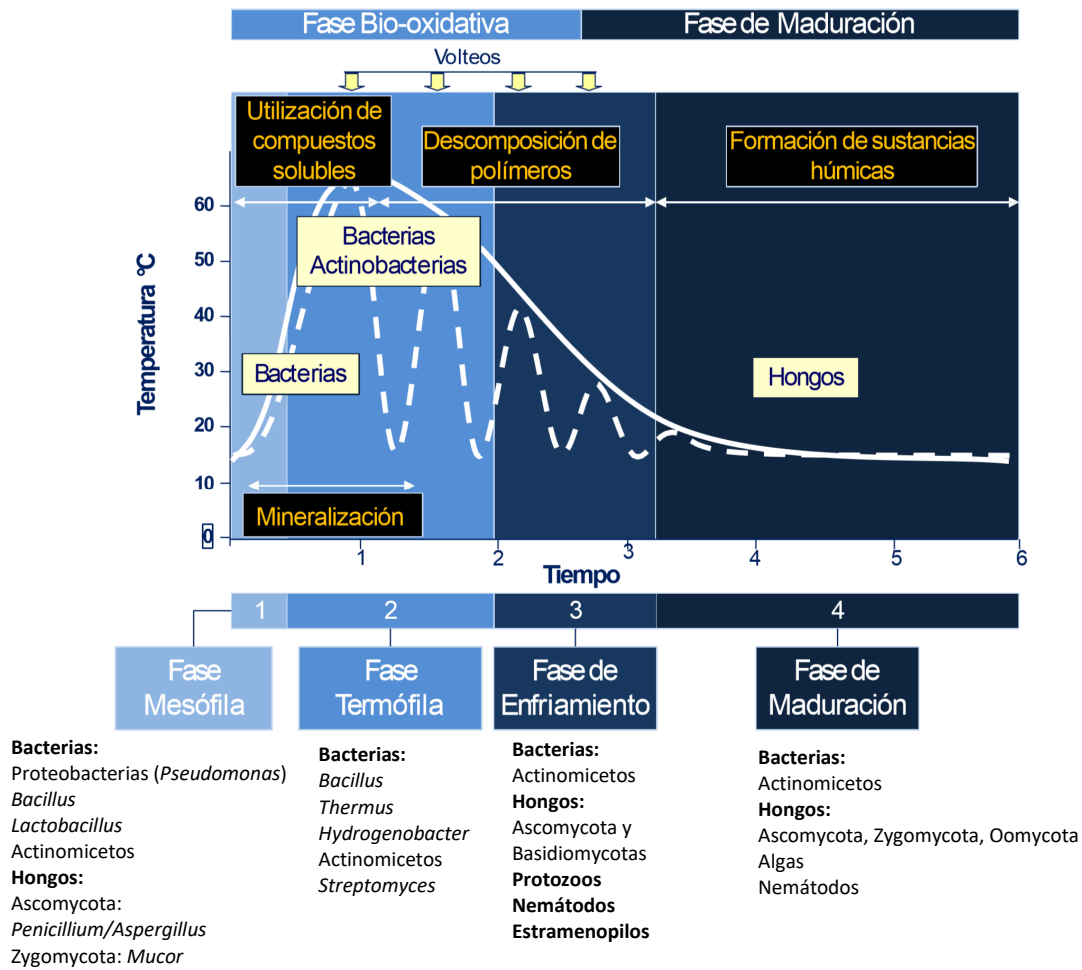


Figura I.I. Fases del proceso de compostaje y sucesión microbiana (Modificado de Moreno y Mormeneo, 2011).

b) Parámetros de control del proceso de compostaje

Durante el proceso de compostaje tienen lugar los mismos acontecimientos que se producen durante la biotransformación de la materia orgánica en ambientes naturales. Lo que distingue realmente al proceso es el control que ejerce el ser humano sobre los factores que lo condicionan, con objeto de incrementar la eficacia de la biotransformación para obtener un producto de mayor calidad en menos tiempo. Hay, por tanto, una serie de factores que deben ajustarse y controlarse de manera adecuada para asegurar el correcto desarrollo del proceso. Se pueden diferenciar dos categorías de parámetros en este sentido. Por un lado, se distinguen aquellos parámetros que sirven para poner de manifiesto la evolución del proceso de biotransformación y, por otro lado, hay que considerar los factores que deben ajustarse de forma precisa para que el compostaje se verifique óptimamente (Jeris y Regan 1973; Moreno y Mormeneo, 2011) (ver **Tabla I.I.**).

Parámetros de seguimiento	Parámetros relativos a la naturaleza del sustrato
<ul style="list-style-type: none"> • pH • aireación • temperatura • humedad 	<ul style="list-style-type: none"> • relación C/N • relación superficie/volumen de las partículas • biodisponibilidad de nutrientes • conductividad eléctrica • composición del material de partida

Tabla I.I. Parámetros de control en el proceso de compostaje.

PARÁMETROS DE SEGUIMIENTO:

Temperatura: Es el parámetro más importante del proceso de compostaje. Siendo la temperatura que se alcanza en el interior de las pilas de compostaje una consecuencia directa del metabolismo aeróbico de los sustratos carbonados por parte de los microorganismos, resulta curioso que el mismo parámetro sirva para controlar la evolución de las diferentes poblaciones microbianas a lo largo del proceso. La temperatura afecta a la viabilidad de comunidades microbianas en cada momento y selecciona la microbiota presente en la pila. Además, es el principal elemento higienizador de la pila, ya que actúa eliminando microorganismos patógenos y semillas de malas hierbas. Se considera que la temperatura es indicador de la magnitud de la biotransformación (Bueno *et al.*, 2008). Existen directrices que indican las temperaturas que han de alcanzarse y el tiempo que deben mantenerse para asegurar la correcta higienización del material a compostar. En este sentido cabe mencionar el documento emitido por la Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos (EPA) que indica que se deben alcanzar los 55 o más °C durante un periodo de 15 días (EPA, 2003).

pH: Inicialmente, el pH se acidifica por formación de ácidos orgánicos como consecuencia del consumo de nutrientes sencillos. Posteriormente, en la fase termófila, el pH se alcaliniza por liberación del amoníaco contenido en proteínas, hasta llegar a un pH neutro en la fase de maduración por la acción tamponante de los compuestos húmicos (Bueno *et al.*, 2008). El valor óptimo se establece en torno a 6-8, ya que los hongos toleran 5,5-8 y las bacterias entre 6 y 7,5. Valores superiores o inferiores a los indicados afectan de manera negativa a la actividad microbiana.

Aireación: Éste es otro parámetro de enorme importancia, ya que, por definición, el compostaje es un proceso de biotransformación aeróbica de la materia orgánica. Es, por tanto, necesario permitir y favorecer el acceso del aire al interior de las pilas. Esto se consigue mediante procedimientos de aireación forzada por succión o presión, o de forma menos complicada, volteando periódicamente las pilas. Con estas operaciones se suele generar un gradiente de oxígeno desde la parte más externa de la pila hacia el interior, hasta el punto de que, en el interior, la concentración de dióxido de carbono es muy alta y la de oxígeno puede estar entre 0,5 y 2%, valores que son claramente limitantes para la verificación del proceso. Una

aireación excesiva puede provocar desecación y enfriamiento. Por el contrario, una aireación insuficiente propiciará reacciones metabólicas microbianas de naturaleza anaeróbica, lo que conducirá a la generación de compuestos responsables de malos olores (Bidlingmaier, 1996; Zhu, 2006).

Humedad: Los valores óptimos de humedad deben oscilar entre 40-60%. Hay que tener presentes que las reacciones bioquímicas tienen lugar en un ambiente acuoso, por tanto, un valor pequeño de humedad comprometerá la actividad microbiana. Por su parte una humedad excesiva puede conducir a condiciones anaeróbicas por saturación de la porosidad. Por otro lado, las variaciones bruscas de humedad provocan grandes cambios de temperatura en el interior de la pila (Makan *et al.*, 2013).

PARÁMETROS RELATIVOS A LA NATURALEZA DEL SUSTRATO:

Relación C/N. La propia composición de las células microbianas determina la proporción en la que los principales nutrientes deben estar asequibles para los microorganismos. En función de cálculos en este sentido, se estima que la relación C/N más apropiada para el desarrollo microbiano ha de situarse en valores en torno a 25-30. Así, en las materias primas iniciales para el compostaje, la relación C/N debería encontrarse en estos valores (Golueke, 1992). Durante el proceso se producen reacciones de mineralización y asimilación (entre otras) que modifican sustancialmente la relación C/N hasta situarla en valores de 8-15 en los productos finales (Moreno y Mormeneo, 2011). Esta relación C/N afecta de forma decisiva a la velocidad y eficiencia del proceso de compostaje. Una proporción C/N mayor de 40, provoca la disminución de la actividad biológica porque los microorganismos deben oxidar el exceso de carbono y hay poco N biodisponible. Sin embargo, si la relación es inferior, el exceso de nitrógeno se convierte en amoníaco o nitratos, generando importantes pérdidas por volatilización y lixiviación (Moreno y Mormeneo, 2011).

Relación superficie/volumen de las partículas: Este parámetro determina la densidad y estructura del material que constituye la pila, pero también influye en el intercambio hídrico y gaseoso. Esta relación no puede ser muy grande ya que se ralentizaría el proceso de biodegradación, ni muy pequeña, ya que induciría compactación y generaría condiciones de anaerobiosis. El tamaño óptimo de partícula según Haug (1993) varía entre 1 y 5 cm.

Biodisponibilidad de nutrientes: C, N, P, S y otros nutrientes, incluyendo ciertos oligoelementos, deben encontrarse biodisponibles para el adecuado funcionamiento de la actividad microbiana. La propia composición de la materia orgánica residual, casi siempre asegura esta biodisponibilidad.

Conductividad eléctrica: Este parámetro tiende a aumentar ligeramente durante el proceso de compostaje debido a la mineralización de la materia orgánica (Brinton *et al.*, 2006).

Composición del material de partida. Según la complejidad de éste, el proceso es más largo si predominan polímeros complejos con alto contenido en lignina o más corto, si se trata de polímeros más sencillos con alta presencia de monómeros fácilmente asimilables.

c) Microbiota implicada en compostaje

Una amplia variedad de microorganismos interviene en el proceso de compostaje, asegurando de esta manera la verificación de diferentes rutas metabólicas de forma simultánea o consecutiva que permiten que este complejo proceso sea posible. La biodiversidad microbiana es característica de cada fase, disminuye al aumentar la temperatura y aumenta al descender la temperatura, por vivificación de formas de reposo tales como esporas de bacterias y hongos o como consecuencia de reinoculaciones externas. Las bacterias son como grupo, las más abundantes, alcanzando el valor del 80-90% de los microorganismos del compost. Además, estas bacterias presentan un amplio espectro metabólico (Laich, 2011). Los diferentes grupos que se pueden distinguir en el compostaje son: bacilos Gram-positivos de la clase *Bacilli*, clostridios, especies del Phylum Bacteroidetes (*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*), Proteobacterias, Actinobacterias y los géneros *Hydrogenobacter* y *Thermus* (Haruta *et al.*, 2005). Respecto a las arqueas, han sido documentadas en el proceso de compostaje las anaerobias productoras de metano (Cahyani *et al.*, 2004). Se muestran con más detalle aquellas arqueas y bacterias implicadas en el compostaje en la **Tabla I.II**.

Dominio Bacteria						
Phylum Proteobacteria						
alfa-proteobacterias						
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Caulobacter</i>	<i>Nitrobacter</i>	<i>Phyllobacterium</i>	<i>Xanthobacter</i>		
<i>Brevundimonas</i>	<i>Methylobacterium</i>	<i>Paracoccus</i>	<i>Rhodovulum</i>			
Beta-proteobacterias						
<i>Achromobacter</i>	<i>Alcaligenes</i>	<i>Comamonas</i>	<i>Nitrosomonas</i>	<i>Variovorax</i>		
<i>Acidovorax</i>	<i>Chromobacterium</i>	<i>Janthinobacterium</i>	<i>Paucimonas</i>			
Gamma-proteobacterias						
<i>Acinetobacter</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Proteus</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Stenotrophomonas</i>
<i>Azotobacter</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Pantoea</i>	<i>Pseudoaltermonas</i>	<i>Serratia</i>	
Phylum Firmicutes						
Bacilli						
<i>Amphibacillus</i>	<i>Brevibacillus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Paenibacillus</i>	<i>Thermoactinomyces</i>		
<i>Bacillus</i>	<i>Caryophanon</i>	<i>Geobacillus</i>	<i>Staphylococcus</i>			
Clostridia						
<i>Clostridium</i>	<i>Desulfotomaculum</i>					
Phylum Bacteroidetes						
<i>Bacteroides</i>	<i>Cytophaga</i>	<i>Chryseobacterium</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Sphingobacterium</i>		
Phylum Actinobacteria						
<i>Actinomyces</i>	<i>Curtobacterium</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Propionibacterium</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Terrabacter</i>	<i>Thermomonospora</i>
<i>Arthrobacter</i>	<i>Kocuria</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Pseudonocardia</i>	<i>Saccharomonospora</i>	<i>Thermobifida</i>	<i>Thermoploispora</i>
<i>Cellulomonas</i>	<i>Microbacterium</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Rathayibacter</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Thermocristipum</i>	<i>Symbiobacterium</i>
<i>Corynebacterium</i>						
Phylum Deinococcus-Thermus						
<i>Thermus</i>						
Phylum aquificae						
<i>Hydrogenobacter</i>						
Dominio Archaea						
<i>Methanothermobacter</i>						

*Clasificación de acuerdo con The Taxonomicon & Systema Naturae 2000 (<http://sn2000.taxonomy.nl/Taxonomicon/>); Brands, S.J. (comp.) 1989-2005. Systema Naturae 2000. The Taxonomicon. Universal Taxonomic Services, Amsterdam, The Netherlands. [<http://sn2000.taxonomy.nl/Taxonomicon/>]

Tabla I.II. Géneros procariotas detectados en compostaje (Ryckeboer *et al.*, 2003).

Los hongos y levaduras encontrados a lo largo el proceso de compostaje pertenecen a las clases Sordariomycetes, Zygomycetes, Sacharomycetes y Ureidiomycetes (López-González *et al.*, 2015). Los principales géneros de hongos del proceso de compostaje son *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Acremonium*, *Mortierella*, *Fusarium*, *Chaetomium* y *Scopulariopsis*. Las levaduras principales que se encuentran pertenecen a los géneros: *Candida*, *Rhodotorula*, *Kluyveromyces*,

Pichia, *Torulopsis* y *Trichosporon* (Ryckeboer *et al.*, 2003). Se muestran con más detalle los géneros eucariotas implicados en el compostaje en la **Tabla I.III**.

Hay que indicar que los microorganismos que se muestran en las **Tablas I.II y I.III** constituyen una recopilación bibliográfica realizada por Ryckeboer *et al.* (2003) a partir de artículos científicos en los que una multitud de autores describían los microorganismos aislados en los procesos de compostaje que habían estudiado. No debe considerarse esta relación como una lista de microorganismos que siempre están presente en todas las pilas de compostaje.

Reino Fungi						
Clase Ascomycetes						
<i>Acremonium</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Eremascus</i>	<i>Hormiscium</i>	<i>Nectria</i>	<i>Preussia</i>	<i>Stibella</i>
<i>Acremonium</i>	<i>Cephalophora</i>	<i>Euratum</i>	<i>Humicola</i>	<i>Neosartorya</i>	<i>Pseudallescheria</i>	<i>Talaromyces</i>
<i>Acrophialophora</i>	<i>Cephalosporium</i>	<i>Eutypella</i>	<i>Hypocrea</i>	<i>Nigrospora</i>	<i>Pseudogymnoascus</i>	<i>Thermoascus</i>
<i>Aleurisma</i>	<i>Chaetomium</i>	<i>Exophiala</i>	<i>Hypomyces</i>	<i>Oedocephalum</i>	<i>Pullularia</i>	<i>Thermomyces</i>
<i>Alternaria</i>	<i>Chrysosporium</i>	<i>Fennellia</i>	<i>Leptographium</i>	<i>Oladiodendron</i>	<i>Rhinocladiella</i>	<i>Thielavia</i>
<i>Aphanascus</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Macrosporium</i>	<i>Oladium</i>	<i>Rollandina</i>	<i>Thielaviopsis</i>
<i>Aplospora</i>	<i>Clonostachys</i>	<i>Gelasinospora</i>	<i>Malbranchea</i>	<i>Oospora</i>	<i>Scedosporium</i>	<i>Thysothra</i>
<i>Arthrinium</i>	<i>Coniothyrium</i>	<i>Geomyces</i>	<i>Melanocarpus</i>	<i>Paecilomyces</i>	<i>Scolecobasidium</i>	<i>Torulopsis</i>
<i>Arthrobotrys</i>	<i>Coenomeria</i>	<i>Geosmithia</i>	<i>Metarhizium</i>	<i>Papulaspora</i>	<i>Scopulariopsis</i>	<i>Trichocladium</i>
<i>Ascodesmis</i>	<i>Corynascus</i>	<i>Gilmaniella</i>	<i>Microascus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Scytalidium</i>	<i>Trichoderma</i>
<i>Ascostricha</i>	<i>Curvularia</i>	<i>Gliobotrys</i>	<i>Mollisia</i>	<i>Peziza</i>	<i>Sepedonium</i>	<i>Trichophaea</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>Cylindrocarpum</i>	<i>Gliocladium</i>	<i>Monilia</i>	<i>Phialemonium</i>	<i>Sordaria</i>	<i>Trichothecium</i>
<i>Aureobasidium</i>	<i>Dactylaria</i>	<i>Gliomastix</i>	<i>Moniliella</i>	<i>Phialophora</i>	<i>Spicaria</i>	<i>Trichurus</i>
<i>Beuveria</i>	<i>Doratomyces</i>	<i>Graphium</i>	<i>Monotropa</i>	<i>Phoma</i>	<i>Sporothrix</i>	<i>Ulocladium</i>
<i>Botryosporium</i>	<i>Emericella</i>	<i>Gymnoascaea</i>	<i>Myceliophthora</i>	<i>Phomopsis</i>	<i>Stachybotrys</i>	<i>Verticillium</i>
<i>Botryotinia</i>	<i>Engyodontium</i>	<i>Harpographium</i>	<i>Mycogone</i>	<i>Pithomyces</i>	<i>Staphylotrichum</i>	<i>Volutella</i>
<i>Botryotrichum</i>	<i>Epicoccum</i>	<i>Heterosporium</i>	<i>Myrothecium</i>	<i>Plectosporium</i>	<i>Stemphylium</i>	<i>Westerdykella</i>
Clase Saccharomycetes						
<i>Candida</i>	<i>Geotrichum</i>	<i>Kluyveromyces</i>	<i>Pichia</i>			
Clase Basidiomycetes						
<i>Agaricus</i>	<i>Coprinus</i>	<i>Lentinus</i>	<i>Mycena</i>	<i>Pleurotus</i>	<i>Sporotrichum</i>	<i>Trametes</i>
<i>Armillaria</i>	<i>Fomes</i>	<i>Lenzites</i>	<i>Panaeolus</i>	<i>Sistotrema</i>	<i>Stereum</i>	<i>Trichosporon</i>
<i>Citopilus</i>	<i>Gloeophyllum</i>					
Clase Urediniomycetes						
<i>Rhodotorula</i>						
Clase Zygomycetes						
<i>Abidia</i>	<i>Circinella</i>	<i>Mortierella</i>	<i>Piptocephalis</i>	<i>Rhizopus</i>	<i>Syncephalastrum</i>	<i>Zygorhynchus</i>
<i>Actinomyces</i>	<i>Cunninghamella</i>	<i>Mucor</i>	<i>Rhizomucor</i>	<i>Stylopaga</i>	<i>Syncephala</i>	
Reino Chromista						
Clase Oomycetes						
<i>Pythium</i>						

*Clasificación de acuerdo con "Catalogue of Life 2005" (http://annual.sp2000.org/2005/info_about_col.php). Species 2000 and the Integrated Taxonomic Information System (ITIS).

Tabla I.III. Géneros eucariotas microbianos implicados en el compostaje (Ryckeboer *et al.*, 2003).

2-Producción de antimicrobianos naturales: antibióticos

a) Mecanismos de acción de los antibióticos

Los agentes antimicrobianos denominados antibióticos son sustancias naturales que matan o inhiben el crecimiento de los microorganismos, es decir, poseen propiedades antibióticas o citotóxicas. En el caso de los que son producidos por bacterias, se excretan al final de la fase exponencial de crecimiento como metabolitos secundarios (Ruiz *et al.*, 2010). Los fármacos antimicrobianos se pueden clasificar según su estructura molecular, mecanismo de acción, efecto antimicrobiano (bactericida, bacteriostático y bacteriolítico) y espectro de actividad antimicrobiana (**Figura I.II**). Además, éstos pueden ser naturales o semisintéticos (Bérdy, 2005). La generación de antibióticos se puede ver inducida por la presencia de competidores y los compuestos son frecuentemente inhibidores solo de grupos particulares de bacterias. Adicionalmente, se han elaborado estudios que confirman que las bacterias tienen

más probabilidades de inhibir, mediante los antibióticos que producen, a las cepas aisladas del mismo entorno en el que ellas se encuentran, (Gallagher, 2015).

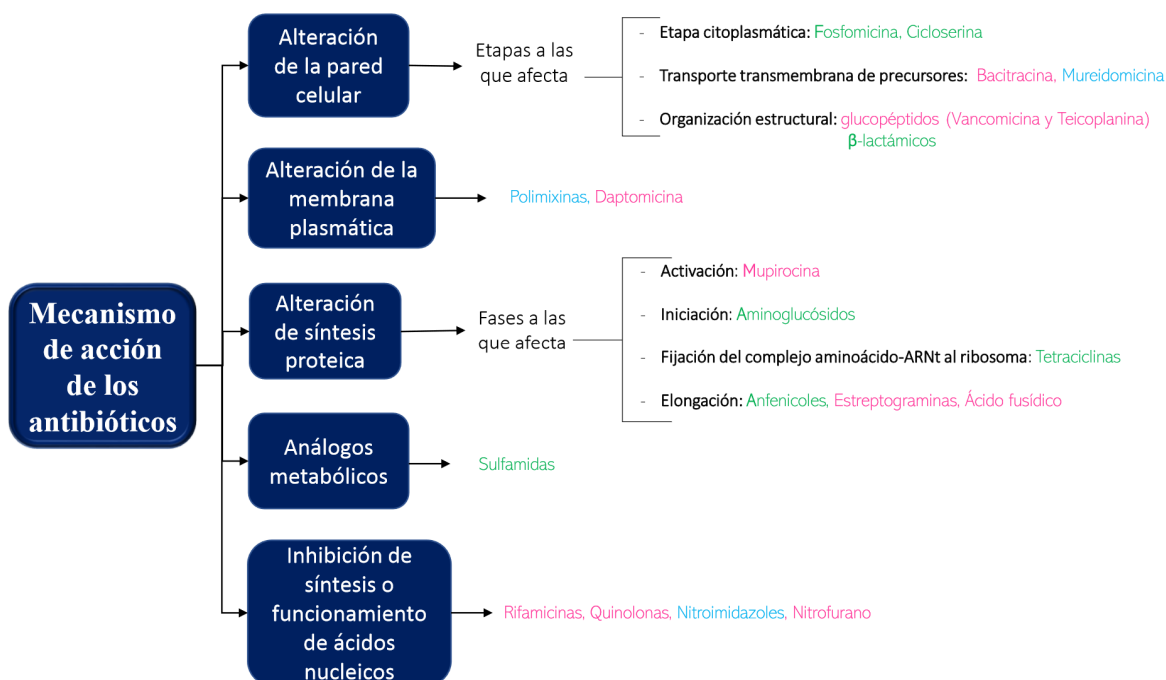


Figura I.II. Mecanismo de acción de los antibióticos. En verde aparecen aquellos antibióticos de amplio espectro, en azul lo que resultan más efectivos frente a bacterias Gram-negativas y en rosa aquellos más eficaces contra bacterias Gram-positivas.

Los mecanismos de acción de los antibióticos son variados y dependen de las moléculas o estructuras celulares diana. Principalmente afectan a diferentes componentes de las bacterias:

✚ **PARED CELULAR.** No es una estructura vital para las células bacterianas, pero su presencia confiere a la bacteria importantes capacidades. El grupo de antibióticos que actúa sobre la pared celular puede provocar la lisis de la misma, con la consiguiente pérdida de viabilidad para la bacteria. Dado que las bacterias Gram-positivas poseen una mayor proporción de los componentes diana de estos antibióticos, se puede afirmar que los Gram-Positivos son más sensibles a ellos que los Gram-Negativos, que también lo son, pero en menor proporción. Por otro lado, ya que las células eucariotas (entre ellas, las células del ser humano) no poseen pared celular, estos antibióticos poseen la principal característica deseable en un antibiótico, la toxicidad selectiva. (Calvo y Martínez-Martínez, 2009).

