

TRABAJO FIN DE GRADO

Facultad de Ciencias Experimentales

**AGENTES PRODUCTORES DE ANTIBIÓTICOS ENTRE AISLADOS
FÚNGICOS PROCEDENTES DEL PROCESO DE COMPOSTAJE**



Autora: Cristina Martínez Reina

Director: Joaquín Moreno Casco

Codirector: Juan Antonio López González

Departamento de Biología y Geología

Área de Microbiología

Grado en Biotecnología

Curso 2019/2020

Universidad de Almería

Agradecimientos

Quiero agradecer la oportunidad que me ha dado mi tutor Joaquín Moreno Casco de poder realizar este trabajo en esta área, donde he aprendido muchas cosas tanto a nivel profesional como a nivel personal.

También quiero agradecer a mi codirector Juan Antonio López González toda la ayuda que me ha brindado para que este proyecto saliese adelante. Gracias a ese positivismo que le caracteriza ha conseguido que, incluso en los momentos de más incertidumbre ante la situación que hemos vivido, confiase en que podría salir adelante. Muchísimas gracias por todo.

A todos los compañeros de laboratorio, gracias por ayudarme en todo lo que necesitaba y por haberme hecho sentir tan cómoda.

Y, por último, pero no menos importante, gracias a mi familia por haberme acompañado durante esta etapa.

ÍNDICE

Resumen	4
Abstract.....	5
1. Introducción	6
1.1. Proceso de compostaje.....	6
a) Fases del proceso de compostaje	6
b) Factores de control en el proceso de compostaje	8
c) Microbiota implicada en el proceso de compostaje e importancia de los hongos en este proceso	9
a) Mecanismo de acción de los antibióticos	10
b) Antibióticos producidos por hongos	11
1.3. Problemas asociados al empleo de antibióticos	12
a) Mecanismos de resistencia	12
b) Agentes patógenos resistentes	14
c) Posibles soluciones	15
2. Objetivos	18
3. Materiales y métodos.....	18
3.1. Diseño experimental.....	18
3.2. Microorganismos del ensayo	19
3.3. Medios de cultivo	22
3.4. Recuperación de cepas	23
3.5. Enfrentamiento <i>in vitro</i>	23
3.6. Obtención de extractos acelulares.....	24
3.7. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	25
3.8. Estudio de los antibióticos generados mediante análisis cromatográfico	26
4. Resultados y discusión.....	27
4.1. Enfrentamiento <i>in vitro</i>	27

4.1.1. Resultado cualitativo	27
4.1.2. Resultado cuantitativo.....	31
4.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria	35
4.3. Análisis cromatográfico	37
5. Conclusiones.....	39
6. Bibliografía	40

Resumen

El uso masivo e inadecuado de los antibióticos, está generando un número cada vez mayor de resistencias bacterianas hacia estos fármacos, haciendo que sea cada vez más difícil encontrar un tratamiento eficaz contra enfermedades comunes. Es por esto por lo que debe de existir una continua búsqueda de nuevos antibióticos. En el entorno natural del compostaje, podemos encontrar hongos con un gran potencial para la generación de nuevos compuestos bioactivos.

En este trabajo se investigó una colección de 100 cepas de hongos aisladas de pilas de compostaje. Cada una de estas cepas se enfrentaron *in vitro* a patógenos humanos, *Escherichia coli* (Gram-negativo) y *Staphylococcus aureus* (Gram-positivo) para determinar el efecto inhibitorio de crecimiento del patógeno. Se seleccionaron aquellas cepas capaces de inhibir a ambos patógenos junto a una cepa que inhibió exclusivamente a *S. aureus*, para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de extractos acelulares. Mediante un análisis estadístico se correlacionaron los resultados obtenidos de los enfrentamientos *in vitro* con los valores de CMI, para seleccionar la mejor cepa productora de antibióticos. Finalmente, tras un proceso de extracción de antibióticos, se identificaron los compuestos bioactivos mediante un análisis cromatográfico (HPLC).

En total, 46 cepas fueron capaces de generar sustancias antimicrobianas entre las que se encontraban géneros como *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium* y *Scopulariopsis*. Cabe destacar, que el efecto inhibitorio del crecimiento del patógeno fue mayor para la especie Gram-positiva que para la Gram-negativa (un 40% frente a un 17%). Esta idea se confirmó con el ensayo de CMI donde *S. aureus* obtuvo valores inferiores que *E. coli*. Se seleccionó una cepa de *Penicillium coprophilum* capaz de inhibir el crecimiento de los patógenos en diluciones de 1/8 y 1/16 del extracto acelular inicial. Tras realizar el análisis cromatográfico se determinó que esta cepa era productora de una molécula bioactiva empleada en agricultura, y además tiene interés biosanitario.

Palabras clave: Nuevos antibióticos, Hongos, Compostaje, Compuestos bioactivos, CMI.

Abstract

The massive and inappropriate use of antibiotics is generating an increasing number of bacterial resistances to these drugs, making it increasingly difficult to find an effective treatment against common diseases. This is why there must be a continuous search for new antibiotics. In the natural environment of composting, we can find fungi with great potential for the generation of new bioactive compounds.

In this work, a collection of 100 strains of fungi isolated from compost heaps was investigated. Each of these strains faced human pathogens, *Escherichia coli* (Gram-negative) and *Staphylococcus aureus* (Gram-positive) *in vitro* to determine the growth inhibitory effect of the pathogen. Those strains capable of inhibiting both pathogens were selected together with a strain that exclusively inhibited *S. aureus*, to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of acellular extracts. Through a statistical analysis, the results obtained from the *in vitro* confrontations were correlated with the MIC values to select the best antibiotics-producing strains. Finally, after an antibiotics extraction process, the bioactive compounds were identified by chromatographic analysis (HPLC).

In total, 46 strains were capable of generating antimicrobial substances, among which were genera such as *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium* and *Scopulariopsis*. It should be noted that the growth inhibitory effect of the pathogen was greater for the Gram-positive species than for the Gram-negative species (40% versus 17%). This idea was confirmed with the MIC test where *S. aureus* obtained lower values than *E. coli*. A *Penicillium coprophilum* strain capable of inhibiting the growth of pathogens was selected in dilutions of 1/8 and 1/16 of the initial acellular extract. After performing the chromatographic analysis, it was determined that this strain was a producer of a bioactive molecule used in agriculture and furthermore it has got biosanitary.

Keywords: New antibiotics, Fungi, Composting, Bioactive compounds, MIC.

1. Introducción

1.1. Proceso de compostaje

En las últimas décadas, la población urbana ha experimentado un crecimiento, con frecuencia desmesurado, lo cual ha propiciado un incremento en diferentes tipos de actividades como son la económica, industrial y comercial. Con ello, se ha aumentado exponencialmente la cantidad de desechos generados, generando su acúmulo. Esta acumulación supone una grave amenaza para el medio ambiente (van Ewijk & Stegemann, 2020). Para poder solucionar esta problemática, hay que buscar alternativas eficientes para transformar estos residuos y así poder aprovechar los recursos contenidos en ellos. Es la base fundamental de los nuevos modelos de economía circular por los que apuestan las economías más fuertes del planeta. Una de las alternativas más destacadas en la gestión de residuos orgánicos, dentro de estos modelos actuales, lo constituye el proceso de compostaje (Pergola et al., 2018).

El proceso de compostaje es un proceso de transformación biológica de materia orgánica sólida que ocurre en condiciones aerobias y es llevada a cabo por microorganismos, los cuales la descomponen generando agua, CO₂ y compost (Moreno et al., 2013).

Entre los diferentes microorganismos que propician, en sucesivas etapas, este proceso de biodegradación se encuentran complejas comunidades de bacterias, hongos y actinomicetos (López-González et al., 2015 a;b). En función de los nutrientes que estén disponibles y de posibles cambios bioquímicos en este proceso de transformación, puede existir una interacción entre diferentes grupos de microorganismos, comandada siempre por el dominio de la microbiota residente termotolerante, bien adaptada al proceso. Esto es importante si se parte de sustratos simples, ya que va a permitir optimizar los resultados, y con ello, el proceso de acuerdo con las características particulares de los residuos orgánicos a valorizar (Siles-Castellano et al., 2020). Este proceso de compostaje es la solución para gestionar los residuos orgánicos de una forma más sostenible. De esta forma, el compost generado es válido como enmienda orgánica en agricultura, y su microbiota también presenta importantes aplicaciones en otros campos de interés biotecnológico (Martínez-Gallardo et al., 2020; Neher et al., 2013; Suárez-Estrella et al., 2019).

a) Fases del proceso de compostaje

Como se puede observar en la **Figura 1.1**, el proceso de compostaje está formado por dos fases globales, una fase bio-oxidativa y una fase de maduración. Estas fases, a su vez, se subdividen en otras cuatro bien diferenciadas en función de determinadas condiciones ambientales, como la temperatura, y las condiciones nutricionales del material (López-González et al., 2013).

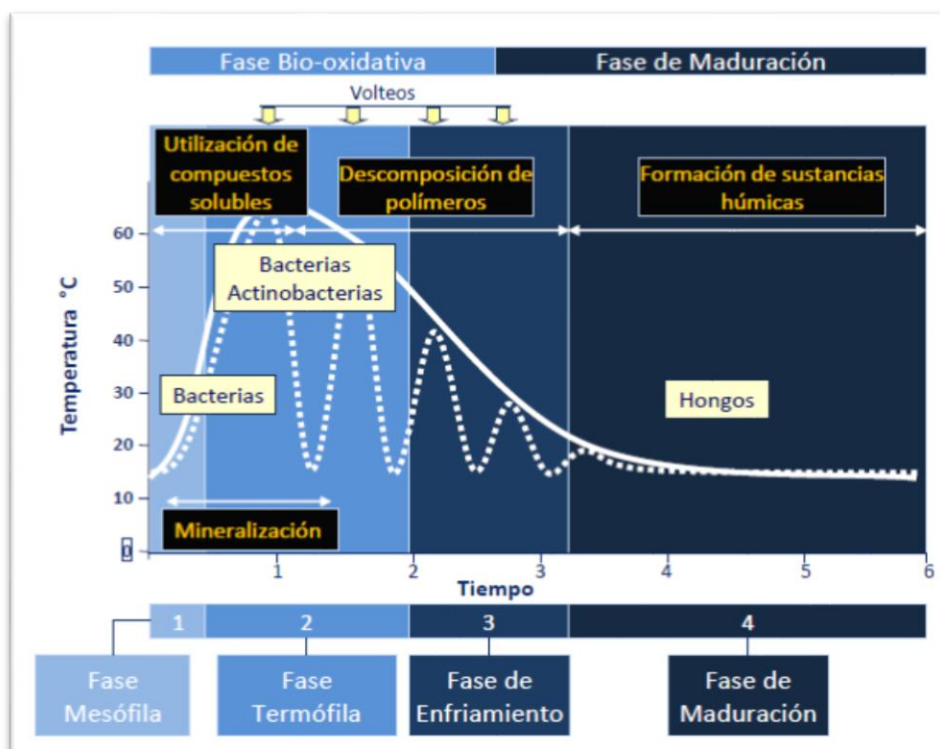


Figura 1.1. Fases del proceso de compostaje (Adaptado de Moreno & Mormeneo, 2011).

Fase mesófila: En esta etapa, la temperatura se incrementa progresivamente hasta los 40 °C e intervienen bacterias y hongos mesófilos y termotolerantes, aunque suelen predominar las bacterias ya que estas crecen a mayor velocidad y se adaptan mejor a posibles cambios en las condiciones. Estos microorganismos van a degradar sustratos solubles, formándose ácidos orgánicos, lo que conlleva a una disminución del pH y una generación de calor.

Fase termófila: Durante esta etapa la temperatura puede oscilar desde los 40 °C hasta más de 70 °C. La actividad biológica queda comandada por la microbiota termófila y termotolerante, ya que la exclusivamente mesófila queda retirada del proceso ante las condiciones imperantes (Moreno et al., 2013). Entre esta microbiota predominan los actinomicetos (López-González et al., 2015a). Degradan las proteínas y la lignocelulosa, liberando monómeros y, por tanto, incrementando la actividad microbiana.

Fase de enfriamiento: Comienza a disminuir la actividad microbiana. Esto es debido a que los nutrientes se empiezan a agotar (ya que han sido consumidos en etapas anteriores), y a que las temperaturas alcanzadas son muy altas, por tanto, sólo son capaces de sobrevivir aquellos microorganismos termotolerantes que son capaces de soportar estas condiciones limitantes como son los esporulados tales como *Bacillus* (López-González et al., 2015a). El consumo de los nutrientes marca el descenso paulatino de la temperatura y dará lugar al comienzo de la última fase del proceso.