Puede afectar a diferentes etapas de la síntesis de la pared celular:

– Etapa citoplasmática:

La Fosfomicina es un antibiótico de amplio espectro que actúa inhibiendo la piruviltransferasa, enzima responsable de la adición de fosfoenolpiruvato a la molécula de UDP-NAG para formar el precursor UDP-NAM (**Figura I.III**). También destaca como

antibiótico de amplio espectro la Cicloserina que inhibe la actividad de L-alanina-racemasa y la D-alanil-alanina-sintetasa (Donald y McIlleron, 2009).

– Transporte de sus precursores a través de la membrana:

La Bacitracina se une al transportador (Bactoprenol-P) e impide su desfosforilación (**Figura I.III**). Es activo contra bacterias Gram-positivas. Las Mureidomicinas son producidas por *Streptomyces flavidivirens* y se unen competitivamente al transportador lipídico. Son muy activas frente a *Pseudomonas aeruginosa*, pero aún no se han aplicado clínicamente (Calvo y Martínez-Martínez, 2009).

– Organización estructural: En esta fase, los precursores del peptidoglucano se ensamblan con la ayuda de enzimas situadas en la superficie, conocidas como proteínas de unión a Penicilinas (PBPs: Penicillin Binding Proteins). Los glucopéptidos (Vancomicina y Teicoplanina) evitan la transferencia del disacárido pentapéptido, unido al transportador lipídico de la membrana citoplasmática al receptor de la pared celular (**Figura I.III**). El elevado tamaño de estas moléculas impide su paso a través de la pared de las bacterias Gram-negativas, de manera, que solo tienen efecto frente a Gram-positivas (incluyendo en varias cepas multirresistentes) (Allen y Nicas, 2003). Los β -lactámicos incluyen Penicilinas, Cefalosporinas, Monobactamas y Carbapenemas. Poseen acción bactericida que inhibe las fases finales de la síntesis del peptidoglucano, en las que tiene lugar las actividades transpeptidasa, transglucosilasa y carboxipeptidasa. Los antibióticos β -lactámicos poseen un amplio espectro que abarca las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, pero no son activos frente a micoplasmas por carecer estas bacterias de pared celular. Tampoco son efectivos frente a bacterias que actúan como parásitos intracelulares (Suárez y Gudíol, 2009).

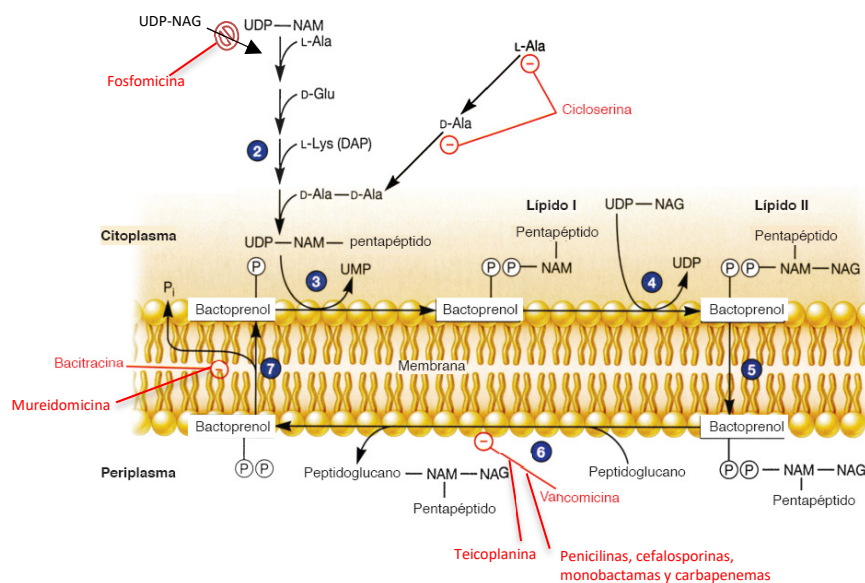


Figura I.III. Antibióticos que afectan a la síntesis de pared celular (Modificado de Ryan y Ray, 2017).

✚ **MEMBRANA PLASMÁTICA.** Si ésta se ve alterada, se modifica la permeabilidad, lo que provoca salida o entrada de iones. Estos antimicrobianos son bactericidas y poseen una alta toxicidad para el ser humano, ya que las membranas celulares de los eucariotas son muy parecidas a las de las bacterias. Las Polimixinas están formadas por un ácido graso unido a un péptido e interactúan con la membrana desorganizándola. Son activas exclusivamente frente a bacilos Gram-negativos aerobios, algunos de ellos multirresistentes (Molina *et al.*, 2009). Por otra parte, la Daptomicina actúa únicamente sobre la membrana de Gram-positivas despolarizándola (Gonzalez-Ruiz *et al.*, 2016).

✚ **SÍNTESIS PROTEICA.** Pueden verse afectadas las fases de:

– Activación:

La Mupirocina es un antibiótico bacteriostático, que inhibe de manera competitiva la enzima isoleucil-ARNt sintetasa. Es muy efectiva frente a Gram-positivos y posee leve efecto sobre Gram-negativos (Wertheim *et al.*, 2005).

– Iniciación:

Los Aminoglucósidos son antibióticos de efecto bactericida producidos por actinomicetos del suelo. Su diana está en los ribosomas y los procesos de síntesis proteica. Poseen carga positiva que desestructura la membrana externa (de Gram-negativos) y permite el paso del antibiótico. Atraviesa el peptidoglicano de Gram-positivos y Gram-negativos con consumo de energía (transporte activo) y finalmente actúa en los ribosomas provocando errores en la lectura del ARNm, generándose proteínas anómalas. Posee efecto frente a microorganismos Gram-negativos aerobios.

– Fijación del complejo aminoácido-ARNt al ribosoma:

Las Tetraciclinas son antimicrobianos que se transportan al citoplasma por un proceso dependiente de energía y se unen reversiblemente a la subunidad 30S del ribosoma (procariótico), bloqueando el acceso de los complejos aminoacil-ARN-t e impidiendo la continuación de la síntesis de proteínas. Son los antibióticos de mayor amplio espectro de actuación.

– Elongación:

Los Anfenicoles son antibióticos bacteriostáticos que bloquean la síntesis proteica bacteriana, ya que se unen reversiblemente a la subunidad 50S. Tiene un amplio espectro de actividad contra microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos (Calvo y Martínez-Martínez, 2009). Las Estreptograminas son antimicrobianos que bloquean la acción de la peptidiltransferasa. Su actividad fundamental se manifiesta frente a bacterias Gram-positivas, aunque también actúa frente a Gram-negativos anaerobios y otros tipos de bacterias. El Ácido Fusídico es un antibiótico que se une al complejo

causante de la translocación e impide la liberación del factor de elongación G para la nueva translocación. Solo es efectivo frente a bacterias Gram-positivas.

- ✚ **ANÁLOGOS METABÓLICOS.** Las Sulfamidas y Diaminopirimidinas son antibióticos de amplio espectro, que compiten por la enzima dihidropteroatosintetasa, impidiendo así la formación de ácido dihidropteroico, precursor del ácido fólico, un metabolito básico para la síntesis de ácidos nucleicos. Estos compuestos presentan una analogía estructural con metabolitos esenciales para la célula. Su inclusión en las rutas metabólicas correspondientes, en lugar del verdadero metabolito, ocasiona un mal funcionamiento de la ruta que conduce a la pérdida irreversible de la viabilidad.
- ✚ **METABOLISMO DE ÁCIDOS NUCLEICOS.** Puede verse afectado a nivel de la ARN polimerasa dependiente de ADN (Rifamicinas) o en el proceso de enrollamiento/desenrollamiento del ADN (Quinolonas). Algunos compuestos afectan directamente al ADN (Nitroimidazoles, Nitrofuranos). En general son más activos frente a Gram-positivos (excepto Nitroimidazoles, que son más activos frente a Gram-negativos) Presentan una alta toxicidad para el ser humano (Calvo y Martínez-Martínez, 2009).
- ✚ **VÍAS DE RESISTENCIA.** Existen antimicrobianos que bloquean resistencias que han ido apareciendo en bacterias frente a determinados antibióticos. Una de las resistencias más extendida es la que se presenta en ciertas bacterias que han desarrollado sistemas enzimáticos capaces de romper el anillo β -lactámico presente en Penicilinas y Cefalosporinas. Estas enzimas se conocen como β -lactamasas y su presencia en una bacteria inutiliza el uso de esta clase de antibióticos. El primer inhibidor de las β -lactamasas que se empleó fue el Ácido Clavulánico. Hoy día hay disponibles algunos más de estos compuestos. Así, por ejemplo, el Sulbactam se une irreversiblemente a esta enzima y la bloquea de manera que la bacteria es susceptible a los antibióticos β -lactámicos. Se suelen usar en combinación con ellos. Así, mezclas de Amoxicilina (un β -lactámico de amplio espectro y Ácido Clavulánico o Sulbactam son los principios activos de fármacos ampliamente utilizados en la actualidad (Augmentine®, por ejemplo).

La Farmacología Clínica Antimicrobiana aconseja el uso de antibióticos que presentan acción selectiva sobre un grupo concreto de microorganismos y, al mismo tiempo poseen toxicidad selectiva (Gallagher, 2015). En principio, solo los antibióticos que actúan sobre la pared celular bacteriana son adecuados en este sentido. Obviamente, se emplean también en la práctica otros antibióticos cuyos posibles efectos secundarios sobre el ser humano son escasos o están muy bien controlados.

b) Antibióticos producidos por actinobacterias

Una amplia variedad de antibióticos distintos se ha aislado de cultivos de actinomicetos (Mahajan y Balachandran, 2012). El espectro de sustancias antimicrobianas producidas por los actinomicetos es muy amplio, tanto, que aún son desconocidos muchos de los compuestos antimicrobianos producidos por éstos. Las estructuras de los antibióticos producidos por actinomicetos también resultan muy variadas: macrólidos, aminoglicósidos, pirroles, terpenoides, lipopéptidos, lincosamidas, análogos y conjugados de moléculas, ésteres, piranos, pirimidinas, quinonas, etc. Estos compuestos, más allá de ser compuestos antimicrobianos, pueden presentar también propiedades anticancerígenas, citotóxicas, antiinflamatorias, antiparasitarias, antifúngicas y anti-víricas (Manivasagan *et al.*, 2014). Entre estos compuestos cabe destacar Marinomicina producida por *Marinispora* sp. con efecto antibacteriano, antifúngico y anticancerígeno (Kwon *et al.*, 2006). La Tirandamicina es producida por *Streptomyces* sp. con actividad antibacteriana, antiparasitaria, antifúngica, y anti-VIH (Carlson *et al.*, 2009). Además, la Bonacticina, también es producida por *Streptomyces* sp. y posee propiedades antifúngicas y antibacterianas (Schumacher *et al.*, 2003). Por otra parte, algunos de estos antibióticos aún no son usados clínicamente y presentan un gran potencial en su uso frente a bacterias resistentes a los antibióticos actuales. Entre éstos, cabe destacar las Linamicinas de *Marinispora* sp. que resultan eficaces frente a *S. aureus* resistentes a Meticilina y *Enterococcus faecium* resistentes a Vacomicina (Manivasagan *et al.*, 2014). Adicionalmente, se han empleado otros antibióticos útiles para combatir a cepas resistentes, entre los que destacan la Ciclomazina producida por *Salinispora arenicola* CNS205 (Kossuga, 2008), Marinomicina y Linamicina producidas por *Marinispora* sp. (Cruz-López, 2015) u otros como la Pseudouridimicina que resulta efectiva frente a diferentes bacterias multirresistentes (Donadio *et al.*, 2017).

Streptomyces destaca sobre los demás géneros de actinomicetos por su gran potencial antimicrobiano, siendo algunas de las especies productoras de múltiples antibióticos. Entre los antibióticos que produce se pueden mencionar: Novobiocina, Lajollamicina, Lincomicina, Nafterpin, Neomarinona, Ciclomarina, Éter de fenazina, Nitropirrolín, Lavanducianín, Marinona, Azamerona, Fumaquinona, Endofenazina, Fenolinlactona, Gliacilpirroles, Oxaloterpin, 5-dimetil-alíndole-3-ácido carboxílico, JBIR-46, Bisatraquinona, Gutigimicina, Tirandamicina, 1,4-dihidroxi-2-(3-hidroxibutil)-9,10-antraquinona-9,10-antrac, Bonaticina, Dihidroquinonas cloradas, Frigociclinona, Esrramicina, Estreptomina, Anisomicina, Carboximicina, Komodoquinona A, Prenilata pirrol glaciapirrol, Himalocina, Gliaciapirroles A, B y C, Marinopirroles, Etamicina, 1-hidroxi-1-norresistomicina, Caboxamicina, Bisatraquinonas, 6-dimetil-alíndole, etc. (Mahajan y Balachandran, 2012; Manivasagan *et al.*, 2014, Quintero *et al.*, 2018) (ver **Tabla A.I.** del **Anexo**).

2-Problemática asociada al empleo de antibióticos

a) Mecanismos de resistencia

El mal uso de los antibióticos está desencadenando un problema emergente de nuestro siglo, la resistencia microbiana a los antibióticos. La evolución de los antibióticos ha ido acompañada de la evolución de las bacterias, que han adquirido resistencia a muchos de los antibióticos más usados, con una mayor incidencia en los países desarrollados. A nivel mundial, más de 0,7 millones de personas mueren cada año por infecciones de bacterias resistentes y se estima que 10 millones de personas morirán de infecciones resistentes a los antimicrobianos en 2050 (Hwang y Yoon, 2019).

Las diferentes variantes de bacterias resistentes a antibióticos surgen por mutación espontánea y su propagación depende de factores selectivos en el ambiente (Gould, 1957). Estas resistencias se suelen encontrar codificadas en plásmidos transmisibles por conjugación y en plásmidos no conjugativos, pero movilizables (Andrews *et al.*, 1994). La propagación de genes de resistencia transmitidos por plásmidos, tales como *mcr1*, *kpc*, *blaNDM1* puede producirse por transferencia horizontal, proporcionando resistencia frente a antibióticos tales como: las familias de β -lactámicos, como son Penicilinas, Cefalosporinas y Carbapenemas, Quinolonas, como la Ciprofloxacina, y un antibiótico de último recurso, como la Colistina (Sun *et al.*, 2016).

La hipótesis que elaboraron Benveniste y Davies en 1973 sugiere que la resistencia a antibióticos surge en microorganismos ambientales no asociados con los humanos. Por otro lado, ciertos análisis genómicos han demostrado que la resistencia es una respuesta "constitutiva", en la que se expresan los genes responsables de la resistencia, incluso en ausencia de antibiótico (Hwang y Yoon, 2019).

Entre los diferentes mecanismos de resistencia (**Figura I.IV**) cabe destacar:

1- La **inactivación del antibiótico** mediante la degradación enzimática o la modificación del antibiótico, que lo hace ineficaz. Éste es el caso de las cloranfenicol acetiltransferasas (Shaw *et al.*, 1979), las enzimas inactivadoras de Tetraciclinas (Yang *et al.*, 2004) y las β -lactamasas (Neu, 1969). Estas últimas no solo permiten inactivar el antibiótico, sino que el antibiótico degradado es utilizado como nutriente (Schofield, 2018).

2- Una segunda estrategia es la **protección, alteración o sobreexpresión de la diana del antibiótico** (Crofts *et al.*, 2017).

3- Dos mecanismos de resistencia adicionales consisten en **mantener el antibiótico fuera de la célula bacteriana** ya sea activando el flujo de salida o alterando la permeabilidad de la membrana celular. Las bacterias pueden mantener una mínima concentración intracelular del

antibiótico, que no ejercería su efecto antimicrobiano expresando un sistema de bombeo no selectivo de salida de ciertos compuestos (Piddock *et al.*, 2006) o sintetizando un exportador específico de antibióticos como los sistemas de bombeo de tetraciclinas (Roberts, 1996).

4- Alternativamente, algunas bacterias **reducen la permeabilidad de su membrana citoplasmática o de la pared celular** para evitar que los antibióticos entren en la célula al disminuir, por ejemplo, la expresión de una determinada porina o al expresar una variante más selectiva (Babouee *et al.*, 2016).

En algunos casos, las bacterias utilizarán varios mecanismos complementarios para lograr altos niveles de resistencia (Nicoloff *et al.*, 2019).

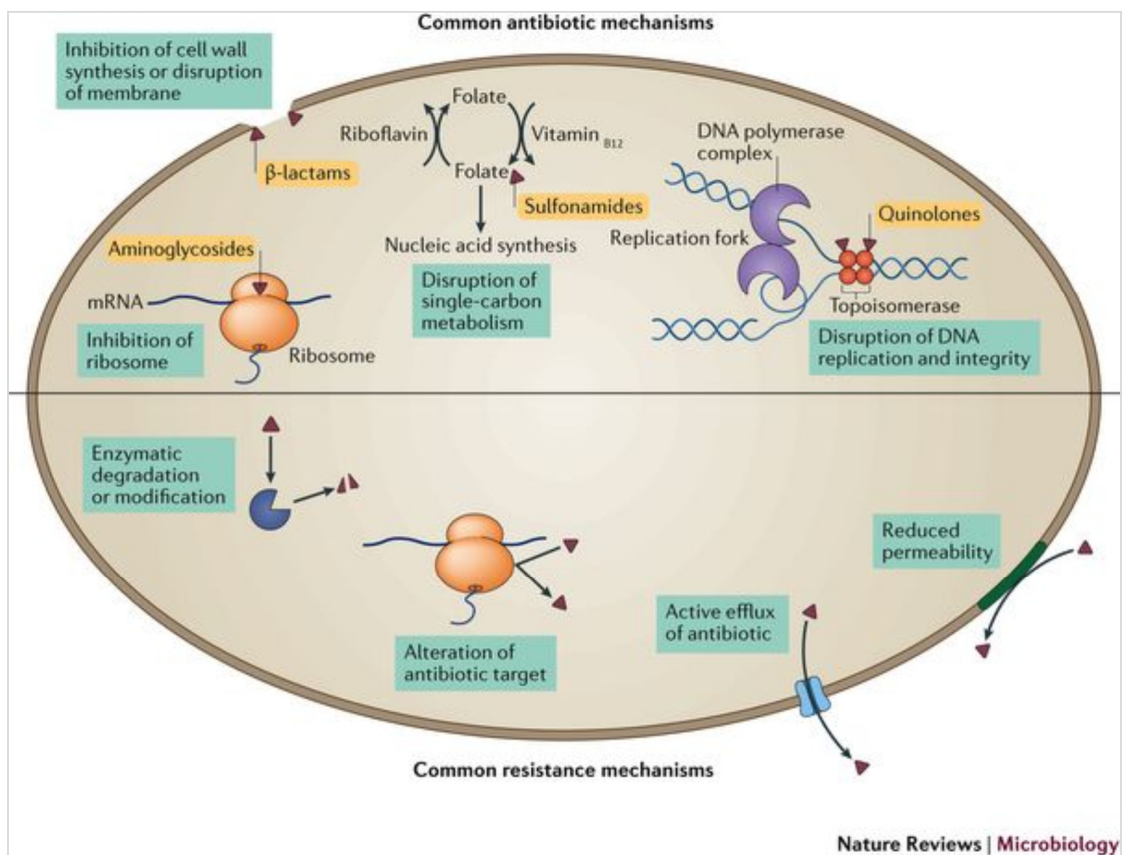


Figura I.IV. Mecanismos de resistencia (Crofts *et al.*, 2017).

b) Agentes patógenos resistentes a los antibióticos

Los patógenos resistentes suelen encontrarse en hospitales, causando infecciones nosocomiales, aunque también se pueden presentar en ambientes naturales (Gould, 1957). Algunos ejemplos de bacterias resistentes son:

- *Pseudomonas* spp. resistentes a Ampicilina, Cloranfenicol, Tetraciclina y Penicilina (Andrews *et al.*, 1994).

- *Streptococcus pyogenes* resistente a Penicilina.
- *Escherichia coli* con alto porcentaje de resistencias. Un estudio del Hospital de Barbastro (Huesca) encontró resistencias principalmente frente a Trimetoprim-sulfametoxazol, Ciprofloxacino y Ampicilina. Menores índices de resistencia fueron encontrados frente a Fosfomicina, Nitrofurantoína, y Cefalosporinas de segunda y tercera generación (Betrán *et al.*, 2015).
- Enterococos resistentes a la Vancomicina que modifican la afinidad del antibiótico (Crofts *et al.*, 2017).
- *Staphylococcus aureus* resistente a la Meticilina y con susceptibilidad reducida a Vancomicina. La bacteria expresa una variante redundante de la PBP (Penicillin Binding Protein) nativa que es insensible a la Meticilina (Katayama *et al.*, 2000).
- *Shyella* spp. multirresistente con alta resistencia frente a Ampicilina, Cotrimoxazol, Tetraciclina y Ácido nalidíxico y menor grado de resistencia frente a Norfloxacin y Ciprofloxacina (Niyogi y Pazhani, 2003).
- *Salmonella* resistente a Quinolona, Cefalosporina o multirresistente. Surge principalmente en animales de industrias cárnicas a los que se les suministran estos antibióticos (WHO, 2011).
- *Pseudomonas aeruginosa* con resistencia intrínseca a los antibióticos: debido a la presencia de bombas de eflujo que secuestran físicamente los antibióticos que penetran o por biopelículas protectoras (Hwang y Yoon, 2019).
- *Enterobacter cloacae* resistente al Carbapenem sin carbapenemasa: se produce por combinación de mutaciones en porinas que disminuyen la captación de Carbapenem y aumentan la expresión de una β -lactamasa no carbapenémica cromosómica (Babouee *et al.*, 2016).
- *Clostridium difficile* posee un genoma con un 11% de elementos móviles entre los que se encuentran genes de resistencia a antibióticos, existiendo cepas multirresistentes que suponen una gran problemática. Entre los antibióticos a los que es resistente, se encuentran: Tetraciclina, Eritromicina, Daunorubicina, Bacitracina, Nogalmicina y β -lactámicos (Sebahia *et al.*, 2006).

Puede ser que, en determinados casos, no se detecten algunas resistencias por su dificultad de identificación en estafilococos, miembros de la familia Enterobacteriaceae y en ciertas bacterias anaeróbicas. Existe un grupo de bacterias resistentes clasificadas según su

peligrosidad de acuerdo con los criterios de la OMS y son de gran importancia, ya que existe una gran investigación para la búsqueda de antibióticos a los que sean susceptibles (WHO, 2017) (**Figura I.V.**).

Prioridad 1: CRÍTICA

- *Acinetobacter baumannii*, resistente a los carbapenémicos
- *Pseudomonas aeruginosa*, resistente a los carbapenémicos
- Enterobacteriaceae, resistentes a los carbapenémicos, productoras de ESBL

Prioridad 2: ELEVADA

- *Enterococcus faecium*, resistente a la vancomicina
- *Staphylococcus aureus*, resistente a la meticilina, con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina
- *Helicobacter pylori*, resistente a la claritromicina
- *Campylobacter* spp., resistente a las fluoroquinolonas
- *Salmonellae*, resistentes a las fluoroquinolonas
- *Neisseria gonorrhoeae*, resistente a la cefalosporina, resistente a las fluoroquinolonas

Prioridad 3: MEDIA

- *Streptococcus pneumoniae*, sin sensibilidad a la penicilina
- *Haemophilus influenzae*, resistente a la ampicilina
- *Shigella* spp., resistente a las fluoroquinolonas

Figura I.V. Lista de patógenos prioritarios para la I+D de nuevos antibióticos (WHO, 2017).

c) Prevención de resistencias

Existen varias causas que nos han llevado a esta situación de crecientes resistencias antimicrobianas, destacando entre las primeras la incorrecta administración de antibióticos. El número de pacientes que tienden a abandonar el tratamiento antimicrobiano antes del final de su dosis es muy elevado, lo que provoca que no todas las bacterias se eliminen y exista la posibilidad de que bacterias que han adquirido resistencia se multipliquen y generen una enfermedad fatal si no se trata con una dosis mayor de antibiótico o antibióticos más potentes (WHO, 2014). Además, existe un importante grupo de personas que se automedican o reciben antibióticos con enfermedades virales u otro tipo de patologías sin origen bacteriano, lo que contribuye también a la creación de resistencias.

Otra de las causas es el incremento de la presencia de antimicrobianos en la industria cárnica (**Figura I.VI.**) y agroalimentaria. Los antibióticos son usados de manera indiscriminada para evitar enfermedades, promover el crecimiento y aumentar el rendimiento de las explotaciones agropecuarias. Los antibióticos usados con esta finalidad generan resistencias con mayor tasa de éxito, debido a su aplicación masiva, dando lugar a la aparición de cepas resistentes que pueden llegar a afectar al ser humano (WHO, 2011).

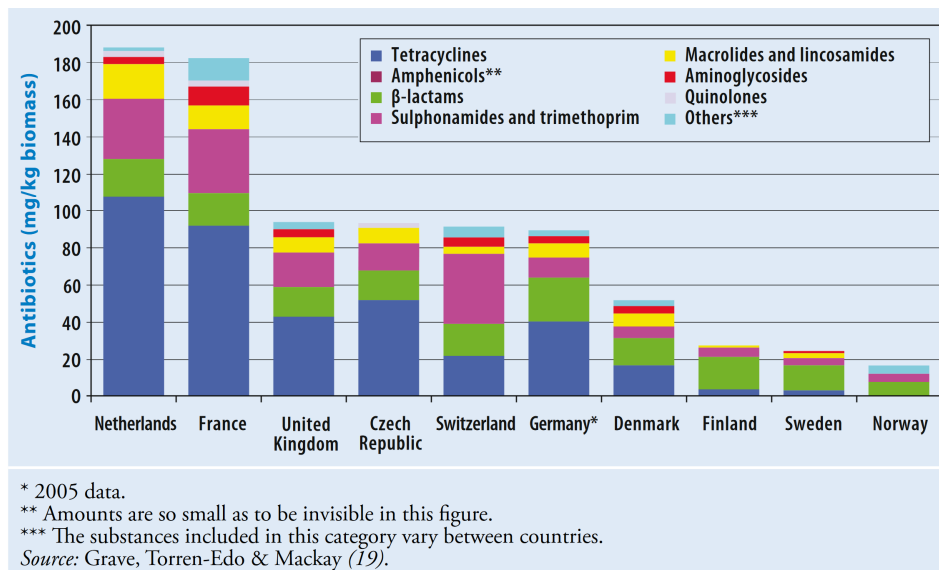


Figura I.VI. Cantidades de antibióticos veterinarios vendidos en 2007 por kg de biomasa de carne de cerdo, carne de ave y carne de ganado producida, más el peso en vivo estimado del ganado lechero (WHO, 2011).

Para hacer frente al auge de resistencias a antibióticos, será necesario el uso de nuevos antibióticos y la correcta regulación de su administración; pero, además, será clave la vigilancia de la resistencia a los antibióticos con herramientas avanzadas de metagenómica y secuenciación. Desde un enfoque genético, los genes de resistencia a los antibióticos pueden proporcionar información respecto a la probabilidad de transferencia horizontal de genes pasada o futura; además, el estudio del resistoma puede servir para vigilar los puntos de resistencia a los antibióticos y detectar amenazas de resistencia emergentes antes de su propagación (Crofts *et al.*, 2017). Se puede poner solución a esta situación por diferentes métodos:

- 1- Una forma de abordar el problema del incremento de resistencias puede ser la **utilización de los antibióticos existentes en combinaciones sinérgicas**, de manera que se eliminaría simultáneamente a diferentes bacterias y se suprimiría la evolución de una mayor resistencia. Un ejemplo de esta estrategia podría ser la combinación de diferentes β -lactámicos para hacer frente a *S. aureus* resistente a Meticilina (Gonzales *et al.*, 2015).
- 2- Otra de las estrategias que se contempla es el **uso de coadyuvantes**, que carecen de actividad antibiótica, pero aumentan la eficacia de la terapia con antibióticos (Wright, 2016). Entre éstos se incluyen los inhibidores de las β -lactamasas (Ácido Clavulánico, Sulbactam...).
- 3- Además, una estrategia efectiva es la **combinación de antibióticos con medicamentos empleados para otras finalidades**. Destacan la Loperamida, un agonista del receptor de opioides, que se usa como antidiarréico y que,

adicionalmente, facilita la captación de Tetraciclina; y el antagonista del receptor del ADP-ticlopidina (que es un antiagregante plaquetario), que adicionalmente inhibe la biosíntesis de los ácidos teicoicos (Ejim *et al.*, 2011; Brown y Wright, 2016).

- 4- Una estrategia en auge hoy en día y la que constituye el objeto de estudio de este trabajo es la **búsqueda de nuevos antibióticos**, frente a los que aún no existen resistencias. Aquellos antibióticos que aún no se han empleado clínicamente son un arma antibacteriana muy potente para hacer frente a bacterias resistentes a determinados antibióticos.
- 5- Aplicación de la técnica **CRISPR/cas9, para provocar el silenciamiento de genes asociados a la resistencia** antibiótica (Bikard y Barrangou, 2017).
- 6- Finalmente, cabe destacar la **fagoterapia** como una terapia novedosa en la lucha frente a bacterias. Esta técnica consiste en el uso de virus (bacteriófagos) que infectan bacterias y llevan a cabo un ciclo lítico que finaliza con la lisis bacteriana. La variabilidad de bacterias que son capaces de parasitar es muy amplia, se estima que infectan más de 140 géneros bacterianos (Reina y Reina, 2018). Esta terapia podría ser la solución en el caso de aparición de bacterias resistentes tras un tratamiento con antibióticos. Presenta una gran importancia por su eficacia y selectividad, que ha sido demostrada en tratamientos frente *E. coli* multirresistentes (Lu y Koeris, 2011) y *P. aeruginosa* resistente a Imipenem (Brüssow, 2017), entre otros. Adicionalmente, no presenta el problema de generar las resistencias que generan los antibióticos, ya que el mecanismo de acción es diferente. A pesar de sus ventajas, todavía son varios los problemas que presentan, entre los que se incluyen la baja estabilidad, la fecha de caducidad a corto plazo de estos preparados y el coste de su producción, así como el rechazo generado por el sistema inmunológico del paciente a este tipo de estructuras. Otro problema puede suponer la transferencia de genes al microbiota humano que podría ser evitada sustituyendo los virus por bacteriocinas (compuestos liberados por bacterias que llevan plásmidos bacteriocinogénicos), aunque esto podría generar toxicidad u otros problemas. Además, se presenta la posibilidad de que se genere adaptación bacteriana a los fagos (Krylov, 2001). Ya se detectaron resistencias a bacteriófagos en el caso bacterias con sistema CRISPR/Cas, que actúa como sistema inmune adaptativo (Horvarth y Barrangou, 2010), por lo que no se debe descartar la posibilidad de adaptación ante cualquiera de las armas bactericidas actuales.

Solo existen soluciones a corto plazo porque la resistencia bacteriana a la larga gana la carrera a todas las estrategias que se plantean. Este reto implica la necesidad de una continua investigación e innovación en los tratamientos más que la búsqueda de una solución definitiva.

II. Objetivos

El interés de este trabajo de investigación nace en el seno del conjunto de actuaciones que desarrolla el grupo de investigación BIO-175 (Desarrollo de técnicas microbiológicas para mejora de suelos de interés agrícola) en la actualidad. Además, es consecuencia de la disponibilidad de una amplia colección de cepas (1380 cepas) constituida por microorganismos aislados de procesos de compostaje, investigados en el Proyecto AGL2009-08405 del Ministerio de Economía y Competitividad. El Phylum con mayor número de especies de la colección es *Actinobacteria*, un grupo microbiano de enorme versatilidad metabólica, empleado desde hace décadas como fuente de producción de antibióticos de gran interés. Por lo tanto, resulta de especial relevancia el estudio de esta numerosa colección de aislados respecto a las posibles capacidades antimicrobianas que desarrollan.

El objetivo principal de este trabajo fue la detección y evaluación de la producción de sustancias de carácter antimicrobiano por actinobacterias aisladas en procesos de compostaje de restos lignocelulósicos.

Para la consecución de dicho objetivo principal, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- 1- Rastrear mediante ensayos *in vitro* la producción de sustancias antimicrobianas eficaces para el control de patógenos humanos entre aislados de actinobacterias procedentes de pilas de compostaje.
- 2- Evaluar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en extractos acelulares de las actinobacterias productoras de sustancias antimicrobianas frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.
- 3- Detectar a nivel molecular entre los compuestos presentes en extractos acelulares de las cepas seleccionadas antibióticos u otros compuestos de interés clínico mediante técnicas cromatográficas.

III. Materiales y Métodos

1-Diseño experimental

Los experimentos realizados en el presente trabajo siguieron el patrón descrito en la **Figura III.I:**

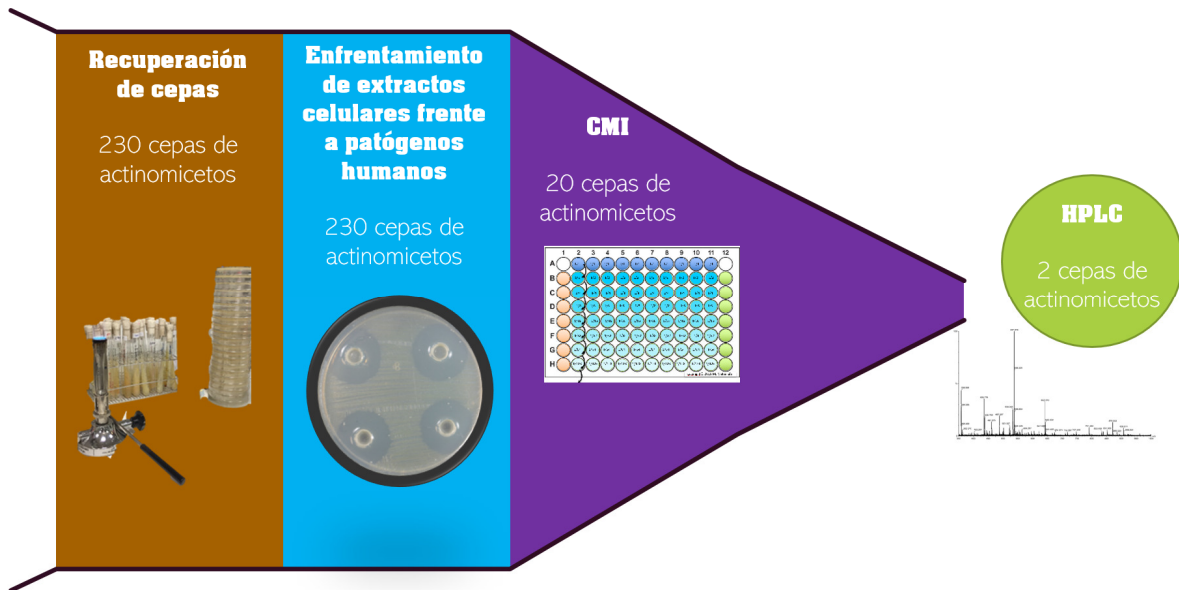


Figura III.I. Diseño experimental de la metodología llevado a cabo en este trabajo.

2-Microorganismos del ensayo

a) Actinomicetos

En este estudio se emplearon los 230 actinomicetos seleccionados de una colección de 1380 cepas obtenidas del proceso de compostaje de restos lignocelulósicos (López-González *et al.*, 2013) y posteriormente identificadas. Estas bacterias se obtuvieron por el grupo de investigación BIO-175 y pertenecen al Área de Microbiología de la Universidad de Almería. Además, esta colección fue usada para estudio de actividades enzimáticas (Jurado *et al.*, 2014) y ensayos de antagonismo contra fitopatógenos (Sánchez San Fulgencio *et al.*, 2018).

Se compone la colección de un conjunto de actinobacterias pertenecientes a los siguientes géneros: *Brevibacterium*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Cellulosimicrobium*, *Brachybacterium*, *Jonesia*, *Micrococcus*, *Streptomyces*, *Citricoccus*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Isoptericola*, *Nocardiopsis*, *Agromyces*, *Tsakamurella*, *Leucobacter*, *Haloglycomyces* y *Glycomyces* (Tabla III.II). La cantidad relativa de cada uno de estos géneros está indicada en la Figura A.I. del Anexo del trabajo, siendo los más abundantes *Microbacterium* (40,9%), *Brevibacterium* (15%) y *Corynebacterium* (7,7%). La diferenciación de las cepas empleadas en el ensayo se presenta en la Tabla III.I:

Id General	Código	Identidad
1	AM-MPR-1A-01	<i>Microbacterium ginsengiterrae</i>
4	AM-MPR-1A-04	<i>Brevibacterium iodinum</i>
5	AM-MPR-1B-01	<i>Corynebacterium casei</i>
7	AM-MPR-1B-03	<i>Microbacterium halotolerans</i>
9	AM-MPR-2A-01	<i>Brevibacterium aureum</i>
15	AM-MPR-2B-01	<i>Brevibacterium epidermidis</i>
18	AM-MPR-2B-04	<i>Brevibacterium iodinum</i>
19	AM-MPR-2B-05	<i>Arthrobacter nicotianae</i>
28	AM-MPR-3A-05	<i>Microbacterium gubbeenense</i>
33	AM-MPR-3B-05	<i>Brevibacterium iodinum</i>
38	AM-MESA1-1A-01	<i>Corynebacterium casei</i>
41	AM-MESA1-1A-04	<i>Corynebacterium casei</i>
46	AM-MESA1-1A-09	<i>Corynebacterium casei</i>
47	AM-MESA1-1B-01	<i>Microbacterium gubbeenense</i>
48	AM-MESA1-1B-02	<i>Brevibacterium epidermidis</i>
51	AM-MESA1-1B-05	<i>Arthrobacter arlittensis</i>
52	AM-MESA1-1B-06	<i>Corynebacterium casei</i>
54	AM-MESA1-2A-01	<i>Microbacterium indicum</i>
55	AM-MESA1-2A-02	<i>Microbacterium aerolatum</i>
56	AM-MESA1-2A-03	<i>Brevibacterium iodinum</i>
59	AM-MESA1-2A-06	<i>Corynebacterium casei</i>
61	AM-MESA1-2B-01	<i>Brevibacterium epidermidis</i>
62	AM-MESA1-2B-02	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>
65	AM-MESA1-3A-02	<i>Brevibacterium linens</i>
66	AM-MESA1-3A-03	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>
72	AM-MESA1-3B-01	<i>Brevibacterium epidermidis</i>
78	AM-TER1A-1A-02	<i>Brevibacterium epidermidis</i>
81	AM-TER1A-1A-05	<i>Microbacterium gubbeenense</i>
82	AM-TER1A-1A-06	<i>Brevibacterium epidermidis</i>

83	AM-TER1A-1B-01	<i>Microbacterium xinjiangensis</i>
84	AM-TER1A-1B-02	<i>Brevibacterium iodinum</i>
87	AM-TER1A-2A-01	<i>Brevibacterium epidermidis</i>
88	AM-TER1A-2A-02	<i>Brevibacterium linens</i>
90	AM-TER1A-2A-04	<i>Corynebacterium stationis</i>
92	AM-TER1A-2A-06	<i>Microbacterium xinjiangensis</i>
94	AM-TER1A-2B-02	<i>Microbacterium gubbeenense</i>
95	AM-TER1A-2B-03	<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i>
96	AM-TER1A-3A-01	<i>Brevibacterium epidermidis</i>
98	AM-TER1A-3A-03	<i>Corynebacterium casei</i>
99	AM-TER1A-3A-04	<i>Microbacterium xinjiangensis</i>
101	AM-TER1A-3B-02	<i>Microbacterium gubbeenense</i>
104	AM-TER1A-3B-05	<i>Brevibacterium linens</i>
106	AM-TER1B-1A-02	<i>Microbacterium xinjiangensis</i>
113	AM-TER1B-1B-03	<i>Microbacterium xinjiangensis</i>
116	AM-TER1B-2A-02	<i>Microbacterium xinjiangensis</i>
118	AM-TER1B-2A-04	<i>Microbacterium barkeri</i>
120	AM-TER1B-2B-01	<i>Brevibacterium epidermidis</i>
125	AM-TER1B-2B-06	<i>Cellulosimicrobium funkei</i>
127	AM-TER1B-3A-01	<i>Brevibacterium iodinum</i>
131	AM-TER1B-3A-05	<i>Microbacterium gubbeenense</i>
132	AM-TER1B-3B-01	<i>Brevibacterium epidermidis</i>
138	AM-MESD1-1A-03	<i>Microbacterium xinjiangensis</i>
143	AM-MESD1-1B-02	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>
145	AM-MESD1-1B-04	<i>Brachybacterium faecium</i>
148	AM-MESD1-2A-03	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>
149	AM-MESD1-2A-04	<i>Microbacterium xinjiangensis</i>
170	AM-MESA2-1A-03	<i>Microbacterium xinjiangensis</i>
172	AM-MESA2-1A-05	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>
173	AM-MESA2-1B-01	<i>Microbacterium xinjiangensis</i>

175	AM-MESA2-1B-03	<i>Brevibacterium linens</i>
185	AM-MESA2-2B-01	<i>Microbacterium indicum</i>
192	AM-MESA2-3A-04	<i>Microbacterium aerolatum</i>
218	AM-TER2A-2A-03	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>
219	AM-TER2A-2A-04	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>
221	AM-TER2A-2A-06	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>
231	AM-TER2A-3A-01	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>
242	AM-TER2A-3A-12	<i>Cellulosimicrobium funkei</i>
245	AM-TER2A-3B-02	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>
250	AM-TER2A-3B-07	<i>Microbacterium thalassium</i>
251	AM-TER2A-3B-08	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>
254	AM-TER2B-1A-02	<i>Brevibacterium epidermidis</i>
258	AM-TER2B-1B-01	<i>Microbacterium indicum</i>
276	AM-TER2B-2B-07	<i>Jonesia denitrificans</i>
281	AM-TER2B-3A-05	<i>Cellulosimicrobium funkei</i>
282	AM-TER2B-3A-06	<i>Microbacterium gubbeenense</i>
283	AM-TER2B-3A-07	<i>Microbacterium gubbeenense</i>
285	AM-TER2B-3B-01	<i>Microbacterium xinjiangensis</i>
291	AM-MESD2-1A-01	<i>Brevibacterium aureum</i>
293	AM-MESD2-1A-03	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>
296	AM-MESD2-1A-06	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>
297	AM-MESD2-1A-07	<i>Brevibacterium iodinum</i>
298	AM-MESD2-1A-08	<i>Microbacterium ginsengiterrae</i>
299	AM-MESD2-1B-01	<i>Brevibacterium linens</i>
300	AM-MESD2-1B-02	<i>Brevibacterium iodinum</i>
305	AM-MESD2-1B-07	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>
306	AM-MESD2-1B-08	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>
307	AM-MESD2-1B-09	<i>Corynebacterium casei</i>
316	AM-MESD2-2A-08	<i>Microbacterium aerolatum</i>
322	AM-MESD2-2B-02	<i>Brevibacterium iodinum</i>

327	AM-MESD2-2B-07	<i>Microbacterium xinjiangensis</i>
336	AM-MESD2-3B-02	<i>Corynebacterium stationis</i>
337	AM-MESD2-3B-03	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>
341	AM-MESA3-1A-02	<i>Nocardiosis alba</i>
342	AM-MESA3-1A-03	<i>Microbacterium ginsengiterrae</i>
346	AM-MESA3-1A-07	<i>Salinibacterium xinjiangense</i>
359	AM-MESA3-1B-09	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>
367	AM-MESA3-2A-03	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>
369	AM-MESA3-2A-05	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>
373	AM-MESA3-2A-09	<i>Cellulosimicrobium funkei</i>
380	AM-MESA3-2B-04	<i>Micrococcus luteus</i>
382	AM-MESA3-2B-06	<i>Microbacterium oxydans</i>
387	AM-MESA3-2B-11	<i>Streptomyces lividans</i>
396	AM-MESA3-3A-06	<i>Citricoccus zhacaiensis</i>
399	AM-MESA3-3B-02	<i>Brevibacterium epidermidis</i>
406	AM-TER3A-1A-01	<i>Brevibacterium iodinum</i>
410	AM-TER3A-1A-05	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>
413	AM-TER3A-1A-08	<i>Gordonia paraffinivorans</i>
422	AM-TER3A-1A-17	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>
438	AM-TER3A-1B-14	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>
439	AM-TER3A-1B-15	<i>Microbacterium aerolatum</i>
451	AM-TER3A-2A-08	<i>Microbacterium xinjiangensis</i>
454	AM-TER3A-2A-11	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>
463	AM-TER3A-2B-07	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>
469	AM-TER3A-3A-02	<i>Microbacterium barkeri</i>
478	AM-TER3A-3A-11	<i>Isoptricola halotolerans</i>
486	AM-TER3A-3B-07	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>
487	AM-TER3A-3B-08	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>
491	AM-MESD3-1A-01	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>

Id General	Código	Identidad
494	AM-MESD3-1A-04	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>
496	AM-MESD3-1B-01	<i>Microbacterium thalassium</i>
498	AM-MESD3-1B-03	<i>Arthrobacter nicotianae</i>
502	AM-MESD3-2A-01	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>
511	AM-MESD3-2A-10	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>
512	AM-MESD3-2A-11	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>
515	AM-MESD3-2A-14	<i>Microbacterium aerolatum</i>
517	AM-MESD3-2A-16	<i>Rhodococcus phenolicus</i>
522	AM-MESD3-2A-21	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>
536	AM-MESD3-2B-09	<i>Microbacterium paraoxydans</i>
544	AM-MESD3-2B-17	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>
549	AM-MESD3-2B-22	<i>Microbacterium aerolatum</i>
550	AM-MESD3-2B-23	<i>Microbacterium lacticum</i>
578	AM-MESD3-3B-12	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>
583	AM-MESA4-1A-05	<i>Citricoccus nitrophenolicus</i>
601	AM-MESA4-2A-01	<i>Nocardiopsis alba</i>
603	AM-MESA4-2A-03	<i>Brevibacterium iodinum</i>
605	AM-MESA4-2A-05	<i>Brachybacterium conglomeratum</i>
634	AM-MES5-1A-06	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>
638	AM-MES5-1A-10	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>
640	AM-MES5-1A-12	<i>Jonesia denitrificans</i>
653	AM-MES5-2A-04	<i>Microbacterium ginsengiterrae</i>
656	AM-MES5-2A-07	<i>Rhodococcus ruber</i>
659	AM-MES5-2A-10	<i>Cellulosimicrobium funkei</i>
661	AM-MES5-2B-02	<i>Rhodococcus phenolicus</i>
671	AM-MES5-3A-04	<i>Rhodococcus coprophilus</i>
673	AM-MES5-3A-06	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>
702	AM-MES6-1A-18	<i>Rhodococcus indicum</i>
707	AM-MES6-1A-23	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>

721	AM-MES6-1B-14	<i>Microbacterium lacticum</i>
722	AM-MES6-1B-15	<i>Rhodococcus indicum</i>
741	AM-MES6-2A-14	<i>Micrococcus xinjiangensis</i>
801	AM-MES7-1A-09	<i>Rhodococcus indicum</i>
816	AM-MES7-1B-06	<i>Streptomyces aureofaciens</i>
820	AM-MES7-1B-10	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>
830	AM-MES7-1B-20	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>
834	AM-MES7-2A-02	<i>Gordonia neofelifaecis</i>
838	AM-MES7-2A-06	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>
878	AM-MES7-3A-07	<i>Salinibacterium xinjiangense</i>
904	AM-MAD1-1A-01	<i>Nocardiopsis alba</i>
954	AM-MAD1-2A-12	<i>Tsukamurella inchonensis</i>
955	AM-MAD1-2B-01	<i>Nocardiopsis alba</i>
1031	AM-PRF-1A-01	<i>Rhodococcus phenolicus</i>
1204	AT-TER1A-2A-01	<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i>
1240	AT-TER1A-3B-01	<i>Microbacterium sediminis</i>
1271	AT-TER1B-2A-04	<i>Microbacterium sediminis</i>
1673	AT-MESD3-2B-03	<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i>
1982	BM-MPR-1A-01	<i>Microbacterium resistens</i>
2003	BM-MPR-2B-07	<i>Microbacterium aerolatum</i>
2004	BM-MPR-3A-01	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
2015	BM-MPR-3B-02	<i>Brevibacterium halotolerans</i>
2028	BM-MESA1-1A-07	<i>Citricoccus nitrophenolicus</i>
2031	BM-MESA1-1B-01	<i>Agromyces ulmi</i>
2059	BM-MESA1-3A-06	<i>Arthrobacter nicotianae</i>
2062	BM-MESA1-3B-01	<i>Corynebacterium stationis</i>
2070	BM-TER1A-1A-02	<i>Arthrobacter arilaitensis</i>
2080	BM-TER1A-1B-04	<i>Arthrobacter arilaitensis</i>
2094	BM-TER1A-2B-01	<i>Microbacterium barkeri</i>
2096	BM-TER1A-2B-03	<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i>

2117	BM-TER1B-1A-01	<i>Jonesia quinghaiensis</i>
2121	BM-TER1B-1A-05	<i>Leucobacter komagatae</i>
2122	BM-TER1B-1A-06	<i>Jonesia denitrificans</i>
2124	BM-TER1B-1B-01	<i>Corynebacterium stationis</i>
2147	BM-TER1B-3A-03	<i>Corynebacterium stationis</i>
2156	BM-TER1B-3B-06	<i>Microbacterium xinjiangensis</i>
2160	BM-MESD1-1A-04	<i>Microbacterium paraoxydans</i>
2210	BM-MESA2-1B-01	<i>Microbacterium xinjiangensis</i>
2212	BM-MESA2-1B-03	<i>Microbacterium gubbeenense</i>
2217	BM-MESA2-2A-01	<i>Leucobacter komagatae</i>
2255	BM-TER2A-1B-03	<i>Microbacterium aerolatum</i>
2266	BM-TER2A-2A-04	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>
2270	BM-TER2A-2A-08	<i>Microbacterium xinjiangensis</i>
2271	BM-TER2A-2B-01	<i>Jonesia denitrificans</i>
2274	BM-TER2A-2B-04	<i>Corynebacterium casei</i>
2318	BM-TER2B-2A-07	<i>Microbacterium xinjiangensis</i>
2334	BM-TER2B-3B-01	<i>Brevibacterium epidermidis</i>
2343	BM-MESD2-1A-03	<i>Corynebacterium casei</i>
2369	BM-MESD2-2B-03	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>
2370	BM-MESD2-2B-04	<i>Microbacterium resistens</i>
2378	BM-MESD2-3A-03	<i>Microbacterium aerolatum</i>
2429	BM-TER3A-1A-03	<i>Microbacterium thalassium</i>
2441	BM-TER3A-1B-04	<i>Jonesia denitrificans</i>
2504	BM-MESD3-3A-01	<i>Corynebacterium stationis</i>
2535	BM-MESA4-2A-03	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>
2536	BM-MESA4-2A-04	<i>Jonesia denitrificans</i>
2576	BM-MES5-1A-03	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>
2585	BM-MES5-1B-02	<i>Microbacterium aerolatum</i>
2597	BM-MES5-2A-03	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>
2618	BM-MES5-3A-04	<i>Microbacterium aerolatum</i>

2634	BM-MES6-1A-02	<i>Cellulosimicrobium funkei</i>
2653	BM-MES6-1B-10	<i>Cellulosimicrobium funkei</i>
2670	BM-MES6-2B-06	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>
2693	BM-MES7-1A-01	<i>Jonesia quinghaiensis</i>
2724	BM-MES7-2B-03	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>
2742	BM-MES7-3B-03	<i>Brachybacterium conglomeratum</i>
2749	BM-MAD1-1A-02	<i>Cellulosimicrobium funkei</i>
2794	BM-MAD1-3B-01	<i>Rhodococcus gordoniae</i>
2815	BM-MAD2-1B-02	<i>Streptomyces albus</i>
2885	BM-PRF-2A-01	<i>Haloglycomyces albus</i>
2918	BM-PRF-3B-01	<i>Glycomyces mongolensis</i>
2935	BT-MPR-1A-08	<i>Microbacterium sediminis</i>
3271	BT-MESA2-2A-10	<i>Arthrobacter russicus</i>

Tabla III.I. Código de las cepas utilizadas en este trabajo e identidad de cada una de ellas.