Fase de maduración: Fase eminentemente físico-química que queda dominada metabólicamente principalmente por hongos mesófilos, ya sean procedentes del propio entorno o aquellos que han logrado sobrevivir a la fase termófila (esporas). También se pueden encontrar

bacterias mesófilas en baja cantidad, pero con una diversidad muy amplia como las que son capaces de oxidar el hidrógeno y el amonio, entre otros, las que intervienen en la producción de nitrito o en la fijación de nitrógeno. Además, intervienen nematodos, protozoos y miriápodos. En esta etapa, hay una escasez de nutrientes y están poco biodisponibles, por lo que van a usar compuestos recalcitrantes que sean difíciles de biodegradar como son la celulosa y la lignina presentes en forma de lignocelulosa, las cuales no se mineralizan completamente, y de esta forma se obtienen sustancias húmicas que son producto de sumo interés (López-González et al., 2013).

b) Factores de control en el proceso de compostaje

En compostaje, hay que tener en cuenta una serie de factores que van a influir en el proceso y que son importantes para que se lleve a cabo la transformación de los residuos orgánicos por parte de los microorganismos. Los más importantes son los siguientes:

- **Relación C/N:** Esto es fundamental para un correcto crecimiento de los microorganismos, ya que el carbono es la principal fuente de energía y el nitrógeno es esencial para los procesos anabólicos. La relación óptima dentro de una célula es de 10/10. No obstante, en la fuente de biomasa inicial se debe de encontrar entre 25/1 y 35/1. Esto se debe a que la mayoría de la materia orgánica que contiene nitrógeno no es fácilmente biodegradable y una parte se va a perder dentro del metabolismo microbiano (solo el 30% del carbono es asimilado en las células) (Moreno et al., 2013), de forma que habrá que proporcionar más cantidad para asegurar una correcta relación C/N, y así un correcto crecimiento.

- **Tamaño de partícula:** Es esencial para facilitar el acceso de los microorganismos al material a biodegradar. De forma que un correcto triturado del material va a aumentar la superficie de contacto entre el microorganismo y el material orgánico, sin llegar a una trituración excesiva, compactando en exceso el material y generando anaerobiosis en su interior.

- **Humectación:** Debe de mantenerse en el compostaje la humedad en torno al 40-60%, ya que un exceso puede generar anaerobiosis y una falta de humedad puede limitar la actividad microbiana ralentizando así el proceso.

- **Aireación:** Es muy importante para mantener la aerobiosis en el interior de la pila y, por tanto, permitir la actividad microbiana (Ge et al., 2020). Se puede dar de forma activa, donde la pila se voltea mecánicamente permitiéndole el contacto con el aire y enriqueciéndola de esta forma de oxígeno, o de forma pasiva, en el cual la pila cuenta con un sistema que bombea el aire hacia el interior.

- **Estructurantes:** El residuo ideal en compostaje con frecuencia no se encuentra disponible. El uso de mezclas que facilitan la accesibilidad de los microorganismos a los sustratos iniciales es requerido en ocasiones, cuando el material orgánico inicial no es fácilmente biodegradable o no se dispone de él, o cuando el contenido energético del mismo no es suficiente (Estrella-González et al., 2020).

c) Microbiota implicada en el proceso de compostaje e importancia de los hongos en este proceso

Como se ha mencionado anteriormente, la aplicación del compost para suelos con fines agrícolas cada vez va adquiriendo más importancia. Es por ello por lo que se debe de conocer cuáles son las poblaciones microbianas que están implicadas en el proceso de compostaje. Se han realizado numerosos estudios para la diversidad y la composición de las comunidades bacterianas y fúngicas existentes (Jurado et al., 2020; López-González, 2015; Neher et al., 2013). El compostaje ocurre de forma dinámica por una sucesión de poblaciones microbianas mixtas. Principalmente están involucrados bacterias, hongos y actinomicetos. Durante las diferentes fases del proceso va a variar la diversidad microbiana en función de las condiciones imperantes.

Las bacterias son el grupo más abundante de microorganismos que se pueden encontrar en el compost, llegando a alcanzar del 80-90%. Comprenden principalmente especies de Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria y Bacteroidetes (López-González et al., 2015a). Aunque el compostaje es un proceso aeróbico, también se pueden generar microambientes anaeróbicos. Un estudio realizado demostró que aproximadamente el 1% de todas las bacterias encontradas fueron anaerobias estrictas (Tuomela et al., 2000). Las actinobacterias también predominan en este proceso siguiendo una tendencia similar a las bacterias termófilas.

En cuanto a la comunidad fúngica, su recuento durante el proceso de compostaje es menor. De forma que, los hongos mesófilos disminuyen al principio y en segundas etapas termofílicas, ya que se conoce que las altas temperaturas pueden inactivarlos, pero estos son capaces de adaptarse a las condiciones térmicas a medida que avanza la etapa biooxidativa. Los hongos termófilos van aumentando a medida que lo hace la temperatura (López-González et al., 2013).

Los hongos juegan un papel muy importante en el proceso de compostaje y pueden mejorar la calidad del compost (Neher et al., 2013). Esto es debido a las enzimas extracelulares que producen que son capaces de descomponer polímeros complejos y, además, a la capacidad que presentan algunas especies para crecer bajo determinadas condiciones adversas. La importancia de los hongos con relación a organismos procariontes va a depender de las condiciones del proceso, principalmente de las propiedades nutricionales de los materiales que se están compostando (López-González et al., 2015b). En el compostaje se puede encontrar microbiota residente (especies que dominan a lo largo de todo el proceso) o microbiota transitoria (especies que aparecen ocasionalmente).

Los hongos encontrados en estos procesos se clasifican principalmente en dos filos, Ascomycota y Basidiomycota (López-González et al., 2015b). Los ascomicetos son distribuidos en las clases de Eurotiomycetes, Sordariomycetes, Dothideomycetes, Leotiomyces, Pezizomycetes y Saccharomycetes. Mientras que los basidiomicetos son asignados a las clases Microbotryomycetes y Tremellomycetes. Las especies más predominantes son las pertenecientes a la clase Eurotiomycetes donde se puede encontrar *Penicillium* y *Aspergillus*, y las de la clase Sordariomycetes entre las que destacan *Acremonium*, *Fusarium*, *Monographella* y *Microascus*. Entre las diferentes levaduras que se

pueden encontrar son las de los géneros *Candida*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Torulopsis* y *Trichosporon*, asociándose generalmente a las primeras etapas del compostaje (Ryckeboer et al., 2003).

Aunque no existe una microbiota estándar, como se ha mencionado anteriormente la comunidad fúngica es crítica para que el proceso de compostaje sea correcto, contribuyendo así a la optimización del proceso para la obtención de productos de alto valor agronómico (Jurado et al., 2020).

1.2. Producción de antimicrobianos naturales: antibióticos

a) Mecanismo de acción de los antibióticos

Los antibióticos forman parte de un grupo heterogéneo de sustancias químicas, de origen microbiano y cuya actividad es antimicrobiana. Son capaces de detener el crecimiento o inducir la muerte de los microorganismos, ya que pueden actuar de forma específica sobre una función o estructura de este. Incluso actuando a concentraciones bajas, la potencia biológica de los antibióticos es elevada, además, y es un punto fundamental, tienen una toxicidad selectiva. Aunque el ser humano busca su producción a gran escala como medicamentos, es de elevada importancia el papel ecológico que tienen los antibióticos en los ambientes naturales (Crits-Christoph et al., 2018). Como se ha mencionado, estos agentes antimicrobianos tienen un papel principal que es matar a organismos patógenos invasores, pero además pueden actuar como moduladores de la respuesta inmune innata en muchos organismos. Por tanto, en algunos casos estos antimicrobianos se expresan constitutivamente o bien, de forma inducible en respuesta a un desafío patogénico (Jenssen et al., 2006).

Los antibióticos se pueden clasificar teniendo en cuenta tres aspectos básicos (Bérdy, 2005):

- 1) Espectro de acción: pueden activarse frente a un amplio o reducido grupo de especies.
- 2) Mecanismo de acción: es la capacidad que tiene el antibiótico de inhibir el crecimiento o destruir el microorganismo.
- 3) Estructura molecular: los clasifica según la forma de actuar de cada antibiótico.

En cuanto a los mecanismos de acción de los antibióticos son variados y van a depender de las dianas sobre las que actúen (**Tabla 1.1**):

Mecanismos de acción del antibiótico sobre la bacteria	Antibiótico
Inhibición de la pared celular	Penicilina
Lesión en la permeabilidad de la membrana celular	Polimixina
Inhibición de la síntesis proteica	Cloranfenicol
Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos	Quinolonas
Análogos metabólicos	Sulfamidas

Tabla 1.1. Clasificación de los antibióticos según su mecanismo de acción sobre la estructura de la bacteria.

La pared celular es la estructura bacteriana que se encarga de dar forma a la célula, y de proteger la integridad de la bacteria. Además, evita la lisis celular debido a la elevada presión osmótica que existe en el citoplasma, y también sirve de anclaje para componentes de la membrana y proteínas extracelulares (Guilhelmelli et al., 2013). Es, por tanto, que los antibióticos que destruyen la pared celular conllevan a la lisis de ésta, y a la muerte de la bacteria. Las bacterias Gram-positivas son más sensibles a estos antibióticos que las Gram-negativas, debido a que las primeras cuentan con el peptidoglicano como el principal componente de la pared celular (Calvo & Martínez-Martínez, 2009). Este efecto hace que esta estructura sea un objetivo excelente a la hora de buscar nuevos fármacos antimicrobianos.

En cuanto a la membrana citoplasmática que es otra estructura también esencial en las células, los antibióticos van a desorganizarla formando poros transmembrana que hacen que entren o salgan iones, en cualquier caso, el metabolismo se ve afectado de forma grave pudiendo resultar en un efecto de carácter letal.

En lo referente a la inhibición de la síntesis proteica puede verse afectada ya que algunos antibióticos son capaces de unirse a diferentes estructuras del ribosoma haciendo que el proceso de traducción de proteínas quede interrumpido. Además, al existir diferencias en las estructuras de los ribosomas entre procariotas y eucariotas, se va a tratar de una inhibición ciertamente selectiva.

Existen otros antibióticos que actúan sobre la estructura o el metabolismo de los ácidos nucleicos, y tienen un efecto inhibitorio en la síntesis del ADN. Hay un grupo que afectan a las etapas de replicación y transcripción del ADN que son las rifamicinas y quinolonas, y otro grupo que dañan de forma directa el ADN que son los nitroimidazoles y nitrofuranos. Estos antibióticos no tienen una acción selectiva y son incluso tóxicos para el ser humano (Guilhelmelli et al., 2013).

Determinados antibióticos se pueden englobar como análogos metabólicos. Son sustancias parecidas a un metabolito esencial de la célula, de forma que, cuando están en el interior celular pueden confundir a la maquinaria enzimática, la cual va a utilizar este análogo en lugar del metabolito real, conduciendo a un mal funcionamiento pudiendo ser letal (Calvo & Martínez-Martínez, 2009).

Es importante conocer y entender estos mecanismos de acción ya que aportan la información de cómo actúan estas moléculas y de cómo las bacterias se protegen de ellas. De esta forma, va a facilitar el desarrollo de agentes farmacológicos que mejoren y optimicen los mecanismos inmunes. Como se ha mencionado anteriormente, el antibiótico ideal tiene que tener una toxicidad selectiva de forma que va a ser capaz de distinguir entre células del propio huésped o células microbianas en un entorno de toxicidad potencial (Yeaman et al., 2003).

b) Antibióticos producidos por hongos

El descubrimiento de una especie de *Penicillium* demostró el antagonismo hacia el crecimiento de una bacteria debido a la producción de una sustancia que difundía en el medio y le granjeó a Alexander Fleming, aparte de un merecido premio Nobel en 1945, el privilegio de dar el pistoletazo de salida en la carrera contra las infecciones bacterianas que se abrió en la época post-antibiótica.

De entre todas las propiedades que tienen los antibióticos, una de las más buscadas es la selectividad bacteriana. Actualmente interesa que sea capaz de inhibir tanto a bacterias Gram-negativas como a Gram-positivas (amplio espectro de actuación). Dentro de los organismos que son capaces de producir estas sustancias se encuentran los hongos (Pérez-Silva, 1959).