Phylum Actinobacteria	Dominio Bacteria		
	Familia	Género	Especie
	Brevibacteriaceae	Brevibacterium	<i>Brevibacterium iodinum</i> , <i>Brevibacterium aureum</i> , <i>Brevibacterium epidermidis</i> , <i>Brevibacterium linens</i> , <i>Brevibacterium halotolerans</i> , <i>Brevibacterium frigoritolerans</i>
	Corynebacteriaceae	Corynebacterium	<i>Corynebacterium casei</i> , <i>Corynebacterium stationis</i> , <i>Corynebacterium glutamicum</i>
	Dermabacteraceae	Brachybacterium	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i> , <i>Brachybacterium faecium</i> , <i>Brachybacterium conglomeratum</i>
	Glycomycetaceae	Haloglycomyces	<i>Haloglycomyces albus</i>
		Glycomyces	<i>Glycomyces mongolensis</i>
	Jonesiaceae	Jonesia	<i>Jonesia denitrificans</i> , <i>Jonesia quinghaiensis</i>
	Microbacteriaceae	Microbacterium	<i>Microbacterium ginsengiterrae</i> , <i>Microbacterium halotolerans</i> , <i>Microbacterium gubbeenense</i> , <i>Microbacterium indicum</i> , <i>Microbacterium aerolatum</i> , <i>Microbacterium xinjiangensis</i> , <i>Microbacterium hydrocarbonoxydan</i> , <i>Microbacterium barkeri</i> , <i>Microbacterium esteraromaticum</i> , <i>Microbacterium phyllosphaerae</i> , <i>Microbacterium thalassium</i> , <i>Microbacterium oxydans</i> , <i>Microbacterium paraoxydans</i> , <i>Microbacterium lacticum</i> , <i>Microbacterium sediminis</i> , <i>Microbacterium resistens</i>
		Salinibacterium	<i>Salinibacterium xinjiangense</i>
		Agromyces Leucobacter	<i>Agromyces ulmi</i> <i>Leucobacter komagatae</i>
		Arthrobacter	<i>Arthrobacter arilaitensis</i> , <i>Arthrobacter nicotianae</i> , <i>Arthrobacter ruscicus</i>
		Micrococcus	<i>Micrococcus luteus</i> , <i>Micrococcus xinjiangensis</i>
		Citricoccus	<i>Citricoccus zhacaiensis</i> , <i>Citricoccus nitrophenolicus</i>
	Nocardiaceae	Rhodococcus	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> , <i>Rhodococcus phenolicus</i> , <i>Rhodococcus pyridinivorans</i> , <i>Rhodococcus ruber</i> , <i>Rhodococcus phenolicus</i> , <i>Rhodococcus coprophilus</i> , <i>Rhodococcus indicum</i> , <i>Rhodococcus phenolicus</i> , <i>Rhodococcus gordoniae</i>
		Gordonia	<i>Gordonia paraffinivorans</i> , <i>Gordonia neofelifaecis</i>
	Nocardiopsaceae	Nocardiopsis	<i>Nocardiopsis alba</i>
	Promicromonosporaceae	Cellulosimicrobium	<i>Cellulosimicrobium funkei</i> , <i>Cellulosimicrobium cellulans</i>
		Isoptericola	<i>Isoptericola halotolerans</i>
	Streptomycetaceae	Streptomyces	<i>Streptomyces lividans</i> , <i>Streptomyces aureofaciens</i> , <i>Streptomyces albus</i>
	Tsukamurellaceae	Tsukamurella	<i>Tsukamurella inchonensis</i>

Tabla III.II. Familia, género y especie de las actinobacterias aisladas del proceso de compostaje y utilizadas en este trabajo.

b) Patógenos humanos

Como patógenos humanos para el ensayo de susceptibilidad a posibles antibióticos producidos por las cepas de la colección, se emplearon dos cepas procedentes de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) patógenos nosocomiales habituales que no presentan genes de resistencia a antibióticos:

- Gram-positiva: *Staphylococcus aureus* CECT 239
- Gram-negativa: *Escherichia coli* CECT 101

Estas cepas fueron elegidas debido a que son usadas habitualmente en estudios como control para antimicrobianos usados frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas respectivamente (Picazo, 2000).

2-Medios de cultivo

Medio	Composición	pH
Caldo nutritivo, medio deshidratado (CN) (Panreac)	<ul style="list-style-type: none"> – Extracto de carne: 3 g/L – Peptona de gelatina: 8 g/L 	6,8
APHA (Panreac)	<ul style="list-style-type: none"> – Extracto de Levadura: 2,5 g/L – D(+)-glucosa (anhidra): 1 g/L – Enzima digerida de caseína: 5 g/L – Agar bacteriológico: 15 g/L 	7

Tabla III.III. Composición de los medios de cultivo.

El medio de cultivo utilizado tanto para el cultivo en placa, como en tubos de agar inclinado fue APHA (receta comercial, 23,5 g/L; Panreac) (**Tabla III.III**), empleando refuerzo de agar bacteriológico (receta comercial, 5 g/L; Panreac) y usando como disolvente agua destilada. Para las placas fue necesario la preparación del medio en un matraz de vidrio, posteriormente autoclavado (1 atmósfera de presión y 20 minutos de tratamiento) para ser vertido en las placas. Para la preparación de tubos, se calentó el medio en un vaso de precipitado de vidrio hasta su ebullición; luego se agitó levemente y con ayuda de un embudo se llenaron los tubos que posteriormente se autoclavaron (1 atmósfera de presión y 20 minutos de tratamiento) y se inclinaron hasta su solidificación.

Para el crecimiento tanto de actinobacterias, como del patógeno en suspensión, se utilizaron tubos cortos con 5 mL de caldo nutritivo (CN) (receta comercial, 8 g/L; Panreac). Como medio para el enfrentamiento actinomiceto frente al patógeno, se prepararon placas de APHA con base de agar agua. Para su elaboración, se preparó agar agua (20 g/L), se autoclavó (1 atmósfera de presión y 20 minutos de tratamiento) y vertió en la placa la mitad de la altura de esta. Se dejó solidificar la primera capa y se añadieron con pinzas estériles los pocillos (Torrecillas Oxford) con una plantilla para enfrentamientos. Ya puestos los pocillos, se preparó

APHA de la manera indicada anteriormente para las placas y se vertió hasta una altura que no llegaba al borde del pocillo. Una vez solidificado, con las pinzas estériles se retiraron los pocillos. Todo el material fue conservado a 4 °C hasta su uso.

3-Obtención de la colección de actinomicetos de muestras del compostaje

Inicialmente, se procedió a recuperar la colección de 230 actinomicetos. Para ello se aislaron las cepas de tubo a placa y se resembraron a tubo. La selección de cultivos puros se realizó comparando la morfología en placa con una base de datos fotográfica de colonias de las que dispone el grupo de investigación. El tiempo de incubación tanto para placa como tubo fue de 48-72 h con una temperatura de 30 °C. En algunos casos, la viabilidad de la cepa del tubo era tan baja que se tuvo que recurrir a recuperarla a partir de muestras crioconservadas. Una vez obtenidos los tubos de cepas puras, éstas fueron conservados a 4 °C hasta su uso.

4-Diseño experimental para detección de cepas productoras de antimicrobianos

Para medir la actividad antimicrobiana se realizaron ensayos de susceptibilidad a agentes antimicrobianos mediante métodos de difusión. Para ello se usaron placas de APHA con pocillos, en las cuales el patógeno fue sembrado en masa y posteriormente, en cada pocillo se introdujo un inóculo líquido de actinomicetos. En el caso de que produjeran los actinomicetos sustancias antimicrobianas, se formaría una zona de inhibición de diámetro proporcional a la cantidad de agente antimicrobiano, la solubilidad, el coeficiente de difusión y la eficacia total del agente.

Inicialmente, se comenzó trabajando con el enfrentamiento en placa de extractos acelulares frente al patógeno; pero debido a la laboriosidad del proceso, la escasez de resultados positivos debido a la baja concentración de antimicrobiano generado, se procedió a estudiar diferentes opciones. Se sustituyeron los extractos acelulares de trabajo con extractos celulares, con el fin de perseguir una generación continua de sustancias antimicrobianas en el tiempo de duración del enfrentamiento. Primero se sembró en masa con hisopo el patógeno (**Figura III.II**) cultivado 24 h, a 30 °C en CN y después se introdujeron 50 µL/pocillo de actinomiceto cultivado 72 h, a 30 °C en CN. Esta metodología resultó ser más ágil y se obtuvieron algunos resultados positivos, pero con halos poco notables o pequeños.

En base a los resultados obtenidos, se realizó un análisis de diferentes metodologías, basados en la última mencionada, pero cambiando únicamente una variable en cada caso. De esta manera, se desarrollaron un conjunto de variantes del método original (**Figura III.III**) para optimizar el proceso de análisis:

- **Método 1: Sembrar el actinomiceto y al día siguiente, sembrar el patógeno.** Con esto se pretendía que el antimicrobiano tuviera tiempo de difundir en la placa y así, cuando se

sembrara el patógeno no podría crecer en aquella zona donde había difundido el metabolito.

- **Método 2: Sembrar el actinomiceto y a los 2 días sembrar el patógeno.** Esta metodología persiguió el mismo objetivo anterior, pero aumentaba el tiempo de difusión del metabolito, de manera que se podía esperar un mayor efecto antimicrobiano en caso de que los actinomicetos tuvieran una cinética lenta de producción de antibióticos.
- **Método 3: Utilizar patógeno con un periodo de incubación en CN de 48 h.** Transcurrido ese tiempo de incubación, el patógeno ya se encuentra en fase estacionaria. En esta fase, el crecimiento cesa debido al agotamiento de los nutrientes o por acumulación de desechos del microorganismo. Resulta de gran interés en el estudio de la producción de antibióticos con actinomicetos, debido a las características metabólicas ralentizadas para generación de antibióticos de esta subclase. Al sembrarse el patógeno en fase estacionaria, su cinética de crecimiento se suponía que no iba a ser lo suficientemente alta para colonizar la placa entera antes de que difundiera el antibiótico, por lo que sería más susceptible de observarse efecto antimicrobiano.
- **Método 4: Introducir 100 µL de actinomiceto en cada uno de los pocillos.** Al aumentar el volumen de inóculo, se esperaba observar mayor efecto antimicrobiano.
- **Método 5: Sembrar el patógeno con un periodo de incubación en CN de 48 h e introducir 100 µL de actinomiceto en cada uno de los pocillos.** Con esta metodología se combinaron las dos anteriores, por lo que se esperaba observar halos de aclaramiento aún más grandes que en las anteriores. Esta metodología sería la finalmente usada para el ensayo *in vivo* final (ver apartado V.I.I).

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se midió el diámetro de los halos y se calculó el valor medio.

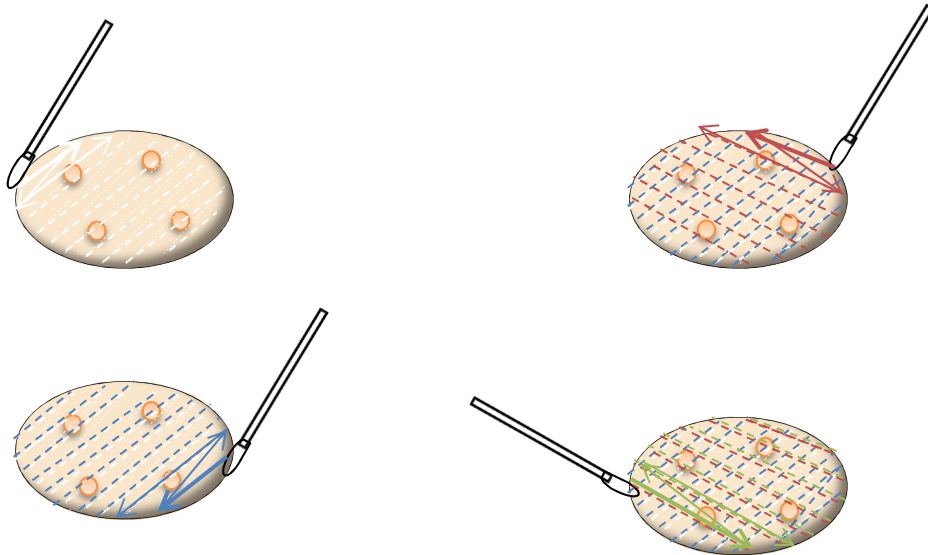


Figura III.II. Siembra en masa con hisopo del patógeno en placa de APHA con pocillos. El hisopo fue previamente impregnado en patógeno crecido en CN tras el periodo de incubación, homogeneizado con vórtex. La siembra se realizó en masa, pasando también por los pocillos. Se realizó en cada una de las 4 direcciones indicadas para que el patógeno creciera por toda la placa sin dejar huecos.

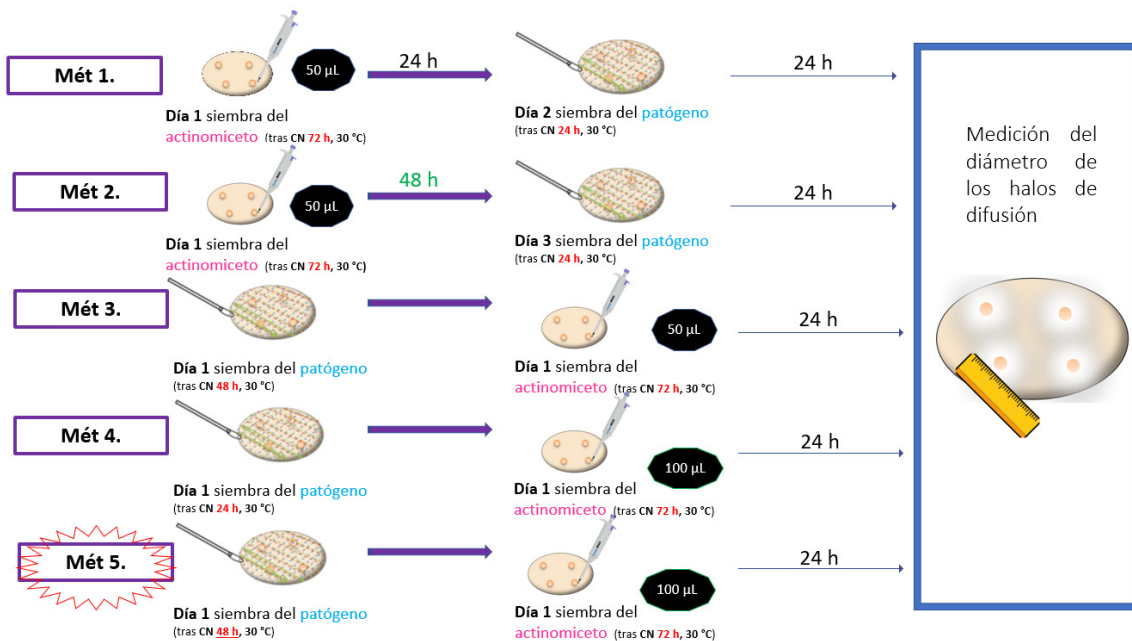


Figura III.III. Metodologías utilizadas para la optimización de la detección de antimicrobianos.

La metodología finalmente elegida consistió en sembrar en masa con hisopo el patógeno cultivado 48 h, a 30 °C en CN y posteriormente introducir 100 µL/pocillo de actinomiceto cultivado 72 h, a 30 °C en CN. La medición de halos de difusión se realizó a las 24 h y se midieron estableciendo 4 medidas por placa (correspondientes a cada uno de los pocillos presentes en la misma).

5- Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) con extractos acelulares de las actinobacterias productoras de sustancias antimicrobianas

En esta fase se evaluaron los 20 actinomicetos que proporcionaron mejores resultados en la prueba anterior de producción de antimicrobianos. La producción de halos de gran tamaño (>18 mm) en un patógeno o la producción de sustancias antimicrobianas activas frente a los dos patógenos evaluados fueron los criterios de selección de las cepas. Se sembró con asa de platino, recogiendo biomasa del tubo de agar inclinado y suspendiendo varias veces en tubo corto con 5 mL de CN para cada una de las cepas positivas. Estos tubos se incubaron 1 semana a 30 °C en agitación a 100 rpm. Transcurrida la semana, se usaron 0,5 mL del tubo incubado para hacer recuento de viables (Unidades Formadoras de Colonias/mL, UFC/mL) mediante técnica de diluciones seriadas realizando el ensayo por triplicado. Por otro lado, 4 mL fueron repartidos en 2 eppendorf de 2 mL cada uno. Para la elaboración de extractos acelulares se centrifugaron los eppendorf 10 min a 12.000 rpm. Transcurrido el tiempo, se filtró el sobrenadante mediante filtro de jeringa estéril de 0,22 µm. Finalmente, el filtrado se conservó en congelación a -20 °C hasta su uso (Figura III.IV).

Para determinar los niveles de crecimiento de las poblaciones bacterianas, se usó la técnica de recuento en placa. El recuento sirvió para asegurar la viabilidad de la cepa y se comprobó que el número de colonias siempre fuera mayor a 10⁵ UFC/mL, cantidad suficiente para promover de forma significativa la generación de antibióticos. Esta técnica se basa en la dilución de la muestra original y la siembra en placas de APHA de alícuotas de las diferentes diluciones. Tras el tiempo de incubación de 72 h, se contó el número de colonias que había en cada placa (UFC/mL) (Figura III.IV).

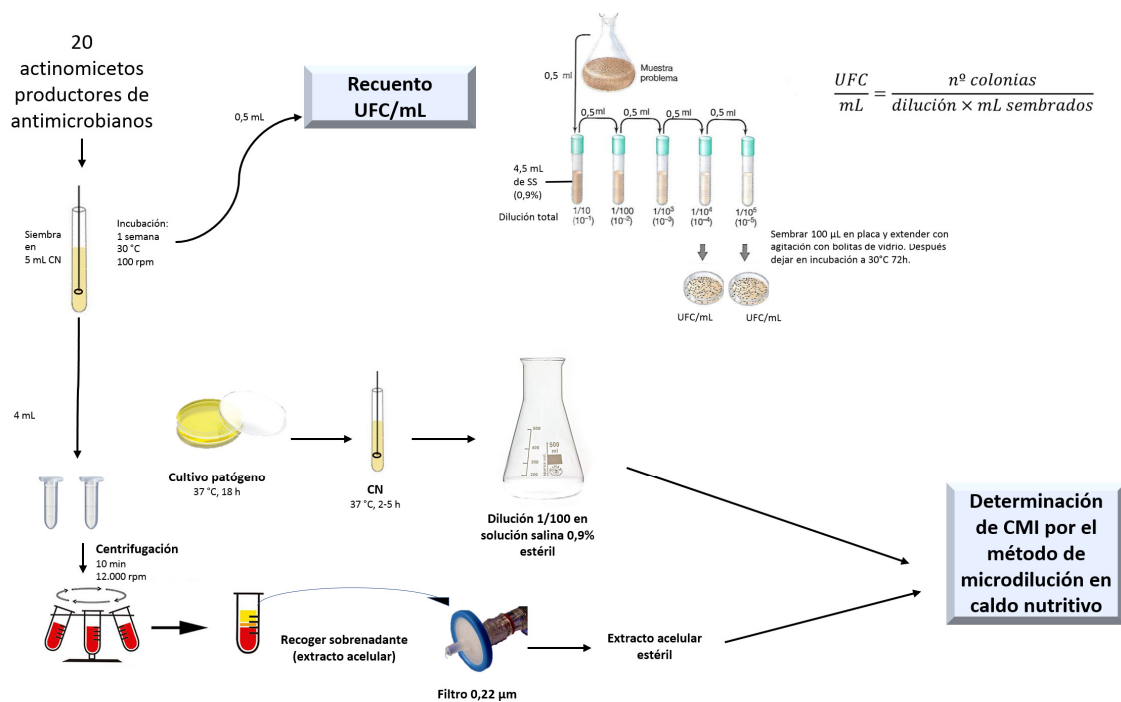


Figura III.IV. Procedimiento experimental para determinación de CMI y recuento de UFC/mL.

Con los extractos acelulares obtenidos se realizó paralelamente la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de microdilución en caldo nutritivo. Para ello, a partir de placas en crecimiento exponencial de los patógenos (37 °C durante 18 h) se sembraron 4-5 colonias bien diferenciadas en tubos cortos de CN para cada uno de los patógenos durante 2-5 h a 37 °C y una vez pasado el tiempo, se realizó una dilución 1/100 del patógeno en solución salina estéril al 0,9% (**Figura III.IV**).

Para el ensayo de CMI se usó una microplaca estéril de 96 pocillos (**Figura III.IV**) en la cual inicialmente se dispusieron 100 µL de CN. Después, en la Fila A, se adicionaron 100 µL del extracto, a lo que le siguió la realización de las diluciones y por último la adición del patógeno, alcanzando todos los pocillos un volumen final de 200 µL. Una vez ya preparada la microplaca con el procedimiento indicado en la **Figura III.V**, se incubó a 37 °C durante 18 horas y pasado ese tiempo, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Biotek) a 540 nm. Se consideró la CMI del extracto ensayado como la menor concentración capaz de inhibir al menos la mitad del crecimiento del patógeno sembrado, es decir, aquella última dilución del extracto que no generaba turbidez suficiente en el pocillo para representar un crecimiento significativo del patógeno. De forma adicional se realizaron análisis de correlación de Pearson entre los ensayos *in vivo* y los ensayos de determinación de CMI, con el fin de evaluar la relación entre estos parámetros del trabajo.