Principalmente, los hongos productores de antibióticos más frecuentes son los hongos filamentosos tipo moho, entre los que se encuentran los *Ascomycetos* (que son los más comunes), *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Además, existen otros tipos de hongos filamentosos y endofíticos productores como *Alternaria*, *Trichoderma*, *Phoma*, *Acremonium* y *Stachybotrys*. En cuanto a levaduras, *Myxomycetes* es la más importante, aunque existen otros géneros productores.

Los antibióticos que derivan de los hongos suelen tener efectos biológicos y presentan actividad farmacológica y fitotóxica. Destacan los betalactámicos, entre los que se encuentran la penicilina y cefalosporina, la ciclosporina y diferentes estatinas como mevinolina, lovastatina, compactina, atrovastina y pravastatina (Bérdy, 2005).

Tanto el estado fisiológico como las condiciones de crecimiento del hongo van a influir en gran medida en la detección de la actividad antimicrobiana de este. Es decir, hay que controlar el medio utilizado, el pH, el periodo y temperatura de incubación, ya que por ejemplo un corto tiempo de incubación, va a disminuir el crecimiento del hongo y esto hace que la producción de compuestos antimicrobianos se vea seriamente afectada (Pereira et al., 2013).

1.3. Problemas asociados al empleo de antibióticos

a) Mecanismos de resistencia

La existencia de bacterias patógenas resistentes a los antibióticos comunes resulta ser una de las mayores preocupaciones en la medicina moderna. Son las conocidas “superbacterias” que se generan por un uso indiscriminado de antibióticos (Lavery et al., 2011). Estas bacterias resistentes van a cambiar su respuesta al antibiótico y esto ocasiona un aumento en los costes médicos, estancias más largas en hospitales y un aumento en la tasa de mortalidad.

Todos los días, a nivel mundial, emergen nuevos mecanismos de resistencia, haciendo que cada vez sea más difícil tratar enfermedades infecciosas comunes como por ejemplo la neumonía, la tuberculosis o la gonorrea ya que los antibióticos cada vez son menos efectivos (Pinheiro et al., 2017). Cada año más de 0,7 millones personas mueren a causa de infecciones resistentes, y se espera que para 2050 esta cifra se incremente llegando incluso a los 10 millones de personas (Hwang & Yoon, 2019). Es decir, dentro de unos años, las infecciones bacterianas superarán a enfermedades como el cáncer o los problemas cardiovasculares en número de muertes. A consecuencia de esta crisis de resistencia a antibióticos, se requiere de la búsqueda de nuevos agentes con actividad antimicrobiana que sean capaces de actuar frente a estos patógenos multirresistentes (Lavery et al., 2011).

Estas superbacterias presentan una ventaja en la competición con el resto de las bacterias, ya que les va a permitir superar esa presión selectiva a las que le somete el entorno (**Figura 1.3**). Por lo

tanto, ha habido modificaciones funcionales y estructurales, tanto a nivel intracelular como a nivel extracelular, en el propio microorganismo o bien ha ido adquiriendo ciertas características como respuesta al estrés sufrido por esa presión selectiva, lo cual resulta en la resistencia antibiótica (Troncoso et al., 2017).

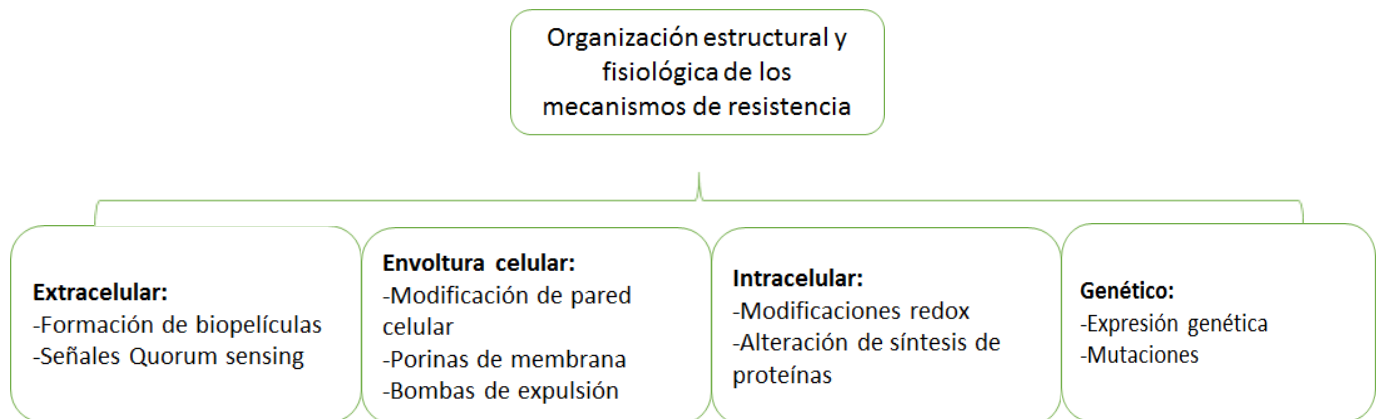


Figura 1.2. Esquema de la organización estructural y fisiológica de los mecanismos de resistencia.

Como se observa en la **Figura 1.2.**, los mecanismos de resistencia son diferentes en función de la organización estructural y fisiológica en la bacteria.

Entre los mecanismos de resistencia bacteriana a **nivel extracelular** destacan:

- **Formación de biopelículas:** Consiste en la formación de agregados bacterianos rodeados de una matriz compuesta de proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos. De esta forma se protegerán de factores ambientales que pueden resultar perjudiciales. Además, esa matriz extracelular impide la acción de los antibióticos, protege a las bacterias de la respuesta inmune del hospedador y otorga al microorganismo adherencia para una superficie. El antibiótico no puede difundir a través de la biopelícula debido al carácter viscoso que presenta y también cuenta con enzimas que van a romper la estructura de los antibióticos. En muchos procesos infecciosos crónicos se ha demostrado la presencia de las biopelículas lo cual la hacen responsables de ello. Ambiciosos proyectos internacionales como NoMorFilm (<http://www.nomorfilm.eu/about-normofilm>) buscan hacer frente a estos mecanismos de resistencia.

- **Sistema Quorum Sensing (QS):** Se trata de un sistema de señales que utilizan las comunidades de bacterias para comunicarse entre sí. Estas señales pueden generarse a consecuencia de un estrés ambiental, y puede hacer que las funciones celulares tales como movilidad, patogenicidad y la expresión génica, se modifiquen. Las técnicas encaminadas a interrumpir este mecanismo se conocen con el nombre de Quorum Quenching (Turan & Engin, 2018).

A nivel de la envoltura celular, tanto la membrana citoplasmática como la pared celular juegan un papel importante, ya que, a través de la activación de canales o bombas, van a hacer que los antibióticos salgan o entren.

Los mecanismos de resistencia a **nivel intracelular** son:

- Modificaciones en el potencial redox: Ciertas bacterias que van a evitar el efecto del antibiótico gracias a estos cambios.

- Sistemas de protección ribosomal: Estos sistemas van a hacer que la acción del antibiótico que inhibe la síntesis proteica se vea frenada.

A **nivel genético**, existe una relación entre los mecanismos de resistencia a antibióticos y la regulación génica. Las bacterias están formadas por un único cromosoma circular de forma que si se modifica el ADN va a llevar a un cambio en su comportamiento, es decir, el desarrollo de resistencia se va a ver favorecido por las características genéticas de la propia bacteria. Por esto, las mutaciones van a servir de mecanismo de protección de la acción del antibiótico.

Cabe destacar la importancia de ciertos elementos extracromosomales como pueden ser plásmidos o transposones, que mediante transferencia horizontal entre bacterias van a diseminar genes de resistencia a antibióticos, lo cual supone uno de los más graves problemas para el control de las superbacterias (McInnes et al., 2020).

b) Agentes patógenos resistentes

Muchos de estas bacterias se encuentran en el hábitat natural, pero donde es más peligroso encontrarlas es en hospitales donde pueden ocasionar importantes enfermedades infecciosas, ya que su contagio entre pacientes convalecientes es inusitadamente elevado (Vivas, 2019). Algunas de las bacterias resistentes se muestran en la siguiente **Tabla 1.2**:

Bacteria resistente	Antibiótico
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Penicilinas y ampicilinas (entre otros)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Meticilina y vancomicina
<i>Helicobacter pylori</i>	Claritromicina
<i>Haemophilus influenzae</i>	Ampicilina
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Todos los antibióticos disponibles
<i>Escherichia coli</i>	Ampicilina, ciprofloxacino y trimetoprim-sulfametoazol (entre otros)
<i>Enterococos</i>	Vancomicina
<i>Clostridium difficile</i>	Tetraciclina, daunorubicina, eritromicina, bacitracina, nogalmicina y β -lactámicos
<i>Salmonella</i>	Quinolonas y cefalosporinas
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Carbapenémicos
<i>Shigella</i> spp.	Ampicilina, tetraciclina, cotrimoxazol y ácido nalidíxico
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Penicilina
<i>Campylobacter</i> spp.	Fluoroquinolonas
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Cefalosporina y fluoroquinolonas

Tabla 1.2. Principales bacterias resistentes a antibióticos (Hwan & Yoon, 2019; Lavery et al., 2011; Merino et al., 2004; Sebahia et al., 2006; WHO, 2017).

Es importante desarrollar nuevos antibióticos que sean capaces de hacer frente a los patógenos mencionados anteriormente, lo cual ayudará a reducir el número de muertes que son debidas a infecciones resistentes. Si esto no sucede, surgirán más problemas en la salud pública teniendo un impacto negativo en la atención al paciente (WHO, 2017). A medida que pasa el tiempo se crean más resistencias (**Figura 1.3**), por ello es crucial desarrollar antibióticos que sean capaces de tratarlas a tiempo.

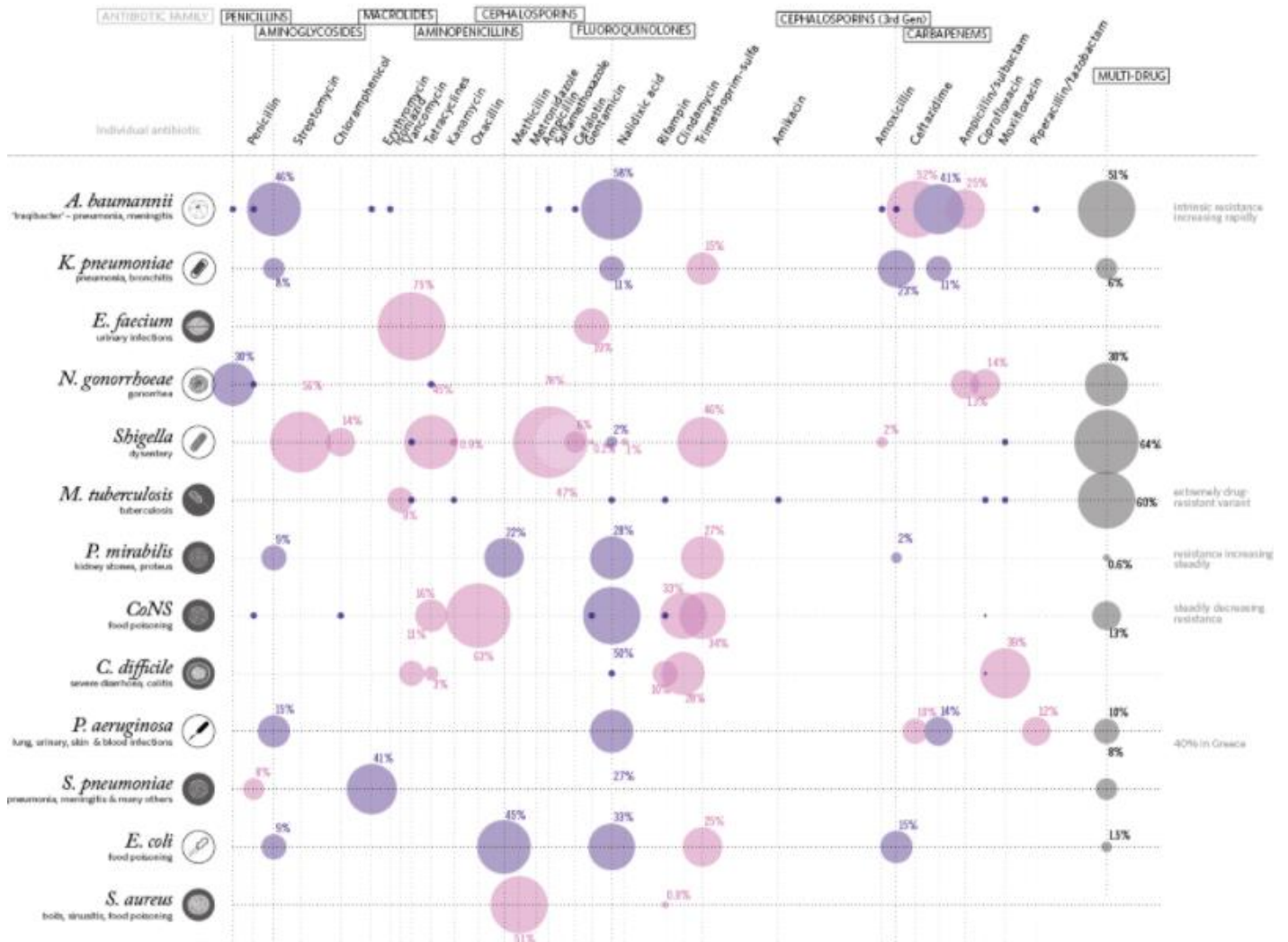


Figura 1.3. Muestra la evolución de las resistencias a diferentes antibióticos a lo largo del tiempo (rosa: % de resistencia a antibióticos individuales; azul: % de resistencia a familias de antibióticos; puntos pequeños azules: resistencias no cuantificadas) (CDS, 2014).