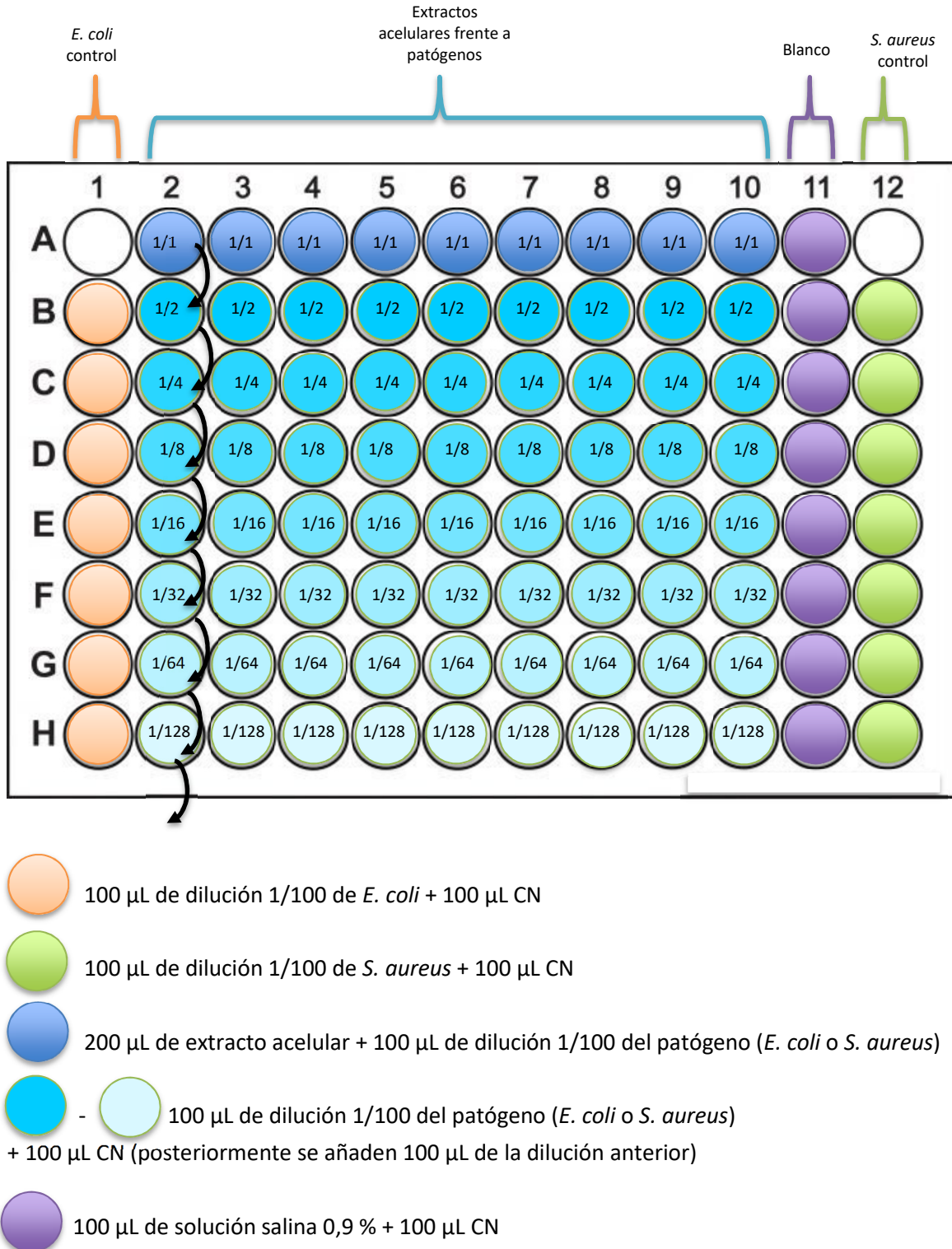


Figura III.V. Microplaca de 96 pocillos para determinación de CMI. En la primera columna, de la B a la H se dispusieron réplicas del patógeno *E. coli*, en donde se adicionaron 100 µL de dilución 1/100 en solución salina 0,9% del patógeno y 100 µL de caldo nutritivo. Lo mismo ocurrió en la última columna, pero para *S. aureus*. En medio, en las calles 2-10, la primera fila estuvo formada por 3 réplicas para cada uno de los extractos acelulares frente a *E. coli* y 3 réplicas frente a *S. aureus*. Cada uno de estos pocillos contuvo 100 µL de extracto acelular y 100 µL de dilución

1/100 del patógeno en solución salina. Después, para cada una de las columnas 2-10 se realizaron diluciones seriadas a partir de la inicialmente realizada en la primera fila; para ello se pipetearon 100 μ L de la dilución de la fila A en el pocillo de la fila siguiente, que contenía 100 μ L de dilución 1/100 en solución salina 0,9% del patógeno y 100 μ L de caldo nutritivo. A continuación, se pipetearon 100 μ L de la dilución de la fila B en el pocillo de la fila siguiente, que contenía lo indicado anteriormente. Así se realizaron las diluciones hasta la fila H y se desecharon de esta última fila 100 μ L para que todos los pocillos tuvieran un volumen de 200 μ L. La calle 11 se usó como blanco.

6- Correlación entre CMI y diámetros de halos de inhibición. Análisis estadístico.

De forma adicional, se realizaron análisis estadísticos. El programa estadístico empleado para este estudio fue Statgraphics Centurion XI (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA). Se analizó la correlación entre CMI y diámetros de halos de inhibición mediante un análisis de Correlación de Pearson ($p < 0,05$).

7- Análisis cromatográfico, HPLC

Para la obtención de un concentrado de antibiótico se siguió la metodología propuesta por Jose *et al.*, (2014) con algunas modificaciones. Inicialmente, se inocularon las 2 cepas seleccionadas por suspensión en matraces con 100 mL de CN que se mantuvieron en incubación a 30 °C con agitación continua durante 1 semana. Transcurrido este tiempo, se centrifugó el contenido a 5.000 rpm durante 10 min para eliminar la biomasa. Posteriormente, al sobrenadante se le añadió acetato de etilo en proporción 1:1, que se mantuvo 45 min en agitación. Pasado ese periodo, se separaron las fases por decantación, conservando únicamente la fase de acetato, donde quedarían los compuestos objeto del análisis. A continuación, el acetato de etilo se centrifugó a 5.000 rpm durante 10 min para precipitar los residuos de CN remanentes. Después, se evaporó todo el acetato de etilo mediante rotavapor para la obtención del extracto concentrado. Una vez evaporado, el extracto fue suspendido en 200 μ L de metanol y se congeló a -20 °C. Como blanco para cromatografía se usó medio de cultivo estéril sin inóculo, siguiendo el protocolo descrito. La cromatografía la llevo a cabo el grupo de la Universidad de Almería de Química Analítica, European Union Reference Laboratory for Pesticide Residues in Fruit & Vegetables empleando un HPLC acoplado a espectrómetro de masas de alta resolución con dilución 1/500 de los extractos. El tratamiento de los datos se realizó empleando el Software Compound Discoverer 3.0 (Thermo Scientific) que toma todos los cromatogramas y espectros de masas y trata de identificar todos los compuestos presentes.

IV. Resultados y Discusión

Según los objetivos planteados en el presente trabajo y de acuerdo al desarrollo presentado en el diseño experimental mostrado en la **Figura III.III**, a continuación, se describen los resultados generados en cada etapa del ensayo y la discusión de los mismos, comenzando por los experimentos para seleccionar metodología adecuada de trabajo inicial, los

enfrentamientos *in vivo* llevados a cabo, seguidos del estudio de CMI y finalizando con la identificación de antibióticos mediante técnicas cromatográficas.

1-Enfrentamiento con extractos celulares

1.1. Experimentos para seleccionar metodología adecuada

La aplicación de las cinco metodologías distintas de trabajo en ensayos de antagonismo, descritas en el apartado de Material y Métodos generó diferentes resultados que quedan recogidos en la **Tabla IV.I**. Estos datos ayudaron a poder decidir la metodología de trabajo, pero aun así cada uno de los métodos presentó algunas peculiaridades:

- **Método 1.** El problema de esta metodología fue la presencia de contaminaciones debido al elevado número de manipulaciones y el tiempo de siembra en placa; además, en ocasiones el actinomiceto se arrastró con el hisopo en la siembra y colonizó toda la placa, no pudiendo medirse el resultado (representado con un . en la **Tabla IV.I**).
- **Método 2.** El resultado fue similar al anterior método y únicamente se obtuvo 1 resultado positivo.
- **Método 3.** Se obtuvieron resultados levemente más favorables que en los casos anteriores, reduciendo el número de contaminaciones del ensayo.
- **Método 4.** Se obtuvieron unos resultados similares al Método 3.
- **Método 5.** Con esta metodología, se observaron mejoras notables en el efecto antimicrobiano, reflejadas en el tamaño de los halos de aclaramiento.

	<i>Brevibacterium iodinum</i>	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	<i>Corynebacterium casei</i>	<i>Streptomyces aureofaciens</i>
<i>S. aureus</i>	4	19	38	816
Mét 1
Mét 2	12,5	0	0	0
Mét 3	14	12,5	0	13,25
Mét 4	12,75	10,5	0	15
Mét 5	15,5	12,5	0	17

Tabla IV.I. Valor medio en milímetros de los halos para los enfrentamientos de actinomicetos: 4 (*Brevibacterium iodinum*), 19 (*Arthrobacter nicotianae*), 38 (*Corynebacterium casei*) y 816 (*Streptomyces aureofaciens*) frente a *S. aureus* para cada uno de los métodos. La cepa 38 correspondía a un control negativo y las demás a controles positivos.

El diseño de las diferentes metodologías evaluadas se apoyó en artículos científicos publicados con anterioridad, como el publicado por Glukhova *et al.* (2018) en el cual se usó el método de difusión en agar (Bauer *et al.*, 1996) añadiendo 100 µL de medio con actinomicetos en los pocillos. También, Quintero *et al.* (2018) usaron medios diferentes para el cultivo de actinomicetos y también emplearon un tiempo de incubación de 72 h. En otros estudios como el de Picazo (2000) y Schumacher *et al.* (2003), se usaron discos previamente impregnados con el antimicrobiano en vez de inoculación líquida en los pocillos para estudiar halos de difusión. El método usado fue una variante de éste, que se basaba en la misma dinámica que los discos. En base a estos resultados obtenidos, se llegó a la conclusión de que la mejor metodología era el método 5, ya que reunía los beneficios de las técnicas 3 y 4 y los resultados resultaron ser completamente clarificadores (**Figura IV.I**). Por tanto, este método fue el que se usó para todos los enfrentamientos *in vivo* del trabajo experimental. Según los estudios mencionados, se llegó a la conclusión de que la metodología utilizada fue adecuada para estudiar el efecto antimicrobiano, ya que integraba los factores de varios estudios que obtuvieron buenos resultados o incluso algunos que se diseñaron para ser incluso mejores que los ya mencionados.

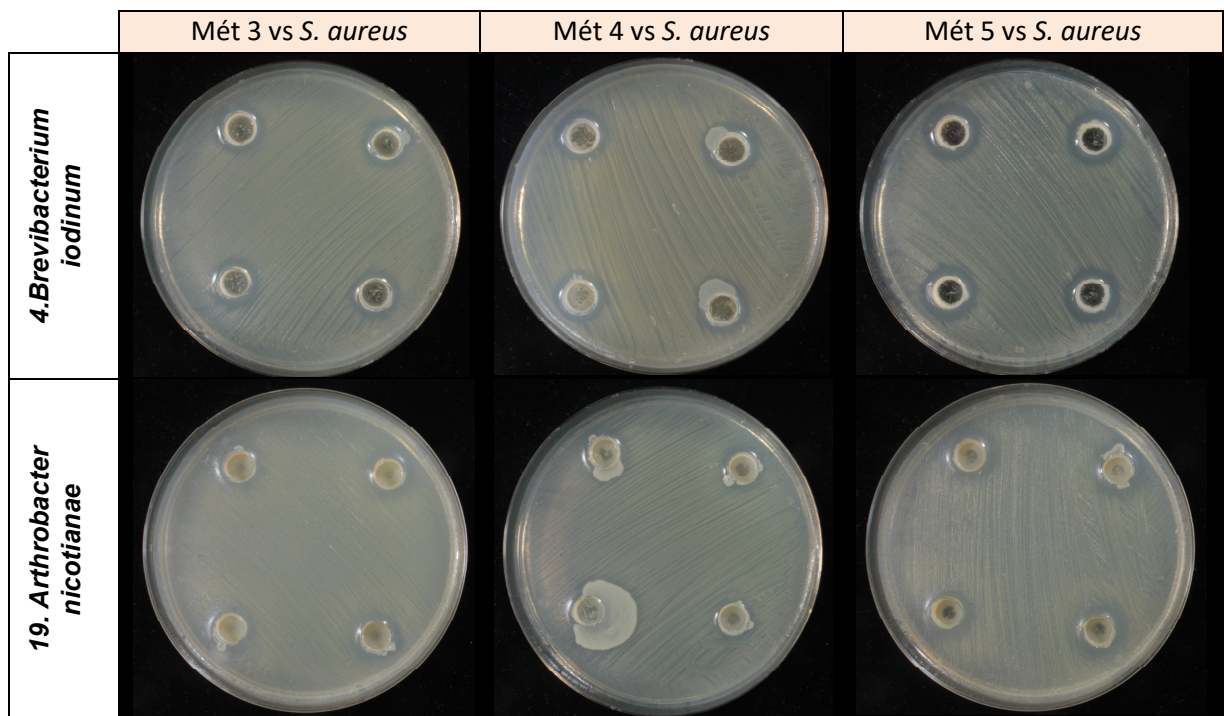


Figura IV.I. Fotografías de las placas más representativas tras el periodo de incubación.

1.2. Enfrentamientos *in vivo*

1.2.1. % de actinomicetos productores de antibióticos

En **Figura IV.II.** se representan los tamaños de halos de inhibición de cada una de las cepas que resultaron positivas en el ensayo *in vivo* realizado. De todas las cepas de actinomicetos, se obtuvieron un total de **40 cepas (17,3% de las cepas de partida) con resultados positivos**. Por

lo que, los resultados obtenidos en el ensayo reflejaron la gran importancia de este grupo microbiano en la generación de antibióticos en entornos ambientales. Se ha comprobado en estudios que del total de metabolitos secundarios bioactivos documentados, un 45% son producidos por actinomicetos (Selvameenal *et al.*, 2009). Este porcentaje de productores de antibióticos resaltan la gran importancia de las actinobacterias implicadas en la eliminación de patógenos en el proceso de compostaje. Aunque el factor principal implicado en la higienización de las pilas de compostaje es la temperatura, los antibióticos también juegan un papel destacado. Se ha evaluado el efecto antagonista de bacterias del compostaje frente a fitopatógenos en numerosos estudios (Gorodecki y Hadar, 1990; Suárez-Estrella *et al.*, 2007; Ntougias *et al.*, 2008). Además, se ha demostrado el efecto antimicrobiano frente a patógenos humanos, incluyendo cepas como *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina y *Enterococcus* resistente a Vancomicina (Parada *et al.*, 2017).

Los actinomicetos no solo se encuentran presentes en el suelo, sino que son innumerables sus hábitats. La OMS ha lanzado el programa Global Antibiotic Research and Development Partnership para la búsqueda de nuevos antibióticos (WHO, 2017) en diferentes ambientes. Además, otros estudios se están centrando en actinobacterias marinas como los de Manivasagan *et al.* (2014) o Quintero *et al.* (2018); incluso hay proyectos que estudian los microorganismos de ambientes marinos, donde destaca el proyecto europeo Pharmasea. Se han detectado en hormigueros algunos actinomicetos del género *Streptomyces* que conviven en simbiosis con las hormigas *Acromyrmex octospinosus* y las protegen de las infecciones provocadas por el parásito *Escovopsis* (Currie *et al.*, 1999). También se han identificado secreciones antimicrobianas en más de 20 especies de hormigas (Penick *et al.*, 2018) algunas de ellas relacionadas con actinobacterias. Las hormigas son insectos sociales, por lo que, la posibilidad de propagación de enfermedades es muy alta y necesitan diferentes mecanismos de defensa. Los antibióticos que se encuentran en los hormigueros son muy variados y por ahora no se presentan resistencias. En estos ambientes tampoco se produce excesiva concentración de un antibiótico, por lo que no se genera la evolución de resistencias a pesar de los millones de años que las hormigas llevan en la Tierra.

Productores de antimicrobianos

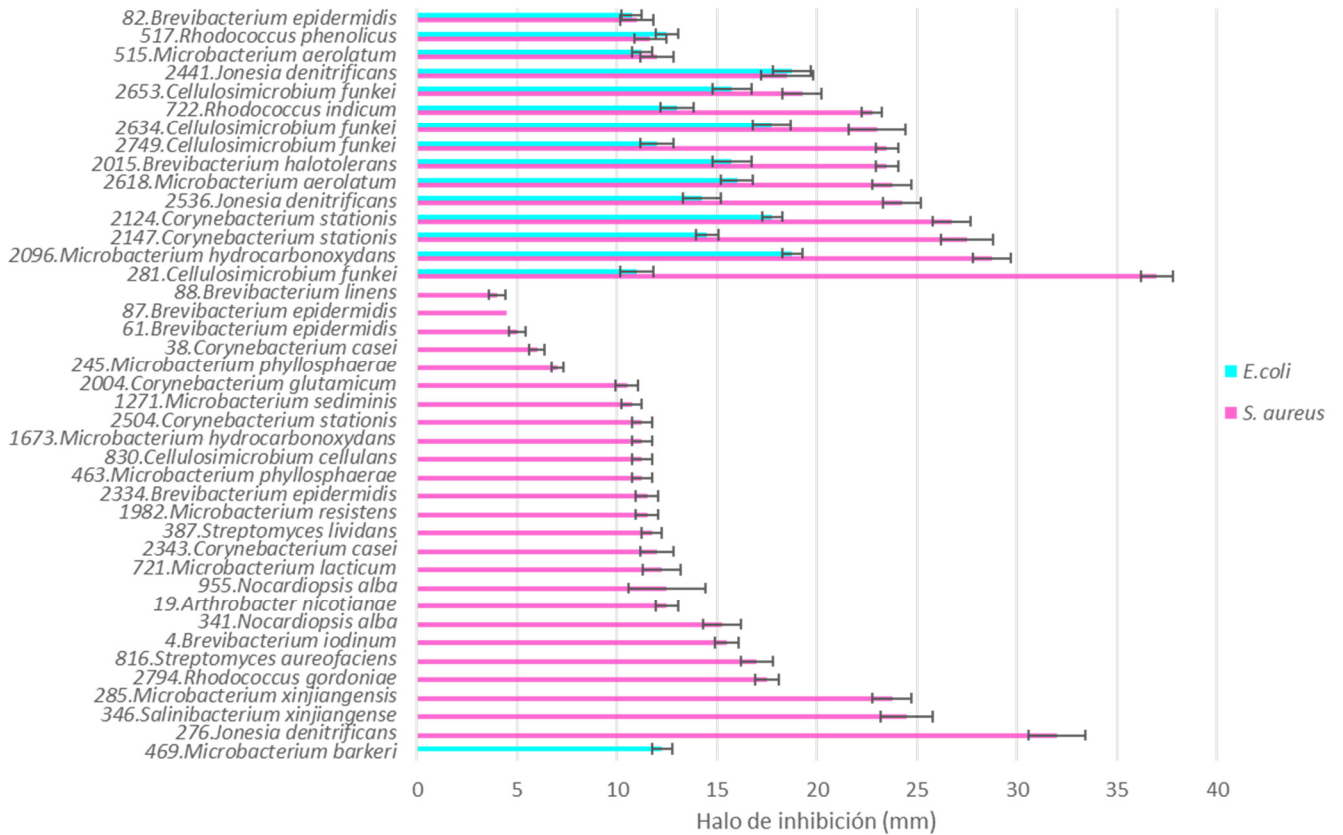


Figura IV.II. Actinomicetos productores de antibióticos. Con líneas aparecen representados el tamaño de los halos frente a *E. coli* (azul) y *S. aureus* (rosa) y aquellas cepas donde no parece línea produjeron positivos muy leves, de manera que no se pudieron medir los halos. Desde *Corynebacterium casei* hasta *Cellulosimicrobium funkei*, se muestran todos los productores de antibióticos para ambos patógenos. A partir de *Brevibacterium linens* hasta *Jonesia desnitritificans* aparecen los productores de antibióticos únicamente frente a *S. aureus*. Finalmente aparece *Microbacterium barkeri*, que resultó ser efectiva solamente frente a *E. coli*.

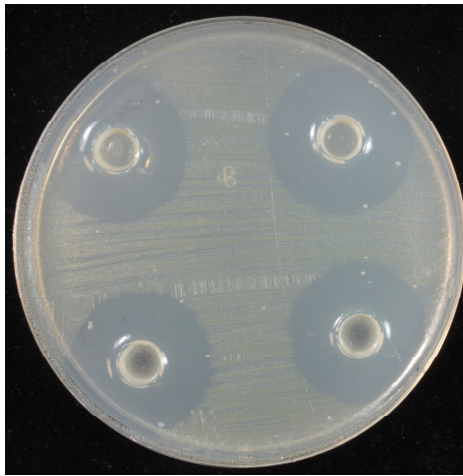
1.2.2. Resultados frente a *S. aureus* y *E. coli*:

Con los resultados obtenidos y presentados en la **Figura IV.II**, se observó no solo una mayor producción de sustancias microbianas útiles en Gram-positivos (mayor número de positivos), sino además una mayor capacidad inhibitoria del crecimiento (mayor tamaño de halos generados). *Actinobacteria* es un filo de bacterias Gram-positivas que poseen una alta capacidad de adaptación a diferentes ambientes. Su adaptación les permite soportar situaciones cambiantes de humedad y poseen la capacidad de metabolizar compuestos orgánicos complejos junto con la capacidad de producir compuestos que inhiben el crecimiento de otras bacterias (**Tabla A.I del Anexo**), lo que les ofrece una importante ventaja competitiva (Evangelista-Martínez, 2014; Wang et al., 2014). La mayoría de las bacterias implicadas en el compostaje, al igual que en suelos, son Gram-positivas. Por lo tanto, la competencia que se encuentran las

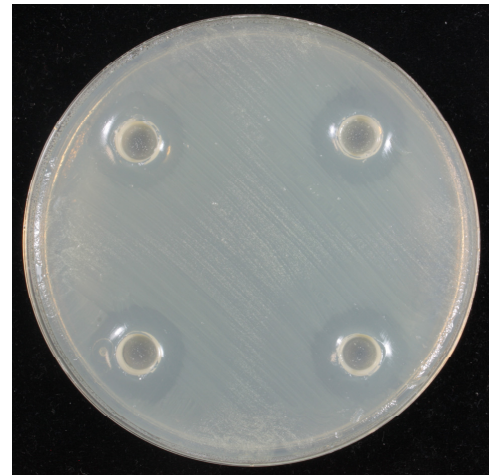
actinobacterias en estos ambientes está constituida mayoritariamente por bacterias Gram-positivas, por lo que producir sustancias activas frente a éstas, les supone una mayor ventaja competitiva. Esto podría ser una explicación de que la efectividad de los antimicrobianos producidos sea mayor contra Gram-positivos, ya que es un mecanismo efectivo para eliminar competencia (Waksman *et al.*, 2010). Además, diversos autores apuntan hacia este patrón de actuación, como la investigación de Manivasagan *et al.* (2014) que ha demostrado que las actinobacterias principalmente producen antibióticos frente a Gram-positivos. Otra posible explicación puede ser que la diana de acción de estos antibióticos sea la pared celular (ver sección I.2.a), de manera que las bacterias Gram-negativas poseen una membrana externa que rodea la capa de peptidoglicano, por lo que resulta más complicado que los antibióticos penetren en ellas (aunque existen poros hidrófilos en la membrana <100 kDa).

En resultados obtenidos por otros autores como Glukhova *et al.* (2018) los máximos halos de inhibición generados para *S. aureus* fueron de 25-35 mm. También destacan Quintero *et al.* (2018) que obtuvieron, para el mismo patógeno, halos más grandes de 21,2 mm y para *E. coli* tan solo de 11,6 mm. Schumacher *et al.* (2003) obtuvieron unos halos de aclaramiento mucho más modestos (9 mm para *E. coli* y 7 mm para *S. aureus*). Con los resultados obtenidos en el experimento de Quintero *et al.* (2018) concluyeron, que los antimicrobianos con alta actividad son aquellos con diámetro de la zona de inhibición ≥ 16 mm, actividad moderada con 11–16 mm, actividad baja con 7–11 mm y sin zona de inhibición cuando no apareció halo. De acuerdo con lo anterior, se puede decir que, en este experimento, frente a *E. coli* se obtuvo una actividad media-baja y para *S. aureus* una actividad media-alta como resultado promedio del experimento. Las fotografías reflejan la notable presencia de halos de inhibición (**Figuras IV.II y A.II en Anexo**).

2096. *Microbacterium hydrocarbonoxydans*

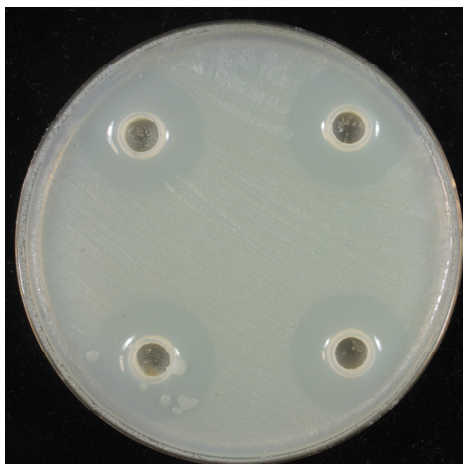


S. aureus

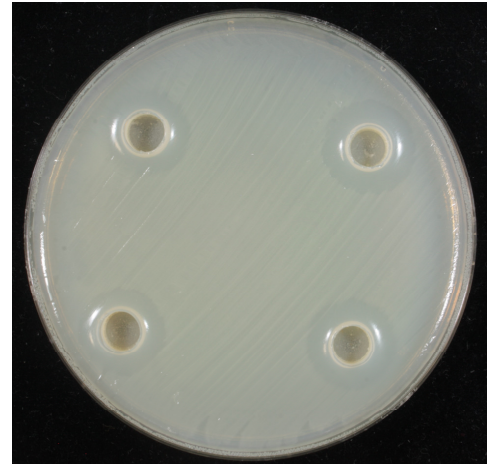


E. coli

2634. *Cellulosimicrobium funkei*



S. aureus



E. coli

Figura IV.II. Imágenes de los enfrentamientos más significativos, 2096 *Microbacterium hydrocarbonoxydans* (2096) y *Cellulosimicrobium funkei* (2634) frente a *E. coli* y *S. aureus*

2-Determinación de la concentración mínima inhibitoria

El cálculo de la CMI se basa en una técnica de determinación precisa de la concentración de antibiótico requerida para inhibir el crecimiento de un patógeno. Se fundamenta en una estimación de la biomasa celular por medición de la turbidez con métodos espectrofotométricos. Cuanto menor es el valor de absorbancia, menor la turbidez y eso implica un mayor efecto antimicrobiano ya que no se ha permitido el crecimiento del patógeno. El número CMI es la concentración más baja de un antibiótico que inhibe el crecimiento de una cepa dada y ayuda a determinar qué antibiótico es más eficiente (IDEXX, 2019).