c) Posibles soluciones

Como se ha mencionado anteriormente, la resistencia a antibióticos afecta a nivel mundial y va en irrefrenable aumento (**Figura 1.4**). En cambio, no va a la misma velocidad el descubrimiento de nuevos antibióticos. La inmensa mayoría de los medicamentos antibióticos de uso actual fueron descubiertos en el siglo XX, apenas hay nuevos en el mercado. Esto se debe principalmente a que el

problema ya no existe únicamente en el ámbito hospitalario, sino que ocurre en pacientes con infecciones comunes, ha existido un abuso de los tratamientos antibióticos para todo. Sin uso de antibióticos, no hay aparición de resistencias (Vivas, 2019). También dificulta todo el proceso el hecho de la elevada plasticidad bacteriana que hace que las bacterias desarrollen mecanismos de resistencia adaptativos. Estudiar los diferentes mecanismos de resistencia que existen, tanto a nivel estructural como a nivel molecular va a permitir conocer los puntos de control en las infecciones y de esta forma aplicar prevenciones más eficaces y que la resistencia se disemine (Troncoso et al., 2017).

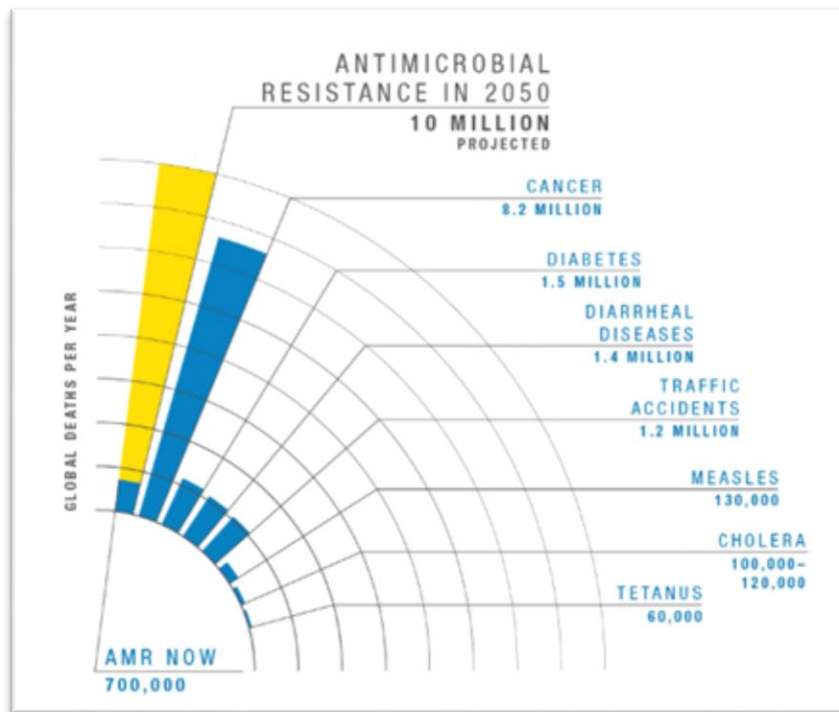


Figura 1.4. Gráfico de las muertes anuales por bacterias multirresistentes proyectadas para 2050 comparadas con el número actual de muertes por otras causas (UCSF, 2020).

Las causas de su aparición son múltiples. Destacan principalmente la prescripción médica que en algunos casos puede llegar a ser innecesaria, un uso inadecuado por parte del paciente que abandona el tratamiento antibiótico sin terminar con el periodo prescrito, o la automedicación por parte de pacientes que presentan una enfermedad viral o patología cuyo origen no es bacteriano. También es importante destacar el uso masificado de antibióticos que se emplean en industrias ganaderas que hace que aparezcan cepas resistentes que se van a distribuir fácilmente al ser humano (WHO, 2011).

Es necesario llevar a cabo una serie de acciones cuyo fin sea racionalizar el uso de antibióticos y disminuir la aparición de las resistencias. El diseño e impacto de estas acciones va a estar determinado por variaciones del consumo, por la respuesta clínica en pacientes y la prevalencia que tengan las resistencias. Entre las diferentes acciones se encuentran el diagnóstico precoz de la infección y su prevención. Un fomento del plan de vacunación y una higiene adecuada para prevenir infecciones. El uso de antibióticos se debe efectuar únicamente cuando el médico lo indique, además

de cumplir con el tratamiento completo prescrito. En cuanto al sector ganadero, emplear únicamente aquellos antibióticos que sean recetados por veterinarios (WHO, 2014).

También es necesario señalar que, hoy en día, especialmente desde el ámbito privado, la investigación en antibióticos ha caído en picado debido a que pese a la importancia que tiene para la sociedad el uso de antibióticos y su clara influencia sobre el alargamiento de la esperanza de vida y la sociedad del bienestar, en realidad, no son medicamentos rentables para las grandes empresas farmacéuticas (Vivas, 2019). Investigar en antibióticos conlleva años de pruebas complejas, de descartar compuestos bioactivos que no pasan a la siguiente fase de estudio, para al final sacar al mercado un producto que posiblemente sea útil tan solo unos pocos años antes de que las bacterias creen resistencia. Además, los antibióticos curan demasiado bien, es decir, unas pocas dosis durante unos pocos días son suficientes para atajar el problema, por lo que, la rentabilidad económica no va a ser de ningún modo la que la empresa privada encuentra en la explotación de patentes para medicación crónica como la de muchos tipos de cáncer, que acompañan con frecuencia al paciente hasta el final de sus días. Para paliar esta situación existen importantes iniciativas de algunos estados y la acción de la WHO, que pueden contribuir ya no solo desde el ámbito público, sino facilitando mecanismos al ámbito privado para encontrar más apetecible este tipo de investigación, como, por ejemplo, alargando los periodos de explotación de patentes de este tipo de medicamentos o posibilitando herramientas de investigación público-privadas que ofrezcan salvar los obstáculos que se presenten. Entre ellos, cabe citar el reciente Fondo de Acción (AMR) (<https://amractionfund.com/>) formado por una veintena de las principales compañías biotecnológicas y farmacéuticas del mundo que persigue la salida de antibióticos nuevos para 2030.

Desde el ámbito de la investigación, estos son los métodos existentes para erradicar esta difícil situación:

- La búsqueda de nuevos antibióticos, estrategia buscada hoy en día ya que aquellos antibióticos que no se han utilizado todavía para el tratamiento de enfermedades pueden hacer frente de forma eficaz a bacterias resistentes. Apenas se conoce realmente un ínfimo porcentaje del microbioma real del planeta, el potencial real es inmenso en comparación. Además, el desarrollo de superordenadores y modelos de inteligencia artificial con acción en este campo de la medicina está generando resultados más que prometedores (Stokes et al., 2020).
- Uso de la edición genética CRISPR-cas9 para silenciar genes asociados a la resistencia antibiótica (Sun et al., 2016).
- La fagoterapia es una técnica desarrollada a la par que el descubrimiento de los antibióticos, pero que se dejó abandonada en su momento por el auge de los antibióticos. Consiste en el uso de los enemigos naturales de las bacterias, los bacteriófagos frente a patógenos bacterianos ocasionando su eliminación mediante lisis. Pueden actuar frente a un amplio rango de bacterias, y como los fagos tienen unos mecanismos de acción diferentes a los antibióticos no van a competir con estos, por tanto, la bacteria será susceptible a los fagos, aunque estas sean resistentes a ciertos antibióticos (Reina & Reina, 2018). Es una técnica muy eficaz y selectiva, pero puede presentar ciertas desventajas como su baja estabilidad, el coste

de producción y el rechazo del sistema inmune a estas estructuras. Además, de la posibilidad de adaptación de las bacterias a los fagos (Krylov, 2001).

- Otra estrategia es emplear combinaciones sinérgicas de ciertos antibióticos para eliminar diferentes bacterias de forma simultánea (Gonzales et al., 2015).
- También se podrían utilizar coadyuvantes que aumenten la eficacia de la terapia antimicrobiana, aunque carezcan de actividad antibiótica (Wright, 2016).

En definitiva, todas las estrategias mencionadas anteriormente, acompañadas de una vigilancia epidemiológica de las resistencias, van a ayudar a combatir este problema que hoy día afecta a multitud de países siendo necesaria una búsqueda continua de tratamientos eficaces que puedan hacer frente a las “superbacterias”.

2. Objetivos

La importancia de este Trabajo Final de Grado reside en conocer las posibilidades reales de producción de sustancias de carácter antibiótico entre las cepas de hongos mohos que se hallan en la amplia colección de microorganismos con la que cuenta el grupo de investigación BIO-175 de la Universidad de Almería. Dentro de esta colección de aislados microbianos, la cual consta de 1380 cepas, los hongos forman un importante bloque microbiano ya que son decisivos para un correcto proceso de compostaje.

El principal objetivo del trabajo fue la búsqueda de agentes productores de antibióticos entre aislados fúngicos procedentes de compostaje.

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

1- Detectar la producción de sustancias antimicrobianas útiles frente a patógenos humanos tipo entre hongos aislados del compostaje.

2- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de extractos acelulares de microorganismos productores de sustancias antimicrobianas frente a patógenos humanos tipo.

3- Estudiar al detalle los antibióticos generados por los hongos seleccionados mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS/MS).

3. Materiales y métodos

3.1. Diseño experimental

Para lograr los objetivos marcados, los experimentos siguieron el patrón descrito en la **Figura 3.1**.



Figura 3.1. Diseño experimental llevado a cabo en este estudio.

3.2. Microorganismos del ensayo

Para la realización de este trabajo se emplearon 100 hongos seleccionados de una colección de 1380 cepas obtenidas durante un proceso de compostaje. Estas cepas pertenecen al Área de Microbiología de la Universidad de Almería, las cuales se aislaron a partir de pilas de compostaje (residuos de plantas de tomate secadas y astillas de madera). Los aislados microbianos fueron caracterizados enzimáticamente e identificados molecularmente (López-González et al., 2015b). Por ello, existe bastante información acerca de esta colección.

La colección se compone de un conjunto de hongos pertenecientes a los siguientes géneros: *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Scopulariopsis*, *Cladosporium*, *Acremonium*, *Scedosporium* y *Microascus* (**Tabla 3.1.**) que fueron seleccionados por la capacidad de estos géneros en la producción de sustancias de carácter antibiótico.

Id General	Código	Identidad
4190	HM-MPR-1A-06	<i>Penicillium spinulosum</i>
4197	HM-MPR-1A-13	<i>Alternaria brassicae</i>
4200	HM-MPR-1A-16	<i>Fusarium oxysporum</i>
4201	HM-MPR-1A-17	<i>Penicillium spinulosum</i>
4208	HM-MPR-1B-06	<i>Fusarium oxysporum</i>
4209	HM-MPR-1B-07	<i>Fusarium equiseti</i>
4215	HM-MPR-1B-13	<i>Fusarium solani</i>
4216	HM-MPR-1B-14	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>
4217	HM-MPR-1B-15	<i>Penicillium spinulosum</i>
4218	HM-MPR-1B-16	<i>Fusarium solani</i>
4220	HM-MPR-1B-18	<i>Penicillium spinulosum</i>
4229	HM-MPR-2A-09	<i>Penicillium spinulosum</i>
4230	HM-MPR-2A-10	<i>Penicillium commune</i>
4231	HM-MPR-2A-11	<i>Penicillium chrysogenum</i>
4233	HM-MPR-2A-13	<i>Penicillium spinulosum</i>
4237	HM-MPR-2A-17	<i>Penicillium solitum</i>
4238	HM-MPR-2A-18	<i>Fusarium equiseti</i>
4242	HM-MPR-2A-22	<i>Fusarium solani</i>
4243	HM-MPR-2A-23	<i>Fusarium oxysporum</i>
4261	HM-MPR-2B-15	<i>Fusarium solani</i>
4267	HM-MPR-2B-21	<i>Fusarium oxysporum</i>
4268	HM-MPR-2B-22	<i>Penicillium spinulosum</i>
4275	HM-MPR-3A-07	<i>Fusarium delphinoides</i>
4276	HM-MPR-3A-08	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>
4281	HM-MPR-3A-13	<i>Penicillium spinulosum</i>
4283	HM-MPR-3A-15	<i>Fusarium oxysporum</i>
4284	HM-MPR-3A-16	<i>Fusarium equiseti</i>
4290	HM-MPR-3B-04	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>
4293	HM-MPR-3B-07	<i>Penicillium spinulosum</i>
4299	HM-MPR-3B-13	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>
4304	HM-MPR-3B-18	<i>Fusarium oxysporum</i>
4309	HM-MESA1-1A-03	<i>Fusarium oxysporum</i>
4311	HM-MESA1-1A-05	<i>Penicillium brevicompactum</i>
4323	HM-MESA1-1A-17	<i>Penicillium spinulosum</i>
4324	HM-MESA1-1A-18	<i>Fusarium oxysporum</i>
4325	HM-MESA1-1A-19	<i>Fusarium oxysporum</i>
4326	HM-MESA1-1A-20	<i>Fusarium oxysporum</i>
4334	HM-MESA1-1B-07	<i>Cladosporium lignicola</i>
4338	HM-MESA1-1B-11	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>
4339	HM-MESA1-1B-12	<i>Penicillium coprophilum</i>
4340	HM-MESA1-1B-13	<i>Fusarium equiseti</i>
4360	HM-MESA1-2B-07	<i>Fusarium domesticum</i>

Id General	Código	Identidad
4375	HM-MESA1-3A-08	<i>Acremonium antarcticum</i>
4378	HM-MESA1-3A-11	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>
4393	HM-MESA1-3B-10	<i>Fusarium oxysporum</i>
4415	HM-TER1A-1A-19	<i>Fusarium brachygibbosum</i>
4424	HM-TER1A-1B-06	<i>Cladosporium lignicola</i>
4432	HM-TER1A-1B-14	<i>Alternaria alternata</i>
4439	HM-TER1A-1B-21	<i>Fusarium equiseti</i>
4470	HM-TER1A-3A-04	<i>Fusarium oxysporum</i>
4535	HM-TER1B-2A-14	<i>Fusarium oxysporum</i>
4546	HM-TER1B-2B-05	<i>Alternaria alternata</i>
4602	HM-MESD1-1A-09	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>
4608	HM-MESD1-1A-15	<i>Fusarium oxysporum</i>
4615	HM-MESD1-1B-07	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>
4634	HM-MESD1-2A-12	<i>Fusarium oxysporum</i>
4650	HM-MESD1-2B-11	<i>Penicillium spinulosum</i>
4663	HM-MESD1-3B-05	<i>Fusarium delphinoides</i>
4694	HM-MESA2-2B-04	<i>Fusarium delphinoides</i>
4717	HM-TER2A-1A-09	<i>Penicillium dipodomycola</i>
4743	HM-TER2A-1B-17	<i>Penicillium dipodomycola</i>
4744	HM-TER2A-1B-18	<i>Fusarium oxysporum</i>
4759	HM-TER2A-2B-04	<i>Alternaria alternata</i>
4764	HM-TER2A-2B-09	<i>Alternaria tenuissima</i>
4783	HM-TER2B-1A-01	<i>Penicillium dipodomycola</i>
4784	HM-TER2B-1A-02	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>
4801	HM-TER2B-2A-09	<i>Penicillium dipodomycola</i>
4819	HM-TER2B-3A-10	<i>Fusarium oxysporum</i>
4875	HM-MESD2-3A-01	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>
4877	HM-MESD2-3A-03	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>
4878	HM-MESD2-3A-04	<i>Penicillium polonicum</i>
4915	HM-MESA3-1B-09	<i>Penicillium solitum</i>
4965	HM-TER3A-1B-05	<i>Fusarium solani</i>
4966	HM-TER3A-1B-06	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
4984	HM-TER3A-2B-02	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>
4993	HM-TER3A-3A-05	<i>Fusarium delphinoides</i>
4995	HM-TER3A-3A-07	<i>Fusarium delphinoides</i>
5019	HM-MESD3-1B-08	<i>Scedosporium prolificans</i>
5036	HM-MESD3-3A-04	<i>Scedosporium prolificans</i>
5078	HM-MESA4-2B-01	<i>Scopulariopsis hibernica</i>
5083	HM-MESA4-2B-06	<i>Scopulariopsis hibernica</i>
5087	HM-MESA4-3A-03	<i>Acremonium chrysogenum</i>
5089	HM-MESA4-3A-05	<i>Scedosporium prolificans</i>
5106	HM-MES5-1A-08	<i>Acremonium chrysogenum</i>

Id General	Código	Identidad
5128	HM-MES5-2A-05	<i>Penicillium dipodomycola</i>
5207	HM-MES7-1A-06	<i>Penicillium polonicum</i>
5214	HM-MES7-1B-04	<i>Penicillium lapidosum</i>
5240	HM-MES7-3A-07	<i>Penicillium steckii</i>
5261	HM-MAD1-1B-06	<i>Microascus cirrosus</i>
5349	HM-PRF-3B-06	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>

Tabla 3.1. Código de las cepas utilizadas en este trabajo e identidad de cada una de ellas

En cuanto a los patógenos humanos empleados para el estudio de susceptibilidad a los posibles antibióticos que puedan generar las cepas de la colección, se utilizaron dos cepas solicitadas a la Colección Española de Cultivos Tipo (C.E.C.T). El primero es *Escherichia coli*, que es un microorganismo Gram-negativo, y el segundo es *Staphylococcus aureus* que es un Gram-positivo. Ninguna de estas cepas presenta resistencia a antibióticos. Los códigos de las cepas son detallados a continuación:

- *Escherichia coli* CECT 101
- *Staphylococcus aureus* CECT 239

3.3. Medios de cultivo

APHA

Este medio se ha empleado para la obtención de las cepas de los patógenos humanos con los que se trabajó durante el estudio. Los componentes de este medio se describen en la **Tabla 3.2**:

Componente	Cantidad (g/L)
Extracto de Levadura	2,5
Glucosa	1,0
Agar bacteriológico	15,0
Enzima Digestiva Caseína	5,0

Tabla 3.2. Componentes del medio APHA

Para prepararlo se pesó 23,5 g de APHA (Panreac) y 5 g de agar bacteriológico (Panreac) como refuerzo para luego disolverlo en 1 L de agua destilada. A continuación, se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 1 atmósfera de presión y una temperatura de 121 °C. Una vez enfriado se repartió en placas de Petri estériles.

PDA

El medio Agar Dextrosa Patata se utilizó para obtener la colección de hongos en crecimiento activo. Además, se empleó para realizar el enfrentamiento in vitro entre los hongos y los patógenos humanos. Los componentes del medio aparecen en la **Tabla 3.3**:

Componente	Cantidad (g/L)
D(+)-Glucosa	20,0
Infusión de Patata	4,0
Agar	15,0

Tabla 3.3. Componentes del medio PDA

Su preparación consistió en pesar 39 g de PDA (Panreac) y 5 g de agar bacteriológico (Panreac), y disolverlos en 1 L de agua destilada. En el caso del uso para la conservación de la colección de hongos, se vertió en tubos y tras una posterior esterilización en autoclave, se inclinaron. En cambio, para el enfrentamiento primero se esterilizó y luego se vertió en placas de Petri estériles.

Caldo nutritivo

Los componentes del caldo nutritivo aparecen detallados en la **Tabla 3.4**. Este medio se empleó para la determinación de la concentración mínima inhibitoria.

Componente	Cantidad (g/L)
Extracto de Carne	3,0
Peptona de Gelatina	5,0

Tabla 3.4. Componentes del CN

Su procedimiento se basó en pesar 8 g de CN (Panreac) y disolverlos en 1 L de agua destilada. Se repartieron en tubos cortos de 5 mL y finalmente se esterilizaron en autoclave.

PDB

Medio utilizado para la obtención de extracto concentrado de sustancias antibióticas. Los componentes de este medio son los mismos que los del medio PDA a diferencia que este es caldo, por lo tanto, en su preparación se pesaron 39 g y se disolvieron en 1 L de agua destilada, y fueron repartidos en tubos antes de esterilizar en autoclave.

3.4. Recuperación de cepas

Se procedió a la recuperación de los 100 hongos empleados en el estudio. Para ello se aislaron las cepas desde los tubos a placas de PDA, se comprobó el morfotipo con la base de datos fotográfica que posee el grupo de investigación, y posteriormente se sembraron a un tubo fresco de agar inclinado. En aquellos casos en los que el morfotipo, por una posible contaminación, no coincidiera con los depositados en la base de datos se recurrió a la recuperación de dicha cepa a partir de las muestras crioconservadas.

3.5. Enfrentamiento in vitro

El enfrentamiento se llevó a cabo a partir de un cultivo en PDA del hongo incubado durante 72 horas a 30 °C. Con ayuda de un sacabocados se obtuvieron los plugs de hongo (1 cm) que se adicionaron a cada placa de APHA que previamente fue inoculada en masa gracias a un hisopo con el cultivo de *E. coli* y *S. aureus* en fase exponencial (1 placa por patógeno y cepa). Finalmente se incubaron

durante 18 horas a 30 °C para evaluar el efecto supresivo frente a los patógenos humanos tipo (Figura 3.2).

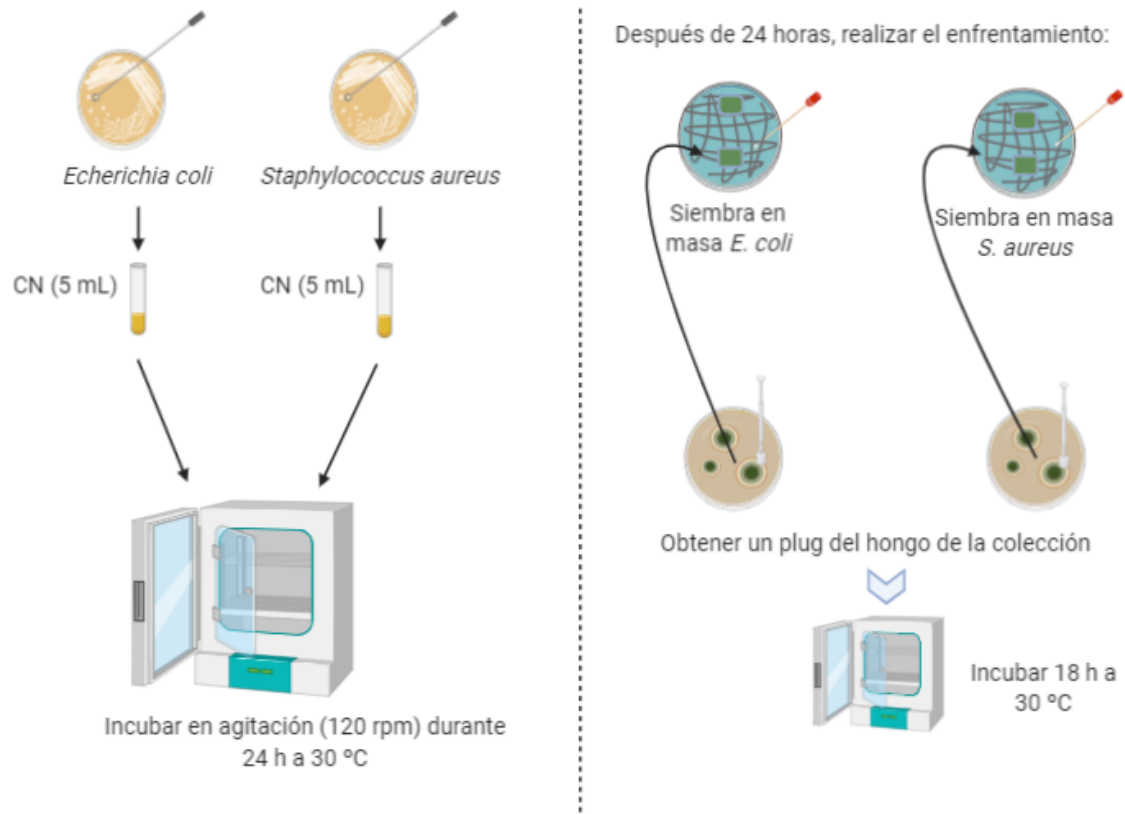


Figura 3.2. Esquema del enfrentamiento in vitro

Por tanto, se pudieron seleccionar las cepas productoras de antibióticos de forma cualitativa, por la presencia de halos de inhibición, y además se pudo determinar la eficacia de las cepas para el control de los patógenos estudiados de forma cuantitativa por la medición del diámetro de los halos generados. De forma que se seleccionaron cepas que generaron halos de inhibición mayores a 18 mm o aquellas que inhibían en ambos patógenos fueron seleccionadas para un estudio en profundidad.