Para esta fase del ensayo, se seleccionaron 20 de las cepas que originaron resultados positivos (todas ellas recogidas en la **Figura IV.II**); de las cuales 15 eran productoras de

antimicrobianos frente a ambos patógenos y 5 solo frente a uno de ellos (las 5 cepas con mayor halo de inhibición generado del ensayo frente a un solo patógeno). Se analizó el efecto antimicrobiano de los extractos teniendo como referencia el mínimo valor de absorbancia de los patógenos tipo situados como control del ensayo, considerándose como resultado positivo de inhibición aquellas diluciones (las 3 repeticiones para cada cepa frente a cada patógeno) que mostraron un valor de turbidez inferior a la media del observado en los controles de cada patógeno. Los valores obtenidos en la determinación de la concentración mínima inhibitoria se presentan en la **Tabla IV.II**.

Id General	Identidad	CMI Rep(E.coli)	CMI (S. aureus)
2096	<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i>	1/2	1/8
2634	<i>Cellulosimicrobium funkei</i>	1/4	1/4
281	<i>Cellulosimicrobium funkei</i>	1/2	1/4
722	<i>Rhodococcus indicum</i>	1/2	1/4
2124	<i>Corynebacterium stationis</i>	1/2	1/4
2147	<i>Corynebacterium stationis</i>	1/2	1/4
2441	<i>Jonesia denitrificans</i>	1/2	1/4
2618	<i>Microbacterium aerolatum</i>	1/2	1/4
816	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	1	1/4
515	<i>Microbacterium aerolatum</i>	1/2	1/2
2015	<i>Brevibacterium halotolerans</i>	1/2	1/2
2536	<i>Jonesia denitrificans</i>	1/2	1/2
2749	<i>Cellulosimicrobium funkei</i>	1/2	1/2
82	<i>Brevibacterium epidermidis</i>	1	1/2
276	<i>Jonesia denitrificans</i>	1	1/2
285	<i>Microbacterium xinjiangensis</i>	1	1/2
346	<i>Salinibacterium xinjiangense</i>	1	1/2
517	<i>Rhodococcus phenolicus</i>	1	1/2
2653	<i>Cellulosimicrobium funkei</i>	1	1/2
2794	<i>Rhodococcus gordoniae</i>	1	1/2

Tabla IV.II. Resultados de CMI obtenidos para las cepas que fueron examinadas en el ensayo.

Los resultados obtenidos en la prueba CMI mostraron un comportamiento claramente diferenciador en función del patógeno tipo ensayado. Para *S. aureus*, la mínima dilución que se obtuvo para la CMI fue de 1/2; mientras que para *E. coli*, se obtuvieron varios resultados con dilución 1:1 (**Tabla IV.II**), es decir, tan sólo se suprimía el crecimiento microbiano empleando el extracto acelular sin diluir. Estos resultados se apoyan en la idea explicada con anterioridad de que los antibióticos producidos por los actinomicetos son más efectivos frente a Gram-positivos. La cepa 2096 de *Microbacterium hydrocarbonoxydans* fue la única de todo el ensayo capaz de inhibir el crecimiento del patógeno Gram-positivo a una dilución del extracto acelular de 1/8. Además, hasta 8 cepas más del ensayo lograron alcanzar diluciones de 1/4 del extracto frente a *S. aureus*, lo que refleja que casi un 4 % de las cepas del ensayo completo fueron importantes productoras de sustancias bioactivas útiles frente a patógenos Gram-positivos. En cambio, los números fueron mucho más modestos con el ensayo de Gram-negativos, tan solo una cepa de 230 generó una sustancia capaz de inhibir el crecimiento del patógeno tipo de las Gram-negativas en diluciones inferiores a 1/2. Estos resultados despejan todas las posibles dudas de la capacidad de actuación de las moléculas producidas por estas cepas de actinobacterias.

Revisando estudios similares al presente, en el realizado por Quintero *et al.* (2018), obtuvieron una CMI de extractos acelulares de *Streptomyces* sp. con alto porcentaje de inhibición para la dilución 1/10. La mayor parte de los estudios han sido realizados para *Streptomyces* sp., por lo que este trabajo supone una innovación, ya que incluye bacterias del filo de actinobacterias que previamente no se han estudiado en su posible actividad antimicrobiana. Es relevante en el presente estudio realizado, la altísima variabilidad taxonómica de las cepas productoras de las sustancias antimicrobianas. Entre las 20 cepas seleccionadas se encuentran un total de 8 géneros distintos, *Cellulosimicrobium*, *Rhodococcus*, *Jonesia*, *Microbacterium*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Salinibacterium* y *Streptomyces*. De hecho, tan solo una cepa perteneció al género productor por excelencia de antibióticos, *Streptomyces* y en cambio, se detectó actividad antimicrobiana en cepas de géneros previamente no descritos como productores de antibióticos, como el género *Salinibacterium*. Este hecho, realza el valor del presente trabajo, ya que no se circunscribe a la generación de antibióticos clásicos aislados de cepas presentes en suelos de *Streptomyces* sp., sino que va mucho más allá, en entornos menos conocidos.

3-Correlación CMI y halos de inhibición. Análisis estadístico.

Una vez determinada para cada caso la concentración mínima inhibitoria, se correlacionaron los valores obtenidos con el diámetro de los halos de aclaramiento para cada cepa (Figuras IV.III y IV.IV). El estudio de los halos de inhibición permitió realizar un screening cualitativo/semi-cuantitativo y posteriormente, por medio de la determinación de la CMI se obtuvieron resultados cuantitativos con una mayor sensibilidad al efecto antimicrobiano.

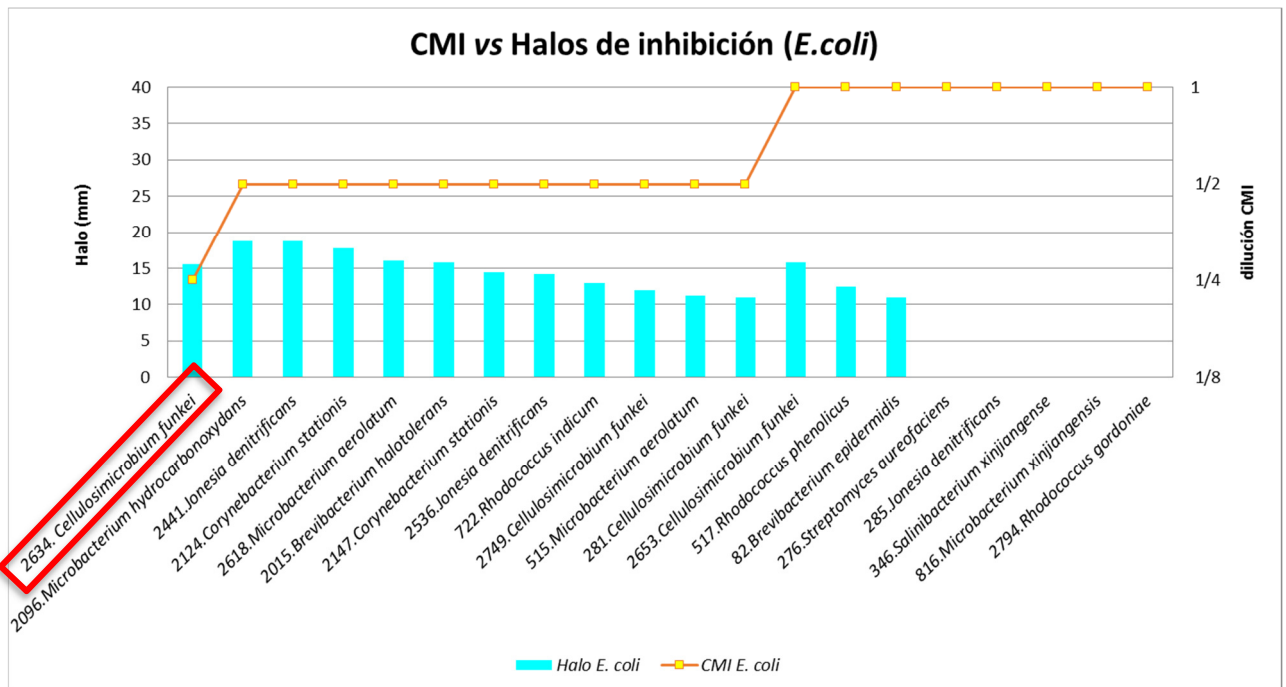


Figura IV.III. Correlación entre CMI y diámetros de halos de inhibición obtenidos para cada una de las cepas seleccionadas frente al patógeno Gram-negativo. Diámetro de halo versus tamaño de halo para cada una de las cepas.

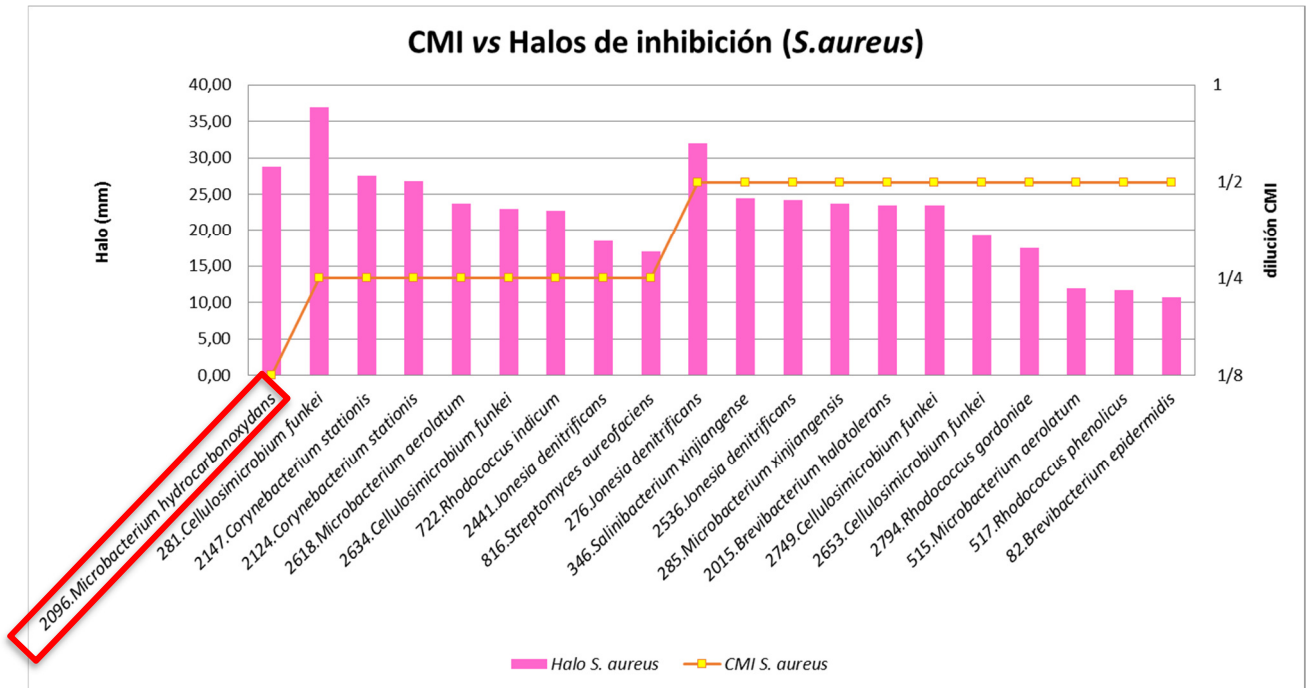


Figura IV.IV. Correlación entre CMI y diámetros de halos de inhibición obtenidos para cada una de las cepas seleccionadas frente al patógeno Gram-positivo. Diámetro de halo *versus* tamaño de halo para cada una de las cepas.

Ambos valores son medidas de sensibilidad al antibiótico por lo que cabía esperar que existiera una proporcionalidad inversa entre tamaño de halo y CMI, ya que a una mayor dilución del extracto del ensayo de CMI, el tamaño de halo generado debería ser mayor. Los resultados (**Figuras IV.III y IV.IV**) demuestran que, en líneas generales, se cumplió la proporcionalidad inversa entre halo y CMI, aunque en algunos casos se mostraron leves discrepancias. Para confirmar esta hipótesis, estos datos obtenidos se sometieron a un estudio estadístico de correlación con el programa Statgraphics. En este análisis se observó para ambos un valor negativo, ya que al aumentar una variable disminuía la otra; siendo para *E. coli* -0,72 ($p < 0,05$) y para *S. aureus* -0,38 ($p < 0,05$). Por lo tanto, para *E. coli*, el valor obtenido manifestó que existió buena correlación entre ensayos. Sin embargo, para *S. aureus* se obtuvo un valor que no reflejó una correlación adecuada entre parámetros, sin duda debido a la aparición de una elevada capacidad de inhibición del patógeno tipo por las 9 cepas que fueron efectivas a diluciones inferiores a 1/2. Pueden ser varias las causas de que no se haya encontrado una correlación estadística más poderosa, muchas de ellas indicadas en artículos como el de Picazo (2000), Bonev *et al.* (2008) o Pujol *et al.* (1997). Algunos de los principales factores influyentes en los resultados pueden ser la porosidad del medio, hidrofobicidad del compuesto o tamaño molecular entre otros. A pesar de que existen ciertas discrepancias, el experimento para *E. coli* demuestra que esta correlación existe y posiblemente modificando algunos parámetros se podría demostrar esta relación para los demás casos.

4- Cromatografía

La prácticamente ilimitada producción de compuestos de interés para el ser humano que poseen las actinobacterias, especialmente en el ámbito de la producción de medicamentos de carácter antimicrobiano (ver **Tabla A.1.** del **Anexo**), así como el alto número de especies implicadas en esta labor, como quedó reflejado anteriormente en la **Tabla IV.II**, hace inabordable mediante un trabajo de la naturaleza del presente, realizar un estudio genético intenso de la producción de antibióticos. Por tanto, en este caso el enfoque se cambió con el fin de aprovechar las potentes prestaciones de los equipos cromatográficos actuales en la detección de biomoléculas de interés sobre extractos acelulares de los agentes productores de moléculas bioactivas. Para esta etapa se seleccionaron 2 cepas productoras de antibióticos, una para cada patógeno, que habían originado buenos resultados tomando como primer criterio el valor de la CMI y como segundo criterio, el diámetro de los halos de inhibición. De esta manera, se seleccionaron las cepas indicadas con un recuadro rojo en la **Figura IV.III y IV.IV**: *Cellulosimicrobium funkei* (cepa 2634) y *Microbacterium hydrocarbonoxidans* (cepa 2096).

Las moléculas bioactivas son de naturaleza orgánica y pueden ser separadas por técnicas de HPLC. Esta técnica permite identificar compuestos volátiles y no volátiles (Shalini, 2002). Resulta de gran interés para identificar antibióticos ya que no está limitada por la volatilidad o la estabilidad térmica de la muestra; además, permite separar macromoléculas y especies iónicas, productos naturales lábiles, materiales poliméricos y una gran variedad de otros grupos polifuncionales de alto peso molecular. La resolución depende de la retención y selectividad de manera proporcional. En la **Figuras IV.V y IV.VI** se presentan los cromatogramas generados en el ensayo:

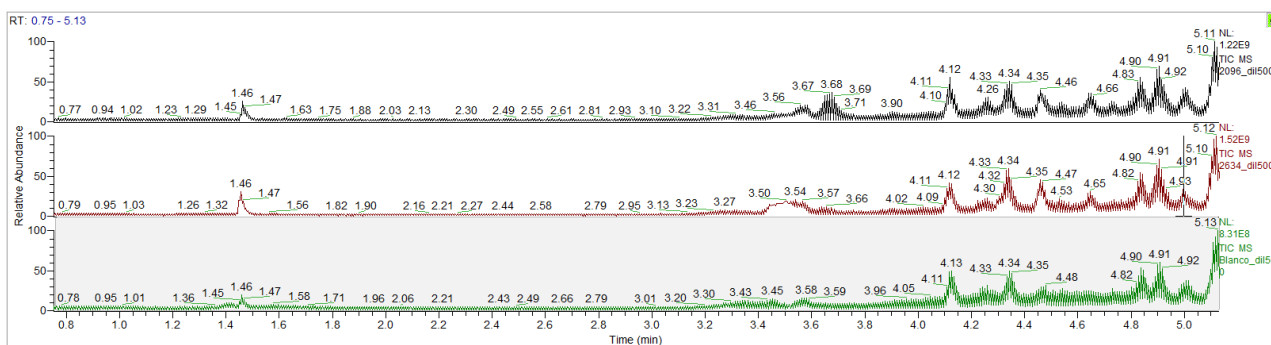


Figura IV.V. Cromatograma entre los tiempos inicial y 5 minutos efectuado a los extractos acelulares concentrados en metanol. La línea negra corresponde a la cepa 2096, la línea roja a la cepa 2634 y la línea verde al blanco del ensayo.

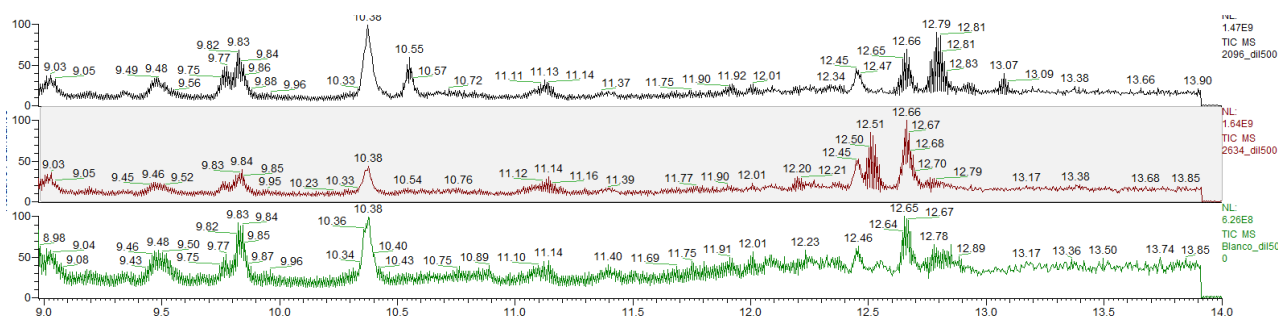


Figura IV.VI. Cromatograma entre los tiempos 9 y 14 minutos efectuado a los extractos acelulares concentrados en metanol. La línea negra corresponde a la cepa 2096, la línea roja a la cepa 2634 y la línea verde al blanco del ensayo.

La interpretación y el procesado de estos cromatogramas reveló una producción superior a 400 tipos de compuestos que cumplen las siguientes condiciones marcadas en el software de procesado (Compound Discoverer; Thermo Fisher):

- Existe entre 1 y 5 estructuras posibles compatibles con los datos obtenidos, y coinciden con estructuras disponibles en la base de datos ChemSpider.
- Tienen al menos una asignación (nombre).
- Tienen una abundancia de al menos 10.000 cuentas (una abundancia por debajo de un umbral mínimo).
- No están presentes en el blanco, o lo están en muy baja proporción.

Entre los más de 400 compuestos detectados, existe más de una treintena con aplicación reconocible a partir de bases de datos, bien para su uso como agente antibiótico, bien para su uso como fármacos de diversa índole. De hecho, por motivos de confidencialidad, estos resultados se publican parcialmente en el presente trabajo. De hecho, la labor de investigación con toda esta base de datos de compuestos generada fue, es y será ardua, ya que el hecho de que en torno a 370 de ellos no tengan una utilidad reconocida responde tan solo a la ausencia de ensayos que puedan corroborarlo. Aun así, en este trabajo se aportan resultados de notable relevancia. En los cromatogramas se observaron varios picos de interés a lo largo de la carrera generada que fueron bastante reveladores. Concretamente la cepa 2096 generó un pico considerable a los 10,55 minutos de tiempo de retención y la cepa 2634 lo generó a los 3,52 minutos. En ellos se detectaron la producción de las moléculas mostradas en la **Tabla IV.III**:

Tiempo de retención	Masa monoisotópica	Masa molecular media	Fórmula molecular	Molécula	ID
10,55 min	360,362 g/mol	360,639 g/mol	C ₂₅ H ₄₆ N	Benzylcetyldimethylammonium	28944
10,55 min	267,293 g/mol	267,501 g/mol	C ₁₈ H ₃₇ N	Oleylamine	5356789
3,52 min	245,095 g/mol	245,285 g/mol	C ₁₆ H ₁₁ N ₃	Paprotain	12248889
3,52 min	159,068 g/mol	159,188 g/mol	C ₁₀ H ₉ NO	8-Methoxyquinoline	70310

Tabla IV.III. Moléculas producidas por las cepas seleccionadas del ensayo (Bases de datos ID empleadas Chemspider y Pubchem).

Hay que señalar que, como se menciona anteriormente, las cepas son productoras de una mayor cantidad de sustancias de interés que la reflejada en la **Tabla IV.III** y que, además, este estudio no supera el estado de presuntivo, ya que la producción todas estas moléculas deben de ser confirmadas en mayor profundidad con estudios tanto químicos como genéticos que puedan dar a conocer con detalle el verdadero potencial de estas cepas de actinobacterias. Pero el potencial de las moléculas detectadas en la cromatografía no puede ser desdeñado, ya que entre las cuatro moléculas detectadas se encuentran fármacos con capacidad antiséptica reconocida como el Benzylcetyldimethylammonium, fármacos usados en estudios muy prometedores frente al cáncer o patologías neurodegenerativas como el Alzheimer (Labrière *et al.*, 2016). Parece que la estrategia empleada, por cada una de las cepas, para afectar el crecimiento microbiano fue distinta. La cepa 2096 perteneciente a *Microbacterium hydrocarbonoxidans* generó Benzylcetyldimethylammonium, una molécula antibiótica y Oleylamine, una molécula con capacidad adhesiva usada en la industria y que posee un potencial uso biomédico (Georgiadou *et al.*, 2014). En cambio, la cepa 2634 perteneciente a *Cellulosimicrobium funkei* generó Paprotrain, una molécula empleada para el tratamiento del cáncer, y 8-Methoxyquinoline otra molécula bioactiva con amplios usos biomédicos. Estos resultados confirman una evidencia clara en el trabajo: si bien la producción de antibióticos en el género *Streptomyces* es tan amplia que nunca parece tener fin (López, 2018), existen muchas especies del filo *Actinobacteria* capaces de generar compuestos de un interés indudable y que con frecuencia parecen haber sido dejadas de lado en favor de *Streptomyces*.

V. Conclusiones

- 1- El proceso de compostaje supone una fuente de microorganismos de interés biotecnológico indudable, donde el Phylum Actinobacteria presenta una notable importancia en la búsqueda de nuevas moléculas capaces de generar efecto antibiótico, ante el fenómeno creciente de la resistencia microbiana a los antibióticos empleados tradicionalmente.
- 2- La generación de antibióticos en el entorno del compostaje no se adscribe únicamente al género promotor del mayor número de antibióticos conocido, *Streptomyces*, sino que otros géneros como *Cellulosimicrobium*, *Rhodococcus*, *Jonesia*, *Salinibacterium* o *Microbacterium* entre otros, son capaces de producir compuestos activos frente a patógenos humanos tipo de interés.
- 3- Las cepas de actinomicetos evaluadas en el ensayo producen sustancias antibióticas con mayor capacidad supresora del crecimiento de patógenos humanos Gram-positivos, aunque también se detectó la generación de compuestos antimicrobianos de amplio espectro por una parte de la microbiota analizada.

- 4- Los ensayos de Concentración Mínima Inhibitoria fueron, con claridad, más precisos que los ensayos iniciales de antagonismo *in vivo* para evaluar la capacidad antibiótica de una cepa, ya que permitieron conocer con exactitud el rango de actuación del antimicrobiano generado por las actinobacterias.
- 5- Las cepas seleccionadas en base a sus resultados en ensayos antagonistas *in vivo* y la Concentración Mínima Inhibitoria fueron presuntivas de la producción de moléculas bioactivas con interés sanitario, no solo como antimicrobianos, sino con potencial biomédico para el tratamiento del cáncer o de patologías neurodegenerativas.