3.6. Obtención de extractos acelulares

Una vez que se seleccionaron las cepas que pueden ser posibles productoras de antibióticos, se incubaron (30 °C en agitación de 120 rpm) durante una semana en tubos cortos de PDB con 5 mL para promover la generación de antibióticos. De esos 5 mL, 1 mL se empleó para hacer el recuento de UFC/mL mediante la técnica de diluciones seriadas (10^{-4} y 10^{-5}). Los 4 mL restantes se repartieron en dos eppendorfs de 2 mL cada uno para elaborar extractos acelulares. Para ello, se centrifugaron los dos eppendorfs durante 10 minutos a 12.000 g. Se filtró el sobrenadante resultante usando una jeringa y un filtro estéril de 0,22 μ m. Finalmente, el extracto obtenido se congeló a -20 °C hasta su uso.

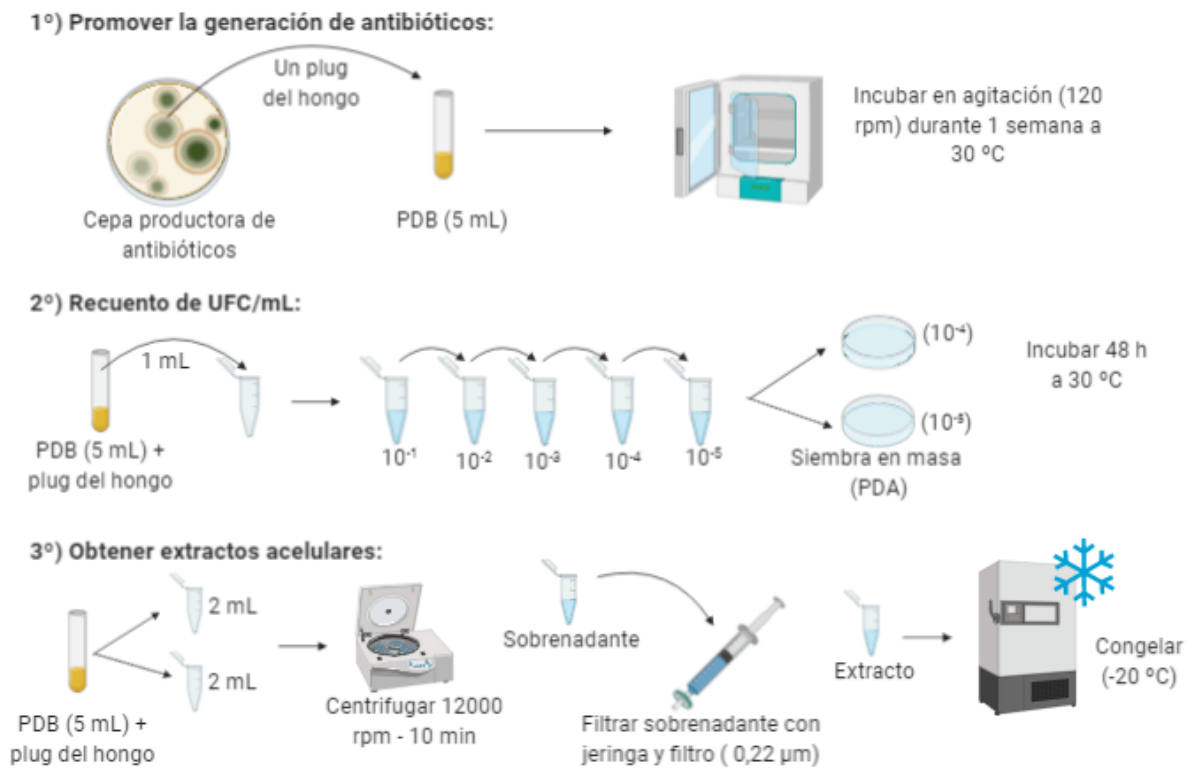


Figura 3.3. Recuento de UFC/mL y obtención de extractos acelulares

3.7. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se define como la menor concentración de un antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento microbiano, es decir, la última concentración en la que no se observa turbidez. Para llevar a cabo este ensayo se emplearon los extractos obtenidos en el paso anterior. Previamente se prepararon dos placas de APHA con los patógenos *E. coli* y *S. aureus* que se incubaron a 37 °C durante 18 horas (se requieren en fase exponencial). A continuación, se preparó el inóculo con 4 o 5 colonias de los patógenos en 5 mL de CN y se incubaron a 37 °C durante 2-5 horas (corresponde a 0,5 en la escala de turbidez de McFarland). Cuando se alcanzó el tiempo de incubación determinado, se tomó 1 mL de dicha suspensión y se diluyó en 99 mL de solución salina estéril (1/100). Se utilizaron microplacas estériles de 96 pocillos donde se inocularon la primera y la última columna con 100 µL de CN y 100 µL de la suspensión *E. coli* y *S. aureus* respectivamente. Otra columna con CN y solución salina estéril, que fue el control negativo. En las columnas libres se añadieron: en el primer pocillo de cada columna 200 µL de cada extracto acelular (tres repeticiones por extracto) y los siguientes tenían 100 µL de CN y 100 µL del extracto diluido en el primer pocillo (**Figura 3.4**). Por lo tanto, se realizaron diluciones seriadas (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128). La lectura de la microplaca se hizo tras un periodo de incubación de 18 horas a 37 °C empleando un lector de microplacas (Biotek) y una longitud de onda de 540 nm. Como se ha mencionado anteriormente se consideró la última dilución del extracto que genere la menor concentración, capaz de inhibir al menos la mitad del crecimiento del patógeno sembrado, es decir, que no se obtenga un crecimiento significativo del patógeno. Para evaluar los valores de CMI obtenidos y poder seleccionar cepas que

nos interesaban fue conveniente realizar análisis estadístico, como un análisis de correlación de Pearson ($p < 0,05$) entre los diámetros de los halos de inhibición y los ensayos de CMI.

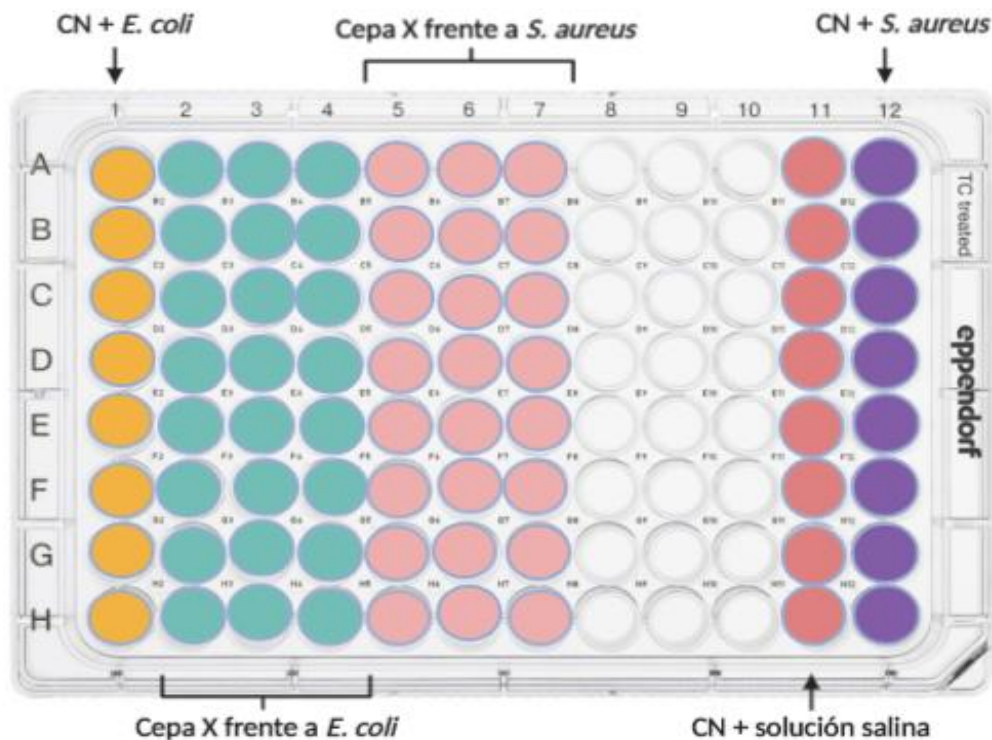


Figura 3.4. Microplaca de 96 pocillos con los distintos componentes de la CMI

3.8. Estudio de los antibióticos generados mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS/MS)

El objetivo fue obtener un concentrado de antibiótico. Para ello, se llevó a cabo la metodología propuesta por Jose et al. (2014), con ciertas modificaciones. La cepa que se seleccionó tras realizar los pasos anteriores se inoculó en matraces de 100 mL de PDB y se incubó durante una semana a 30 °C en agitación continua. Pasado el periodo de incubación se procedió a la separación de la biomasa centrifugando a 5000 g durante 10 minutos. A continuación, al sobrenadante se le añadió acetato de etilo en proporción 1:1 y se mantuvo en agitación 45 minutos. Luego se separaron las fases por decantación y se retuvo la fase de acetato que contenía los compuestos de interés, se volvió a centrifugar durante 10 minutos para eliminar posibles residuos que pudieran quedar de medio de cultivo. Después, mediante un rotavapor se evaporó todo el acetato de etilo para así obtener el extracto concentrado. Finalmente, este extracto se reconstituyó con 200 μ L de metanol y se congeló a -20 °C. Una dilución 1/500 de los extractos concentrados se analizaron en los Servicios Centrales de Investigación de la Universidad de Almería, utilizando un HPLC acoplado a un analizador de masas QTrap. La columna cromatográfica empleada fue Agela Technologies UHP AQ C18, 1.9mm, 2.1x50mm. Las fases móviles utilizadas fueron las siguientes: agua+0.1% de ácido fórmico como fase acuosa y metanol como fase orgánica. El tiempo de análisis fue de 18 minutos a un flujo de 0.35 mL/min. El procesamiento de datos se llevó a cabo por Software Analyst 1.6.2 y MultiQuant 3.0.2 que mediante los

cromatogramas y espectros de masas podrá identificar, de forma presuntiva, los compuestos presentes en cada muestra.

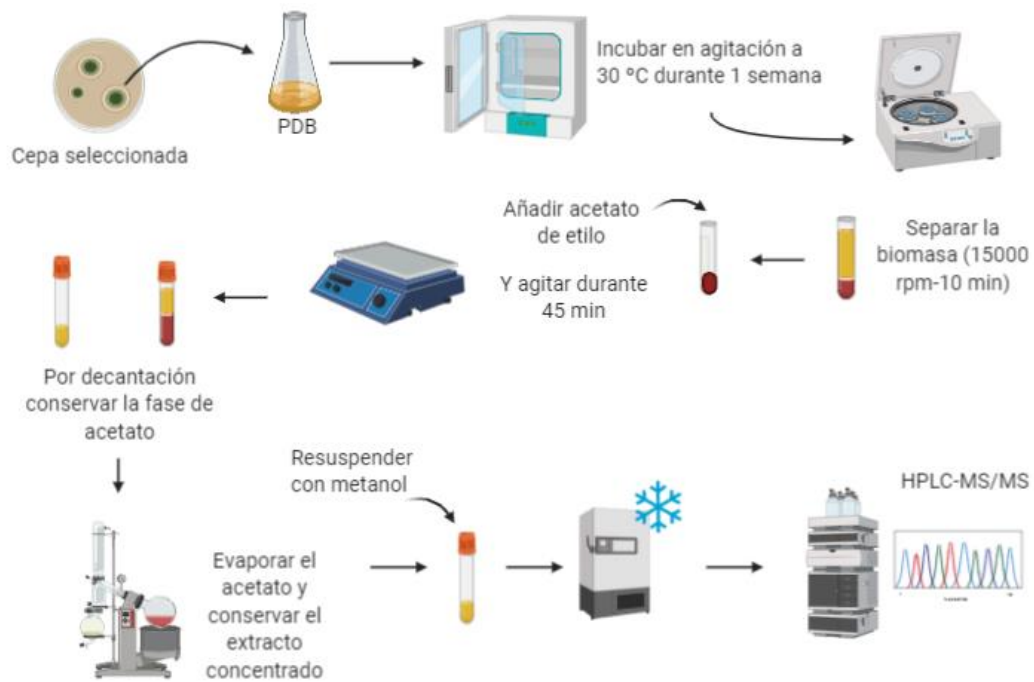


Figura 3.5. Procedimiento de un análisis cromatográfico

4. Resultados y discusión

Según los objetivos planteados en este trabajo y siguiendo el diseño experimental mostrado en la **Figura 3.1.**, a continuación, se describen los resultados obtenidos en cada etapa del ensayo y la discusión de estos, comenzando por los enfrentamientos *in vitro*, seguido del estudio de CMI y finalizando con la identificación de antibióticos mediante técnicas cromatográficas.

4.1. Enfrentamiento *in vitro*

4.1.1. Resultado cualitativo

En la **Tabla 4.1.** se muestran los resultados cualitativos referentes a los enfrentamientos *in vivo* que se han llevado a cabo en el estudio, en esta se recoge, cepa por cepa de la colección estudiada, la aparición de un halo de inhibición generado al enfrentarse a los patógenos humanos empleados en el ensayo:

Código	Halo inhibición <i>S. aureus</i>	Halo inhibición <i>E. coli</i>
HM-MPR-1A-06	-	-
HM-MPR-1A-13	-	-
HM-MPR-1A-16	-	-
HM-MPR-1A-17	-	-

Código	Halo inhibición <i>S. aureus</i>	Halo inhibición <i>E. coli</i>
HM-MPR-1B-06	+	+
HM-MPR-1B-07	+	-
HM-MPR-1B-13	+	-
HM-MPR-1B-14	-	-
HM-MPR-1B-15	+	+
HM-MPR-1B-16	+	-
HM-MPR-1B-18	+	-
HM-MPR-2A-09	+	+
HM-MPR-2A-10	-	-
HM-MPR-2A-11	-	+
HM-MPR-2A-13	-	-
HM-MPR-2A-17	-	+
HM-MPR-2A-18	-	-
HM-MPR-2A-22	+	-
HM-MPR-2A-23	-	-
HM-MPR-2B-15	-	-
HM-MPR-2B-21	+	-
HM-MPR-2B-22	-	-
HM-MPR-3A-07	-	-
HM-MPR-3A-08	-	-
HM-MPR-3A-13	-	-
HM-MPR-3A-15	+	-
HM-MPR-3A-16	+	-
HM-MPR-3B-04	+	-
HM-MPR-3B-07	+	+
HM-MPR-3B-13	-	-
HM-MPR-3B-18	+	-
HM-MESA1-1A-03	+	-
HM-MESA1-1A-05	-	-
HM-MESA1-1A-17	+	-
HM-MESA1-1A-18	+	-
HM-MESA1-1A-19	-	-
HM-MESA1-1A-20	+	-
HM-MESA1-1B-07	-	-
HM-MESA1-1B-11	-	-
HM-MESA1-1B-12	+	+
HM-MESA1-1B-13	+	-
HM-MESA1-2B-07	-	-
HM-MESA1-3A-08	-	-
HM-MESA1-3A-11	-	-
HM-MESA1-3B-10	+	-
HM-TER1A-1A-19	-	-
HM-TER1A-1B-06	-	+
HM-TER1A-1B-14	-	-
HM-TER1A-1B-21	+	-

Código	Halo inhibición <i>S. aureus</i>	Halo inhibición <i>E. coli</i>
HM-TER1A-3A-04	+	-
HM-TER1B-2A-14	+	-
HM-TER1B-2B-05	-	-
HM-MESD1-1A-09	-	-
HM-MESD1-1A-15	+	-
HM-MESD1-1B-07	-	-
HM-MESD1-2A-12	+	-
HM-MESD1-2B-11	-	-
HM-MESD1-3B-05	-	-
HM-MESA2-2B-04	-	-
HM-TER2A-1A-09	-	-
HM-TER2A-1B-17	+	+
HM-TER2A-1B-18	+	+
HM-TER2A-2B-04	+	-
HM-TER2A-2B-09	-	-
HM-TER2B-1A-01	+	+
HM-TER2B-1A-02	-	-
HM-TER2B-2A-09	+	+
HM-TER2B-3A-10	+	-
HM-MESD2-3A-01	-	-
HM-MESD2-3A-03	+	-
HM-MESD2-3A-04	-	-
HM-MESA3-1B-09	-	-
HM-TER3A-1B-05	+	-
HM-TER3A-1B-06	+	-
HM-TER3A-2B-02	+	-
HM-TER3A-3A-05	-	+
HM-TER3A-3A-07	-	+
HM-MESD3-1B-08	-	-
HM-MESD3-3A-04	-	-
HM-MESA4-2B-01	-	-
HM-MESA4-2B-06	-	-
HM-MESA4-3A-03	+	-
HM-MESA4-3A-05	-	-
HM-MES5-1A-08	-	-
HM-MES5-2A-05	+	+
HM-MES7-1A-06	-	-
HM-MES7-1B-04	-	+
HM-MES7-3A-07	+	-
HM-MAD1-1B-06	-	-
HM-PRF-3B-06	+	+

Tabla 4.1. Resultado de los enfrentamientos de las 100 cepas. El signo + indica la producción de halo de inhibición; signo -, no producción del halo

En total se realizaron 200 enfrentamientos (**Tabla 4.1**), resultando 11 cepas positivas para ambos patógenos. En *S. aureus*, el porcentaje de positivos fue un 40%; mientras que en *E. coli* este porcentaje disminuyó a un 17% respecto del total. En definitiva, de todas las cepas de hongos, un total de 46 cepas dieron resultados positivos. Los porcentajes obtenidos en el ensayo reflejan la importancia de este grupo microbiano en la producción de antibióticos en pilas de compostaje. Uno de los objetivos que persigue principalmente el proceso de compostaje es reciclar los residuos orgánicos que se generan. Para ello, diferentes comunidades microbianas se suceden durante las etapas del proceso de compostaje para llevar a cabo la transformación y estabilización de la materia orgánica (López-González et al., 2013). El parámetro más influyente en la higienización de las pilas de compostaje es la temperatura (Vargas-García et al., 2010). Para lograr el saneamiento del material, la temperatura debe ser superior a 55°C durante la fase termofílica, mínimo tres días consecutivos. Aunque se puede llegar a alcanzar un máximo de 70°C en determinadas etapas del proceso (Estrella-González et al., 2020). Este aumento de temperatura evidencia la actividad microbiana dentro de la pila de compostaje. El principal inconveniente de las altas temperaturas es que limitan el crecimiento de los hongos, aunque muchos de ellos se adaptan a estas condiciones térmicas (López-González et al., 2013). Además de la temperatura, la capacidad que muestran algunas especies para producir sustancias antimicrobianas es clave en la higienización de las pilas ya que va a hacer que aumenten selectivamente las poblaciones de microorganismos beneficiosos.

En la pila de compostaje se localizan diferentes grupos microbianos, entre ellos bacterias, hongos y actinomicetos que producen metabolitos secundarios, como antibióticos, con actividad supresora contra ciertos patógenos del suelo (Zaccardelli et al., 2013). Uno de los recursos más importantes para el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos son los hongos, los cuales han proporcionado fármacos tan importantes como la penicilina o el inmunosupresor ciclosporina. Un estudio demostró que los genes que se expresan para producir metabolitos secundarios es mucho menor que aquellos que permanecen silenciados (Kawaguchi et al., 2013). Por ello se considera que estos microorganismos tienen un gran potencial para la producción de metabolitos secundarios. Tras realizar el estudio en la colección de 100 aislados se observó que aproximadamente la mitad de la colección tenía capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos humanos comunes.

En la actualidad, existe una búsqueda continua de nuevos antibióticos que puedan hacer frente a infecciones farmacorresistentes (WHO, 2020). Aun así, en vías de desarrollo, el número de agentes antibióticos sigue siendo bajo. No obstante, son diferentes los estudios que se llevan a cabo para descubrir nuevas estrategias terapéuticas que puedan vencer a las superbacterias. Por ejemplo, un estudio reciente del CSIC ha demostrado que infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa* se pueden combatir empleando una combinación de antibióticos (tobramicina y fosfomicina) (Hernando-Amado et al., 2020). El estudio del entorno natural es importante, ya que se ha descubierto que un hongo llamado *Pseudoplectania nigrella*, es capaz de generar plectasina, una defensina, que puede actuar contra *Streptococcus pneumoniae* casi con la misma eficacia que lo hace antibióticos como la penicilina y vancomicina (Coombs, 2005).

Un aspecto que destacar del ensayo fue que los antibióticos producidos por los hongos presentaron mayor efectividad en *S. aureus* que en *E. coli*. En el primer caso tenemos una especie Gram-positiva, mientras que la segunda especie se trata de una Gram-negativa. En los datos obtenidos se observa que en especies Gram-positivas los antibióticos son más eficaces. La explicación a este hecho parece justificarse en la presencia de la membrana externa que tienen las bacterias Gram-negativas rodeando a la capa de peptidoglicano, dificultando de esta forma la acción de los antibióticos (Calvo & Martínez-Martínez, 2009).

4.1.2. Resultado cuantitativo

Los resultados obtenidos de los enfrentamientos *in vitro* realizados en el ensayo se muestran en las **Figuras 4.1-4.6**, en ellas se presentan el diámetro de halo de inhibición generado por cada cepa para los dos patógenos humanos (*S. aureus* y *E. coli*):

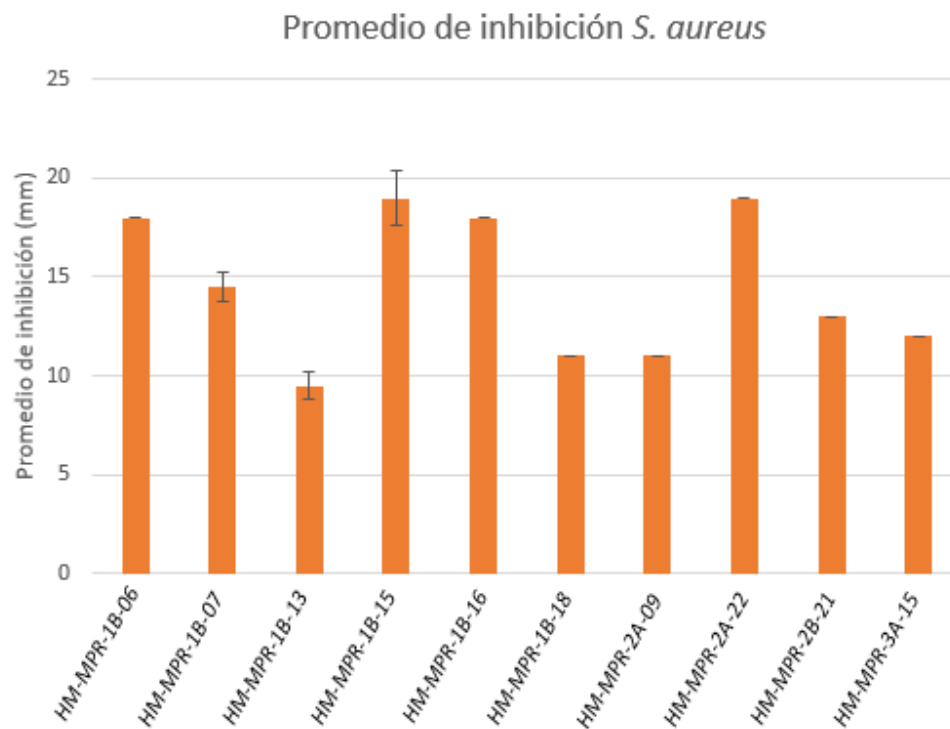


Figura 4.1. Valores promedio de los halos de inhibición generados por cada cepa productora de antibiótico al enfrentarlas a *S. aureus*. La barra de error indica la desviación típica producida por las 4 repeticiones empleadas en el ensayo.