VI. Bibliografía

- Allen N.E. y Nicas T.I. (2003). Mechanism of action of oritavancin and related glycopeptide antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 26: 511-532.
- Andrews S.A., Lee H. y Trevors J.T. (1994). Bacterial species in raw and cured compost from a large-scale urban composter. *Journal of Industrial Microbiology*, 13: 177-182.
- Babouee F.B., Ellington M.J., Hopkins K.L., Turton J.F., Doumith M., Loy R., Staves P., Hinic V., Frei R. y Woodford N. (2016). Association of Novel Nonsynonymous Single Nucleotide Polymorphisms in ampD with Cephalosporin Resistance and Phylogenetic Variations in ampC, ampR, ompF, and ompC in *Enterobacter cloacae* Isolates That Are Highly Resistant to Carbapenems. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60: 2383-2390.
- Bauer A.W., Kirby W. M. M., Sherris J. C. y Turck M. (1996) Antibiotic Susceptibility Testing, by a Standardized Single Disk Method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45: 493-496.
- Belyaeva O.N., Haynes R.J. y Sturm E.C. (2012). Chemical, physical and microbial properties and microbial diversity in manufactured soils produced from co-composting green waste and biosolids. *Waste Management*, 32: 2248-2257.
- Benveniste R. y Davies J. (1973). Aminoglycoside antibiotic activating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 70: 2276-2280.
- Bérdy, J. (2005). Bioactive Microbial Metabolites. *The Journal of Antibiotics*, 58: 1-26.
- Betrán A., Cortés A.M., López C. (2015). Evaluación de la resistencia antibiótica de *Escherichia coli* en infecciones urinarias adquiridas en la comunidad del Sector Sanitario de Barbastro (Huesca). *Revista Española de Quimioterapia*, 28: 263-266.
- Bidlingmaier W. (1996). Odour emissions from composting plants. En: De Bertoldi M., Sequi P., Lemmes B. y Papi T. (Eds.). *The Science of Composting*, vol. I, pp. 71-79. Blackie Academic & Professional, London.
- Bikard, D. y Barrangou, R. (2017). Using CRISPR-Cas systems as antimicrobials. *Current Opinion in Microbiology*, 37: 155-160.
- Bonev B., Hooper J. y Parisot J. (2008). Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61: 1295-1301.

- Brinton W.F., Evans E. y Blewett. T.C. (2006). Reliability of bioassay tests to indicate herbicide residues in compost of varying salinity and herbicide levels. *Compost Science & Utilization*, 14: 244-251.
- Brown E.D. y Wright G.D. (2016). Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature*, 529: 336-343.
- Brüssow H. (2017). Phage therapy for the treatment of human intestinal bacterial infections: son to be a reality? *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 11: 785-788.
- Bueno P., Tapias R., Lopez F. y Diaz M.J. (2008). Optimizing composting parameters for nitrogen conservation in composting. *Bioresource Technology*, 99: 5069-5077.
- Cahyani V.R., Matsuya K., Asakawa S. y Kimura M. (2004). Succession and phylogenetic profile of methanogenic archaeal communities during the composting process of rice straw estimated by PCR-DGGE analysis. *Soil Science and Plant Nutrition*, 50: 555-563.
- Calretas-Machado-Dias T.L. (2013). Estudo da biodiversidade em actinobactérias marinhas, provenientes de sedimentos oceânicos colhidos no Arquipélago da Madeira. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia.
- Calvo J. y Martínez-Martínez L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27: 44-52.
- Carlson J.C., Shengying L., Douglas A.B. y, Sherman D.H. (2009). Isolation and Characterization of Tirandamycins from a Marine-Derived *Streptomyces* sp. *Journal of Nature Products*, 11: 2076-2079.
- Crofts T.S., Gasparrini A.J. y Dantas G. (2017). Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome. *Nature Reviews Microbiology*, 15: 422-434.
- Cruz-López H. (2015). Aislamiento de actinomicetos presentes en sedimentos marinos de Loreto, Baja California Sur y su evaluación como posible fuente de moléculas antimicrobianas. Tesis Universidad Autónoma De Baja California. California.
- Currie C.R., Scott J.A., Summerbell R.C. y Malloch D. (1999). Erratum: Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature*, 398: 701-704.
- Donadio S., Sonia I., Maffioli I., Zhang Y., Degen D., Dehò G. y Ebright R.H. (2017). Antibacterial Nucleoside-Analog Inhibitor of Bacterial RNA Polymerase. *Cell*, 169: 1240-1248.
- Donald P.R. y McIlleron H. (2009). Tuberculosis. A comprehensive clinical reference. Chapter 59: Antituberculosis drugs. pp. 608-617.
- Ejim L. Farha M.A., Falconer S.B., Wildenhain J., Coombes B.K., Tyers M., Brown E.D. y Wright G.D. (2011). Combinations of antibiotics and nonantibiotic drugs enhance antimicrobial efficacy. *Nature Chemical Biology*, 7: 348-350.
- Evangelista-Martínez Z. (2014). Isolation and characterization of soil *Streptomyces* species as potential biological control agents against fungal plant pathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30: 1639-1647.
- Gallagher K.A. (2015). Ecology and Evolution of Hybrid Isoprenoid Secondary Metabolite Production in a *Streptomyces* Lineage. A dissertation submitted for the degree of Doctor of Philosophy. California Digital Library. University of California, San Diego.

- Georgiadou V, Kokotidou C, Le Droumaguet B, Carbonnier B, Choli-Papadopoulou T, Dendrinou-Samara C. (2014). Oleylamine as a beneficial agent for the synthesis of CoFe_2O_4 nanoparticles with potential biomedical uses. *Dalton Transactions*, 43: 6377-6388.
- Glukhova A.A., Karabanova A.A., Yakushev A.V., Semenyuk I.I., Boykova Y.V., Malkina N.D., Efimenko T.A., Ivankova T.D., Terekhova L.P. y Efremenkova O. (2018). Antibiotic Activity of Actinobacteria from the Digestive Tract of Millipede *Nedyopus dawydoffiae* (Diplopoda). *Antibiotics*, 7: E94.
- Golueke C.G. (1992). Bacteriology of composting. *Biocycle*, Jan: 55-57.
- Gonzales P.R., Pesesky M.W., Bouley R., Ballard A., Biddy B.A., Suckow M.A., Wolter W.R., Schroeder V.A., Burnham C.A., Mobashery S., Chang M. y Dantas G. (2015). Synergistic, collaterally sensitive β -lactam combinations suppress resistance in MRSA. *Nature Chemical Biology*, 11: 855-861.
- Gonzalez-Ruiz A., Seaton R.A. y Hamed K. (2016). Daptomycin: an evidence-based review of its role in the treatment of Gram-positive infections. *Infection and drug resistance*, 9: 47-58.
- Gorodecki B. y Hadar Y. (1990). Suppression of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* diseases in container media containing composted separated cattle manure and composted grape marc. *Crop Protection*, 9: 271-274.
- Gould J.C. (1957). Origin of Antibiotic-Resistant Staphylococci. *Nature*, 180: 282-283.
- Grave K., Torren-Edo J. y Mackay D. (2010). Comparison of the sales of veterinary antibacterial agents between 10 European countries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65: 2037-2040.
- Haruta S., Nakayama T., Nakamura K., Hemmi H., Ishii M., Igarashi Y. y Nishino T. (2005). Microbial diversity in biodegradation and reutilization processes garbage. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99: 1-11.
- Haugh R.T. (1993). The practical Handbook of Compost Engineering. Lewis Publishers. Boca Raton. Florida.
- Horvath P. y Barrangou R. (2010). CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea. *Science*, 5962: 167-170.
- Hwang W. y Yoon S.S. (2019). Virulence Characteristics and an Action Mode of Antibiotic Resistance in Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, 9: 487.
- IDEXX (2019). Microbiology guide to interpreting minimum inhibitory concentration (MIC). Diagnostic update. <https://www.idexx.com/files/microbiology-guide-interpreting-mic.pdf> Consultado junio 2019.
- Jeris J. S. y Regan R. W. (1973). Controlling environmental parameters for optimum composting. Part II, *Compost Science*, 14: 8-15.
- Jose P.A., Sivakala K.K., Rajeswari P. y Jebakumar S.R.D. (2014). Characterization of antibiotic producing rare actinomycete *Nonomuraea* sp. JAJ18 derived from an Indian coastal solar saltern. *The Scientific World Journal*, 2014: 456070.
- Jurado M.M., Suárez-Estrella F., Vargas-García M.C., López M.J., López-González J.A. y Moreno J. (2014). Evolution of enzymatic activities and carbon fractions throughout composting of plant waste. *Journal of Environmental Management*, 133: 355-364.

- Katayama Y., Ito T. y Hiramatsu K. (2000). A new class of genetic element, *Staphylococcus* cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44: 1549-1555.
- Kossuga H.M. (2008). Metabólitos Secundários Bioativos de Invertebrados Marinhos: Isolamento, Determinação Estrutural e Atividades Biológicas. Universidade de Sao Paulo. Instituto de Química de Sao Carlos.
- Krylov, V.N. (2001). Phage Therapy in Terms of Bacteriophage Genetics: Hopes, Prospects, Safety, Limitations. *Russian Journal of Genetics*, 37: 715-730.
- Kwon H.C., Kauffman C.A., Jensen P.R. y Fenical W. (2006). Marinomycins A-D, antitumor-antibiotics of a new structure class from a marine actinomycete of the recently discovered genus "*Marinispora*". *Journal of the American Chemical Society*, 128: 1622-1632.
- Labrière C, Lozach O, Blairvacq M, Meijer L, Guillou C. (2016). Further investigation of Paprotrain: Towards the conception of selective and multi-targeted CNS kinase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 124: 920-934.
- Laich F. (2011). El papel de los microorganismos en el proceso de compostaje. Jornada Técnica: Fertilidad y Calidad del Suelo. Experiencias de fertilización orgánica en platanera. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias. ICIA. Proyecto BIOMUSA 7.
- López J.A. (2018). Virus: Ni vivos ni muertos. pp. 221-235. Almuzara, Córdoba.
- López-González J.A., López M.J., Vargas-García M.C., Suárez-Estrella F., Jurado M.M. y Moreno J. (2013). Tracking organic matter and microbiota dynamics during the stages of lignocellulosic waste composting. *Bioresource Technology*, 146: 573-584.
- López-González J.A., Vargas-García M.C., López M.J., Suárez-Estrella F., Jurado M.M. y Moreno J. (2015). Biodiversity and succession of microbiota associated to agricultural lignocellulosic waste-based composting. *Bioresource Technology*, 187: 305-313.
- Lu T.K. y Koeris M.S. (2011). The next generation of bacteriophage therapy. *Current Opinion in Microbiology*, 14: 524-531.
- Mahajan G.B. y Balachandran L. (2012). Antibacterial agents from actinomycetes - A Review. *Frontiers in Bioscience*, E4: 240-253.
- Makan A., Assobhei O. y Mountadar M. (2013). Effect of initial moisture content on the in-vessel composting under air pressure of organic fraction of municipal solid waste in Morocco. *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering*, 10: 3.
- Manivasagan P., Venkatesan J., Sivakumar K. (2014). Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. *Microbiological Research*, 169: 262-278.
- Molina J.J., Cordero E., Palomino J.J. y Pachón J.J. (2009). Aminoglucósidos y polimixinas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 3: 139-196.
- Moreno J. y Mormeneo S. (2011). Microbiología y bioquímica del proceso de compostaje. En: Moreno J. y Moral R. Compostaje. pp. 111-140. Mundi-prensa, Madrid.
- Moreno J., López M.J., Vargas-García M.C. y Suárez-Estrella F., (2013). Recent advances in microbial aspects of compost production and use. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 1013: 443-457.

- Motta A. y Brandelli A. (2002). Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *Journal of Applied Microbiology*, 92: 63-70.
- Neher D. A., Weicht T.A., Bates S.T., Leff J.W. y Fierer N. (2013). Changes in Bacterial and Fungal Communities across Compost Recipes, Preparation Methods, and Composting Times. *PLoS ONE*, 8: e79512.
- Neu H.C. (1969). Effect of β -lactamase location in *Escherichia coli* on penicillin synergy. *Applied Microbiology*, 17: 783-786.
- Nicoloff H., Hjort K., Levin B.R. y Andersson D.I. (2019). The high prevalence of antibiotic heteroresistance in pathogenic bacteria is mainly caused by gene amplification. *Nature Microbiology*, 4: 504-514.
- Niyogi S.K. y Pazhani G.P. (2003). Multiresistant *Shigella* species isolated from childhood diarrhea cases in Kolkata, India. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 56: 33-34.
- Ntougias S., Papadopoulou K.K., Zervakis G.I., Kavroulakis N. y Ehalotis C. (2008). Suppression of soil borne pathogens of tomato by composts derived from agroindustrial wastes abundant in Mediterranean regions. *Biology and Fertility of Soils*, 44: 1081-1090.
- Parada R.B., Margaret E.R. y Vallejo M. (2017). Isolation and partial characterization of soils actinomycetes with antimicrobial activity against multidrug-resistant bacteria. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 2: 15-23.
- Penick C.A., Halawani O., Pearson B., Mathews S., López-Urbe M.M., Dunn R.R. y Smith A.A. (2018). External immunity in ant societies: sociality and colony size do not predict investment in antimicrobials. *Royal Society Open Science*, 5: 171332.
- Picazo J.J. (2000). Métodos básicos para el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- Piddock L.J. (2006). Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 19: 382-402.
- Pujol J., Guarro J., Sala J. y Riba M.D. (1997). Effects of incubation temperature, inoculum size, and time of reading on broth microdilution susceptibility test results for Amphotericin B against *Fusarium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41: 808-811.
- Quintero M., Velásquez A., Jutinico L.M., Jiménez-Vergara E., Blandón L.M., Martínez K., Lee H. S. y Gómez-León J. (2018). Bioprospecting from marine coastal sediments. *Journal of Applied Microbiology*, 125: 753-765.
- Reina J., y Reina N. (2018). Fagoterapia ¿una alternativa a la antibioticoterapia? [Phage therapy, an alternative to antibiotic therapy?]. *Revista Española de Quimioterapia*, 31: 101-104.
- Roberts M.C. (1996). Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiology Reviews*, 19: 1-24.
- Ruiz B., Chávez A., Forero A., García-Huante Y., Romero A., Sánchez M., Rocha D., Sánchez B., Rodríguez-Sanoja R., Sánchez S. y Langley E. (2010). Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. *Critical Reviews in Microbiology*, 36: 146-167.
- Ryan K.J. y Ray C.G. (2017). Sherris. Microbiología médica (6ª edición). MacGraw-Hill, Madrid.

- Ryckeboer J., Mergaert J., Vaes K., Klammer S., De Clercq D., Coosemans J., Insam H., y Swings J. (2003). A survey of bacteria and fungi occurring during the composting and self heating processes. *Annals of Microbiology*, 53: 349-410.
- Sánchez-Monedero M.A., Roig A., Paredes C. y Bernal M.P. (2001). Nitrogen transformation during organic waste composting by the Rutgers system and its effects on pH, EC and maturity of the composting mixtures. *Bioresource Technology*, 78: 301-308.
- Sánchez San Fulgencio N., Suárez-Estrella F., López M.J., Jurado M.M., López-González J.A., y Moreno J. (2018). Biotic aspects involved in the control of damping-off producing agents: The role of the thermotolerant microbiota isolated from composting of plant waste. *Biological Control*, 124: 82-91.
- Schofield, C.J. (2018). Antibiotics as food for bacteria. *Nature Microbiology*, 3: 752-753.
- Schumacher R.W., Talmage S.C., Miller S.A., Sarris K.E., Davidson B.S. y Goldberg A. (2003). Isolation and Structure Determination of an Antimicrobial Ester from a Marine Sediment-Derived Bacterium. *Journal of Natural Products*, 66: 1291-1293.
- Sebahia M., Wren B.W., Mullany P., Fairweather N.F., Minton N., Stabler R., Thomson N.R., Roberts A.P., Cerdeño-Tárraga A.M., Wang H., Holden M.T., Wright A., Churcher C., Quail M.A., Baker S., Bason N., Brooks K., Chillingworth T., Cronin A., Davis P., Dowd L., Fraser A., Feltwell T., Hance Z., Holroyd S., Jagels K., Moule S., Mungall K., Price C., Rabinowitch E., Sharp S., Simmonds M., Stevens K., Unwin L., Whithead S., Dupuy B., Dougan G., Barrell B. y Parkhill J. (2006). The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome. *Nature Genetics*, 38: 779-786.
- Selvameenal L., Radhakrishnan M. y Balagurunathan R. (2009). Antibiotic pigment from desert soil actinomycetes; biological activity, purification and chemical screening. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71: 499-504.
- Shalini J. (2002). HPLC separation of antibiotics present in formulated and unformulated samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28: 795-809.
- Shaw W.V., Packman L.C., Burleigh B.D., Dell A., Morris H.R. y Hartley B.S. (1979). Primary structure of a chloramphenicol acetyltransferase specified by R plasmids. *Nature*, 282: 870-872.
- Suárez C. y Gudíol F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2: 67-138.
- Suárez-Estrella F., Vargas-García C., López M.J., Capel C. y Moreno J. (2007). Antagonistic activity of bacteria and fungi from horticultural compost against *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*. *Crop Protection*, 26: 46-53.
- Sun J., Yang R.S., Zhang Q., Feng Y., Fang L.X., Xia J., Li L., Lv X.Y., Duan J.H., Liao X.P. y Liu, Y.-H. (2016). Co-transfer of bla_{NDM-5} and mcr-1 by an IncX3–X4 hybrid plasmid in *Escherichia coli*. *Nature Microbiology*, 1: 16176.
- Wakisaka Y., Koizumi K. y Nishimoto Y. (1982). A preferential isolation procedure for asporogenous Gram-positive bacteria. *The Journal of Antibiotics*, 35: 441-449.
- Waksman S. A., Schatz A., Reynolds D. M. (2010). Production of antibiotics substances by actinomycetes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1213: 112-124.

- Wang C, Gou X., Deng H., Dong D., Tu Q. y Wu W. (2014). New insights into the structure and dynamics of actinomycetal community during manure composting. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98: 3327-3337.
- Wertheim H.F., Verveer J., Boelens H.A., van Belkum A., Verbrugh H.A. y Vos M.C. (2005). Effect of mupirocin treatment on nasal, pharyngeal, and perineal carriage of *Staphylococcus aureus* in healthy adults. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49: 1465-1467.
- WHO (2011). Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe. World Health Organization. http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0005/136454/e94889.pdf Consultado junio 2019.
- WHO (2014). Antimicrobial resistance. Global report on surveillance 2014. World Health Organization. <https://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/> Consultado junio 2019.
- WHO (2017). Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug resistant bacterial infections, including tuberculosis. World Health Organization. https://www.who.int/medicines/areas/rational_use/PPLreport_2017_09_19.pdf Consultado junio 2019.
- Wright G.D. (2016). Antibiotic adjuvants: rescuing antibiotics from resistance. *Trends in Microbiology*, 24: 862-871.
- Yang W., Moore I., Koteva K., Bareich D., Hughes D. y Wright G. (2004). TetX is a flavin-dependent monooxygenase conferring resistance to tetracycline antibiotic. *The Journal of Biological Chemistry*, 279: 52346-52352.
- Zhu N.W. (2006). Composting of high moisture content swine manure with corncob in a pilot-scale aerated static bin system. *Bioresource Technology*, 97: 1870-1875.

Anexos

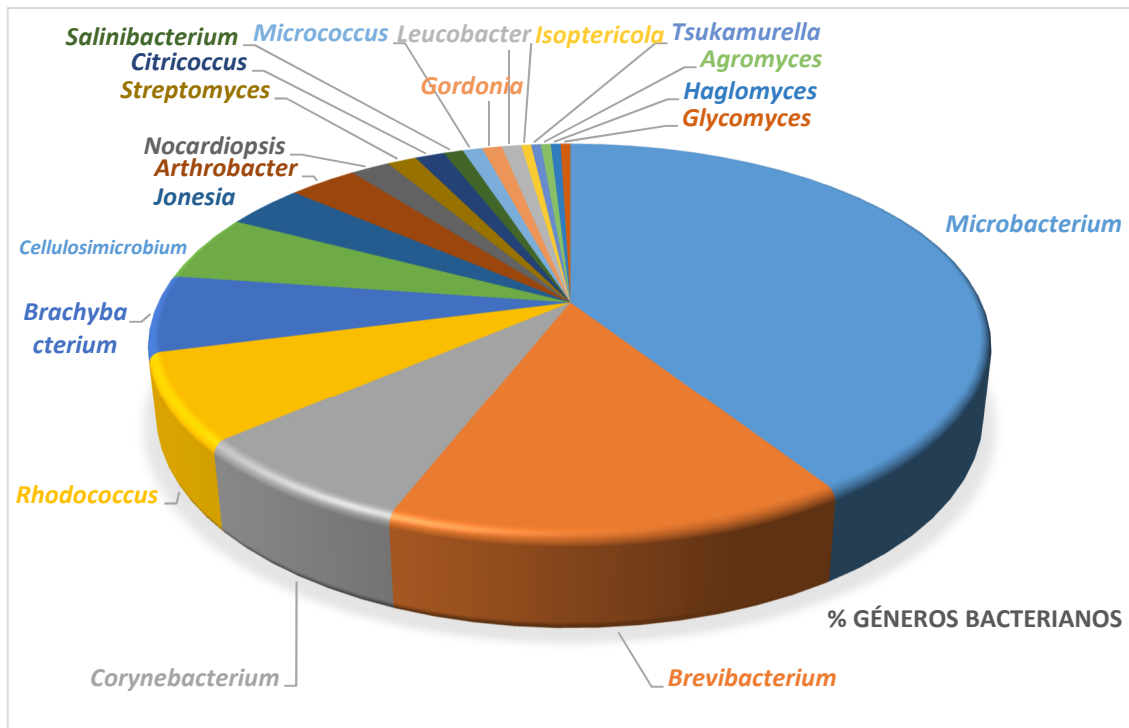
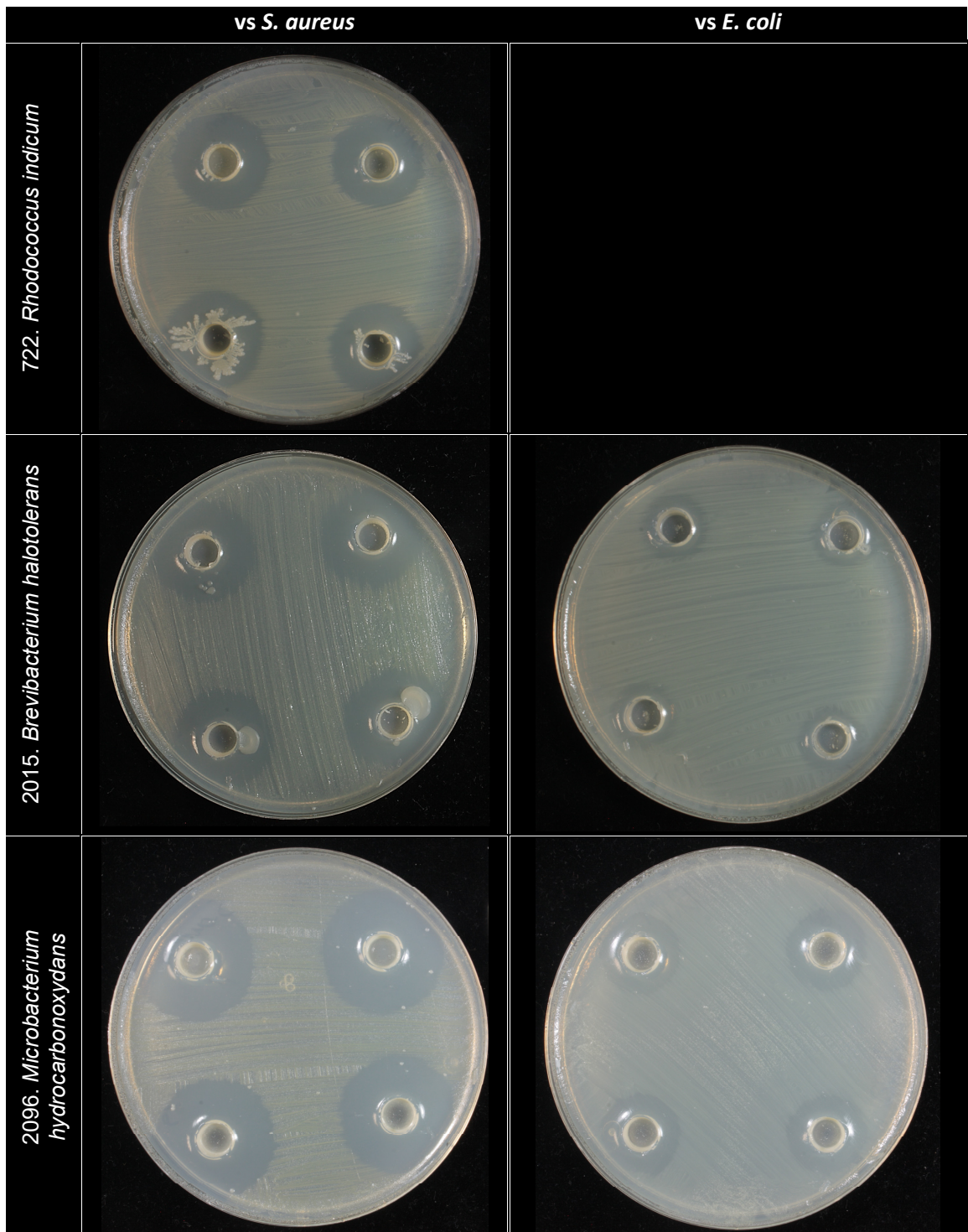
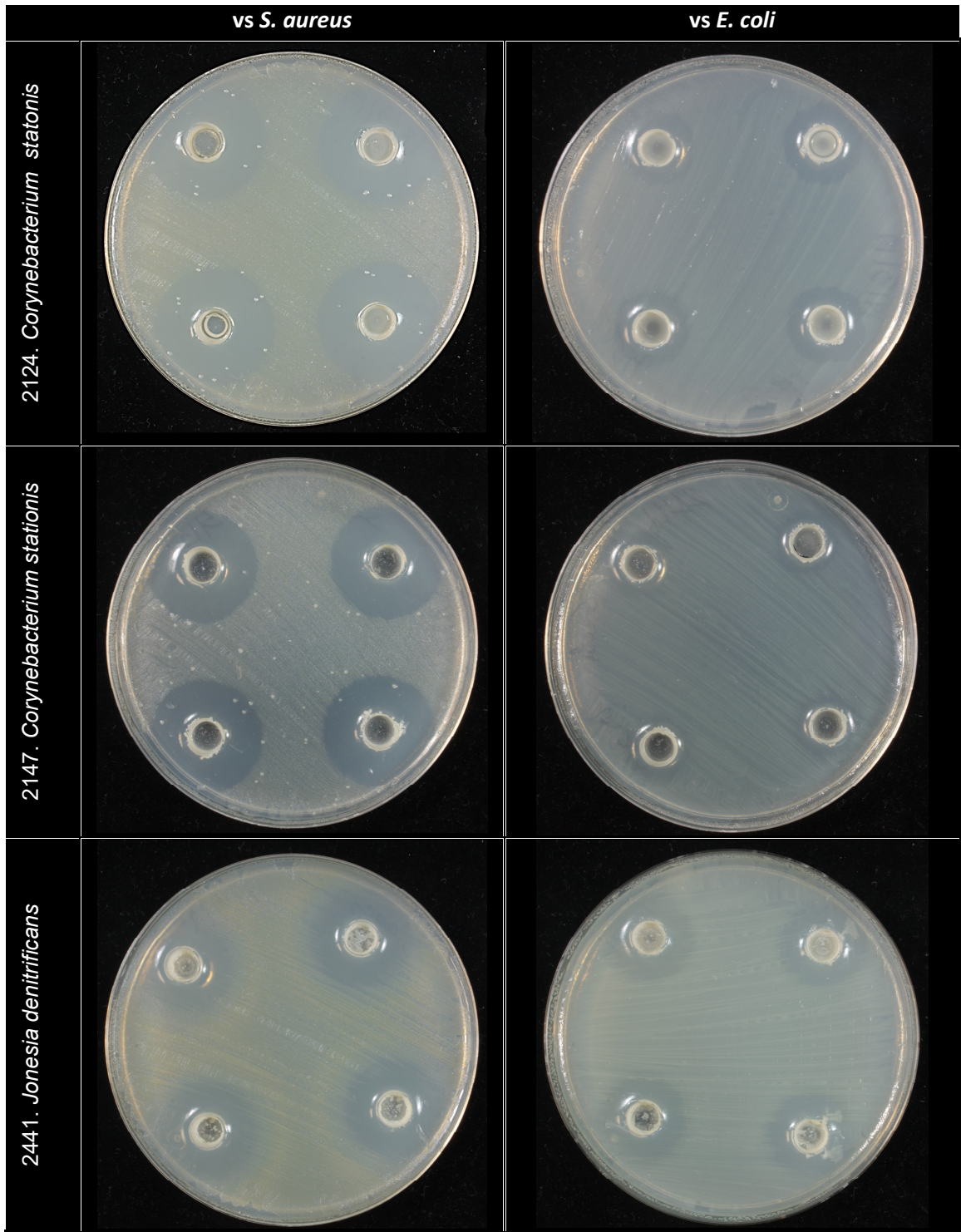
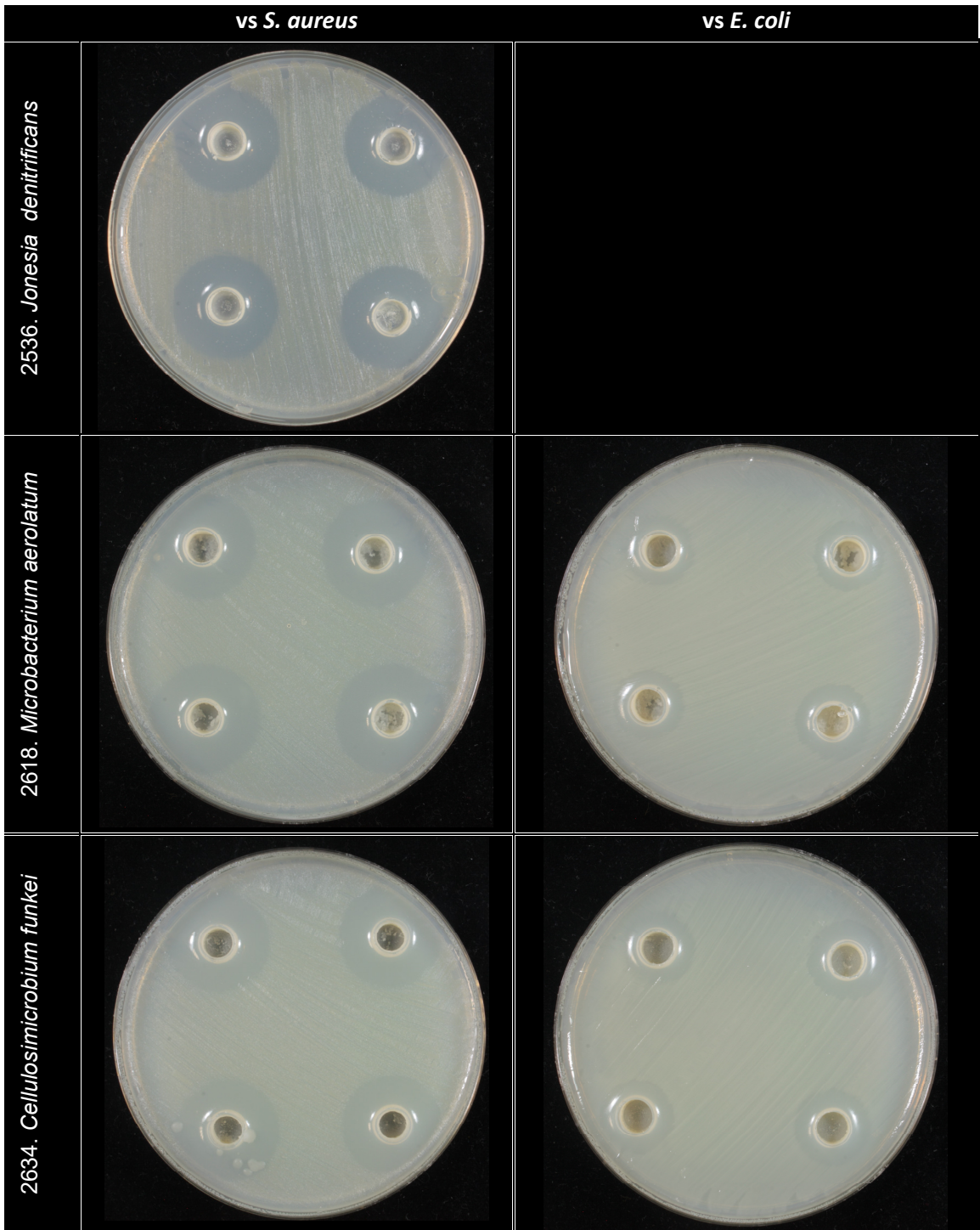


Figura A.I. Porcentaje de géneros de actinobacterias usados para este trabajo.







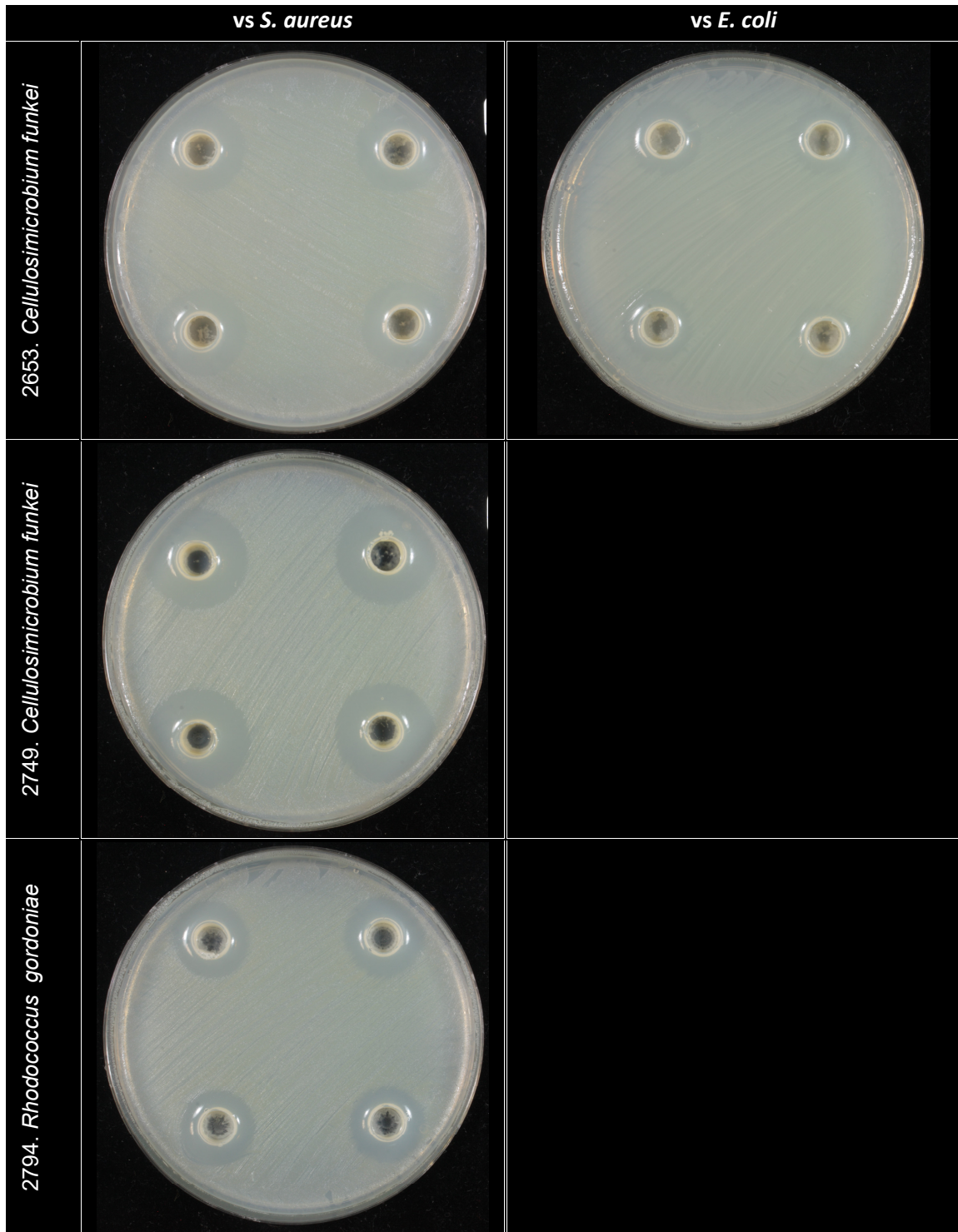
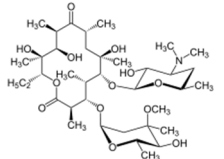
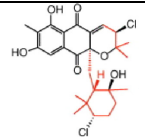
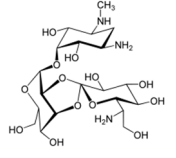
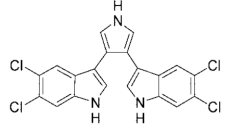
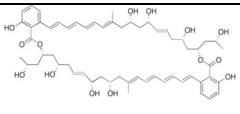
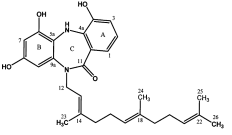
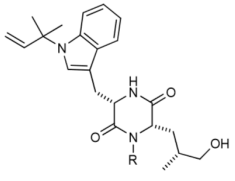
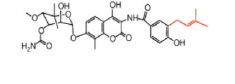
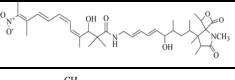
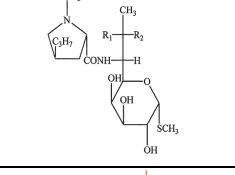
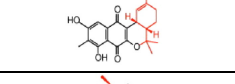
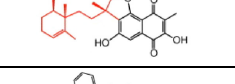
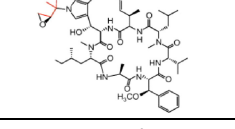
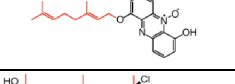
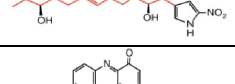
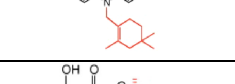
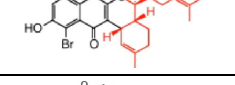
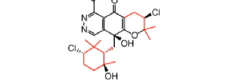
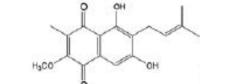
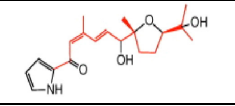
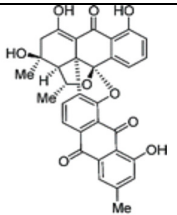
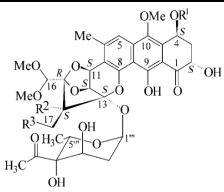
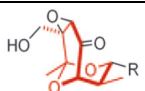
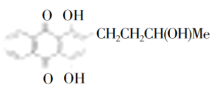
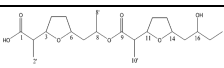
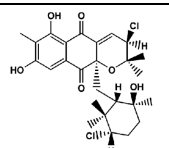
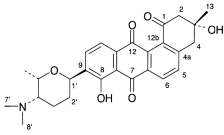
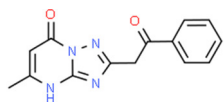


Figura A.II. Fotografías de las placas más representativas del ensayo *in vivo* seleccionadas para CMI tras el periodo de incubación.

Cepa productora original	Antibiótico	Estructura	Acción	Molécula
<i>Arthrobacter</i> sp. y <i>Streptomyces erytherus</i> ,.	Eritromicina	Macrólido	Interfiere en la síntesis proteica bacteriana a nivel de subunidad 50S ribosomal de gram-positivos	
<i>Brevibacterium linens</i> M18	Linocina M18	No descrita	Inhibe el crecimiento de <i>Listeria</i> spp., varias corniformes y otras bacterias gram-positivas.	No descrita
<i>Brevibacterium linens</i> ATCC 9175	Linecina A	No descrita	Pequeño espectro de acción antimicrobiana	No descrita
<i>Brevibacterium linens</i> OC2	Linenscin OC2	No descrita	Inhibe gram-positivos, pero no gram-negativos	No descrita
<i>Chania rubra</i> MG802AF1	Napiradiomicina	Terpenoide con andamio de naftoquinona	Propiedades antibióticas y citotóxicas. Efectivo frente a <i>S. aureus</i> resistente a meticilina	
<i>Corynebacterium equi</i> y <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Higromicina y epihigromicina (epímero de higromicina)	Aminoglicósido	Epihigromicina resulta menos activa frente a gram negativas que higromicina. Efecto bactericida, actúa sobre los ribosomas de bacterias, hongos y células eucariotas provocando la producción de proteínas anómalas, inhibiendo así la síntesis proteica.	
<i>Corynebacterium</i> sp.	Corinecinas	El sustituyente N-dicloroacetilo del cloranfenicol se encuentra reemplazado por un resto acilo		
<i>Janibacter lismonus</i>	Helquinolina			
<i>Manispora</i> sp.	Linamicinas	Pirroles clorinados	Efectivo contra gram-positivas y gram-negativos. Resultó eficaz contra <i>S. aureus</i> resistentes a meticilina y <i>Enterococcus faecium</i> resistentes a vacomicina	
<i>Manispora</i> sp.	Marinomicina	Macrodiólidos compuestos de lactonas de ácido dimérico 2-hidroxi-6-alquenil-benzoico con cadenas de tetraeno-pentahidroxi policétido conjugado	Efectivo frente a <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina y <i>Enterococcus faecium</i> resistente a vancomicina. Efecto antifúngico y anticancerígeno	
<i>Marinispora</i> sp.	Marinopirroles			
<i>Micromonospora</i> sp. M990-6	Diacepimomicina	Terpenoide con andamio de dibenzodicepina	Inhibe bacterias gram-positivas. Efecto anticancerígeno y antiinflamatorio	
<i>Nocardia</i> sp.	Peptidolipina B Peptidolipina C Peptidolipina D Peptidolipina E Peptidolipina F	Lipopéptidos	Antibacteriana (Peptidolipinas B e E)	
<i>Nocardiopsis</i> sp.	TP-1161			

Cepa productora original	Antibiótico	Estructura	Acción	Molécula
<i>Salinispora arenicola</i> CNS205	Ciclomazina	Terpenoide con andamio de péptido	Propiedad antimicrobiana frente a <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Enterococcus faecium</i>	
<i>Streptomyces spheroides</i> (<i>S. niveus</i>)	Novobiocina	Terpenoide con andamio de aminocoumarina	Inhibidor de la girasa del ADN con actividad antibiótica y anticancerígena	
<i>Streptomyces nodosus</i>	Lajollamicina	nitro-tetraeno espiro-β-lactona-γ-lactama	actividad antimicrobiana contra bacterias gram-positivas y antibacteriano	
<i>Streptomyces lincolicina</i>	Lincomicina	Lincosamida	Inhibe síntesis bacteriana	
<i>Streptomyces</i> sp. CL190	Nafterpin	Terpenoide con andamio de naftoquinona		
<i>Streptomyces</i> sp. CNH-099	Neomarinona	Terpenoide con andamio de naftoquinona		
<i>Streptomyces</i> sp. CNB-982	Ciclomarina	Terpenoide con andamio de indol/péptido		
<i>Streptomyces</i> sp. CNQ509	Éter de fenazina	Terpenoide con andamio de fenazina		
<i>Streptomyces</i> sp. CNQ-509	Nitropirrolín	Terpenoide con andamio de pirrol		
<i>Streptomyces</i> sp. CL190	Lavanducianín	Terpenoide con andamio de fenazina		
<i>Streptomyces</i> sp. CNB-632	Marinona	Terpenoide con andamio de naftoquinona		
<i>Streptomyces</i> sp. CNQ-766	Azamerona	Terpenoide con andamio de piridazina		
<i>Streptomyces fumanus</i> LL-F42248	Fumaquinona	Terpenoide con andamio de naftoquinona		
<i>Streptomyces anulatus</i> 9663	Endofenazina	Terpenoide con andamio de fenazina		
<i>Streptomyces</i> sp. Tü6071	Fenolinlactona	Terpenoide con andamio de azúcar, pirrol, γ-butirolactona		
<i>Streptomyces</i> sp. NPS008187	Gliacilpirroles	Terpenoide con andamio de pirrol	Antitumoral y citotóxico	
<i>Streptomyces</i> sp. CNQ-766	Azamerona	Terpenoide con andamio de piridazina		

Cepa productora original	Antibiótico	Estructura	Acción	Molécula
<i>Streptomyces</i> sp. KO-3988	Oxaloterpin	Terpenoide con andamio de carbamato o derivados de ácido oxalacético		
<i>Streptomyces</i> sp. MS239	5-dimetilalíndole-3-ácido carboxílico	Terpenoide con andamio de indol		
<i>Streptomyces</i> sp. C080624SC11	JBIR-46	Terpenoide con andamio de fenazina		
<i>Streptomyces</i> sp.	Bisantraquinona	Análogo de ergosterol	Actividad antibacteriana prometedora contra aislamientos derivados clínicamente de <i>Staphylococcus aureus</i> susceptible a meticilina, resistente a meticilina y resistente a tetraciclina y <i>Enterococcus faecalis</i> resistente a vancomicina	
<i>Streptomyces</i> sp.	Gutigimicina	Conjugado de guanina y trioxacarcina A	Alta actividad antibiótica contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Streptomyces viridochromogenes</i>	
<i>Streptomyces</i> sp.	Tirandamicina	Sistema de anillo de 2,4-pirrolidindiona	Agente antibacteriano mediante la inhibición de la cadena de iniciación y los pasos de elongación de la transcripción de la ARN polimerasa. También efecto antiparasito, antifúngico y anti-VIH	
<i>Streptomyces</i> sp.	1,4-dihidroxi-2-(3-hidroxibutil)-9,10-antraquinona-9,10-antrac		Amplio espectro de actividad antibacteriana contra patógenos bacterianos resistentes a los antibióticos	
<i>Streptomyces</i> sp.	Bonaticina	éster acíclico	Presenta actividad antimicrobiana contra gram positivas y gram negativas; así como actividad antifúngica	
<i>Streptomyces</i> sp.	Dihidroquinonas cloradas	anillo de tetrahidropirano	Acción antimicrobiana y anticancerígena. Es efectivo contra <i>S. aureus</i> resistente a meticilina y <i>Enterococcus faecium</i> resistente a vancomicina	
<i>Streptomyces</i> sp.	Frigociclinona	Consiste en una mitad de tetragomicina unida a través de un enlace C-glicosídico con un aminodesoxiazúcar osamina.	Presenta acción antibacteriana frente a gram-negativos	
<i>Streptomyces</i> sp.	Esrramicina	Triazolopirimidina	activo frente a gram-negativas y gram-positivas	
<i>Streptomyces griseus</i>	Estreptomicina			

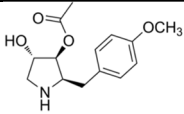
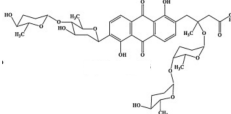
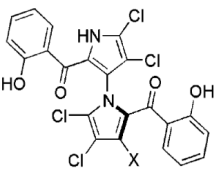
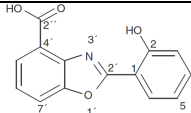
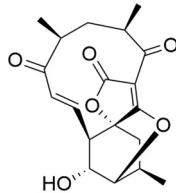
Cepa productora original	Antibiótico	Estructura	Acción	Molécula
<i>Streptomyces griseolus</i>	Anisomicina		Puede activar proteínas quinasas activadas por estrés, MAP quinasas y otras vías de transducción de señales.	
	Carboximicina	Bexazol	Presenta actividad inhibitoria frente a bacterias gram-positivas y actividad antitumoral.	
	Komodoquinona A		molécula neuritogénica	
	Prenilata pirrol glaciapirrol			
<i>Streptomyces</i> sp.	Himalocina	Quinona tetraciclina	Alta actividad biológica contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Streptomyces viridochromogene</i>	
	Gliaciapirroles A, B y C	pirroloesquiterpenos		
<i>Streptomyces</i> sp.	Marinopirroles	Metabolitos axiales quirales densamente halogenados que tienen estructura de bispirrol	Resulta efectivo frente a <i>S. aureus</i> resistente a metilicina. Posee además efecto citotóxico	
<i>Streptomyces</i> sp.	Etamicina			
<i>Streptomyces</i> sp.	1-hidroxi-1-norresistomicina			
<i>Streptomyces</i> sp.	Caboxamicina	Benzoxazol	Resulta efectivo frente a bacterias gram-positivas. Efecto citotóxico	
<i>Streptomyces</i> sp.	Bisantraquinonas			
<i>Streptomyces</i> sp. TP-A0595	6-dimetil-alíndole	Terpenoide con andamio de indol		
<i>Verrucosipora</i> sp.	Abisomicina	Policétido policíclico	Inhibidor de la biosíntesis del ácido para aminobenzoico; de manera que inhibe la síntesis de ácido fólico. Afecta a gram-positivas y <i>S. aureus</i> multirresistentes	

Tabla A.I. Moléculas bioactivas producidas por actinobacterias y su mecanismo de acción (Wakisaka *et al.*, 1982; Motta y Brandelli, 2002; Kossuga, 2008; Calretas-Machado-Dias, 2013; Manivasagan *et al.*, 2014; Gallagher, 2015).