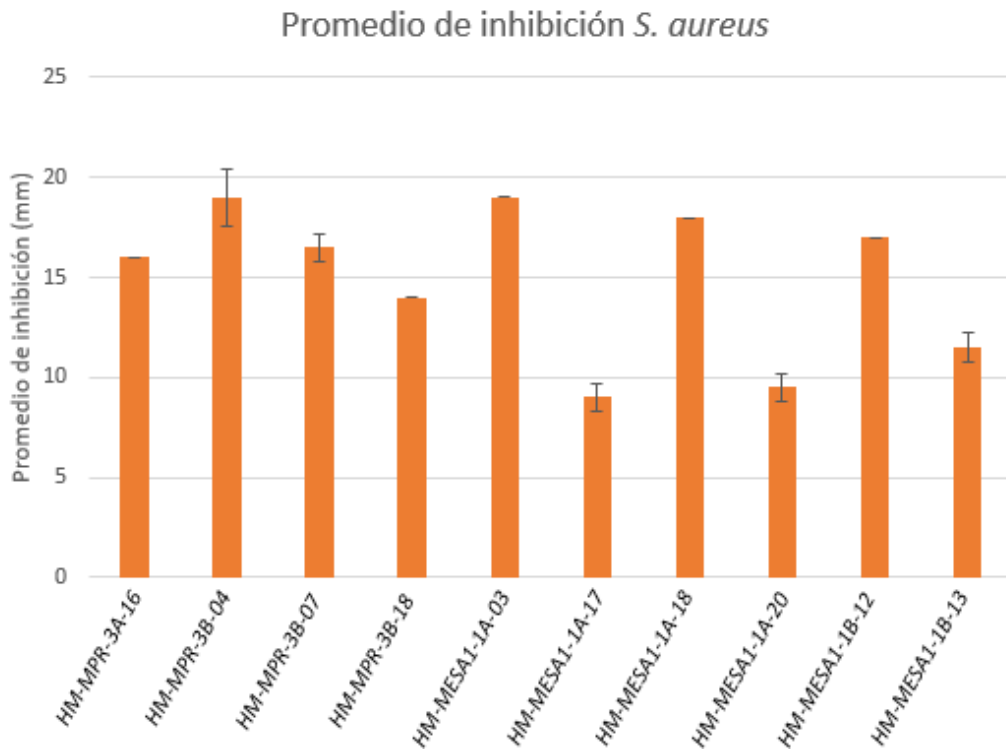


Figura 4.2. Valores promedio de los halos de inhibición generados por cada cepa productora de antibiótico al enfrentarlas a *S. aureus*. La barra de error indica la desviación típica producida por las 4 repeticiones empleadas en el ensayo.

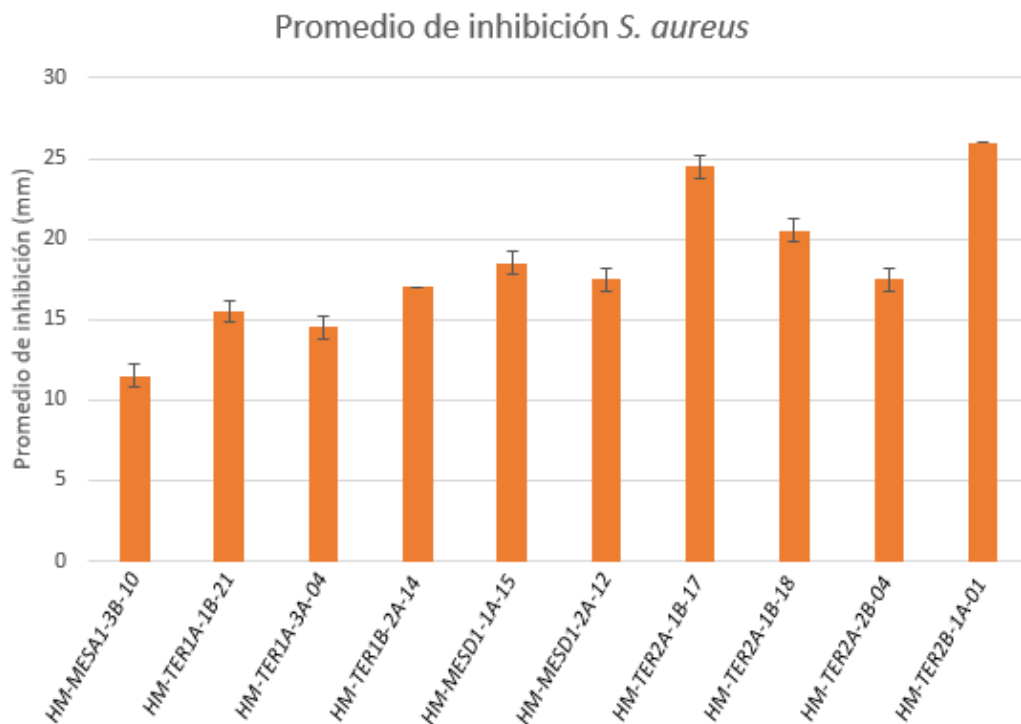


Tabla 4.3. Valores promedio de los halos de inhibición generados por cada cepa productora de antibiótico al enfrentarlas a *S. aureus*. La barra de error indica la desviación típica producida por las 4 repeticiones empleadas en el ensayo.

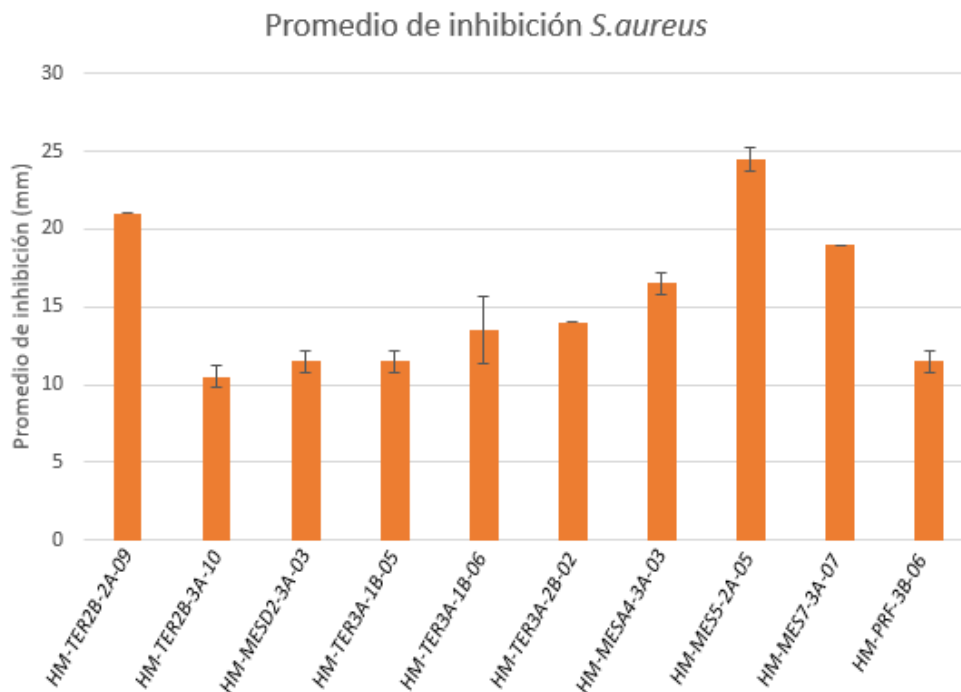


Tabla 4.4. Valores promedio de los halos de inhibición generados por cada cepa productora de antibiótico al enfrentarlas a *S. aureus*. La barra de error indica la desviación típica producida por las 4 repeticiones empleadas en el ensayo.

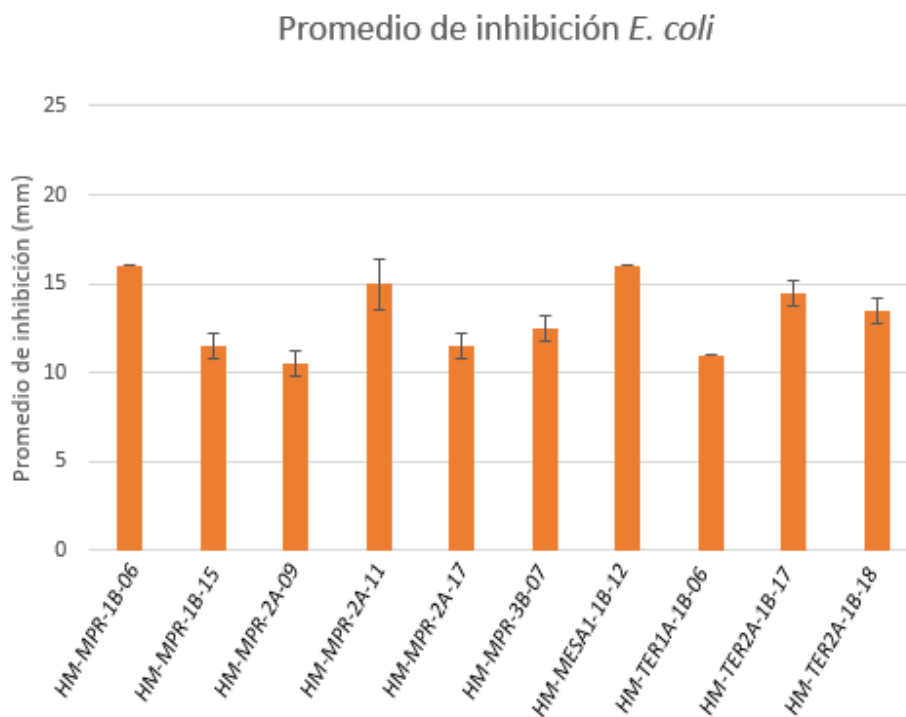


Tabla 4.5. Valores promedio de los halos de inhibición generados por cada cepa productora de antibiótico al enfrentarlas a *E. coli*. La barra de error indica la desviación típica producida por las 4 repeticiones empleadas en el ensayo.

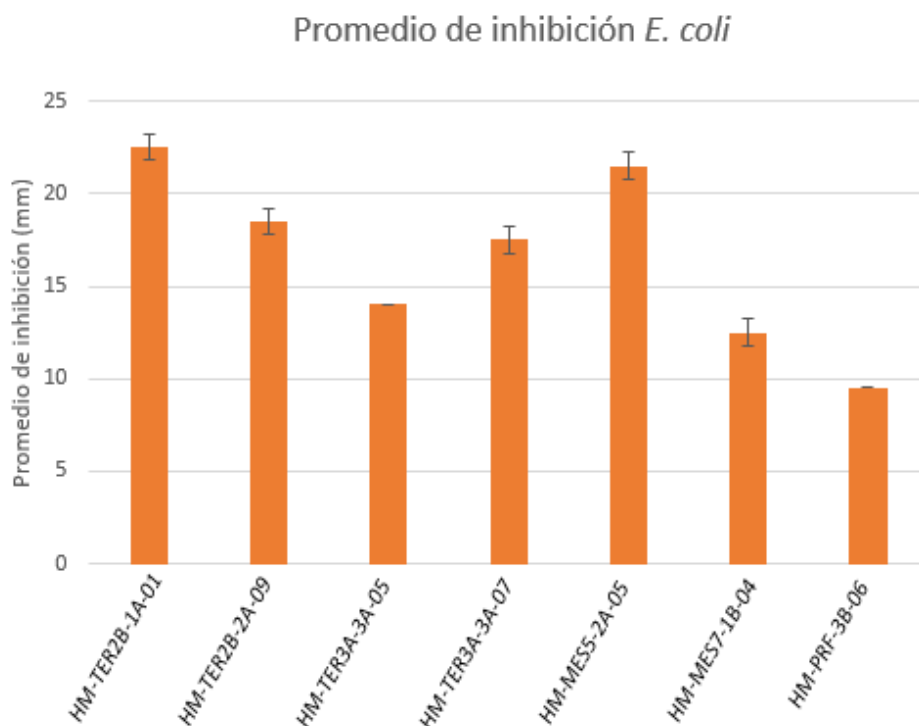


Tabla 4.6. Valores promedio de los halos de inhibición generados por cada cepa productora de antibiótico al enfrentarlas a *E. coli*. La barra de error indica la desviación típica producida por las 4 repeticiones empleadas en el ensayo.

Como se puede observar en las **Figuras 4.1-4.6**, *S. aureus* presentó un promedio de inhibición superior al detectado en *E. coli*. El promedio total de inhibición para *S. aureus* fue de 15,65 mm, mientras que para *E. coli* fue de 13,78 mm. Existe una diferencia pequeña entre ambos, pero hay que destacar que el número de cepas positivas para *S. aureus* fue mucho mayor que para *E. coli*.

Algunas de las cepas ejercieron un efecto inhibitorio y de amplio espectro para ambos patógenos con diámetros similares. Aunque hubo una que destacó, esta cepa fue *Penicillium coprophilium* (HM-MESA1-1B-12), cuyo promedio de inhibición para *S. aureus* y *E. coli* fueron 17 y 16 mm, respectivamente (**Figura 4.7**).

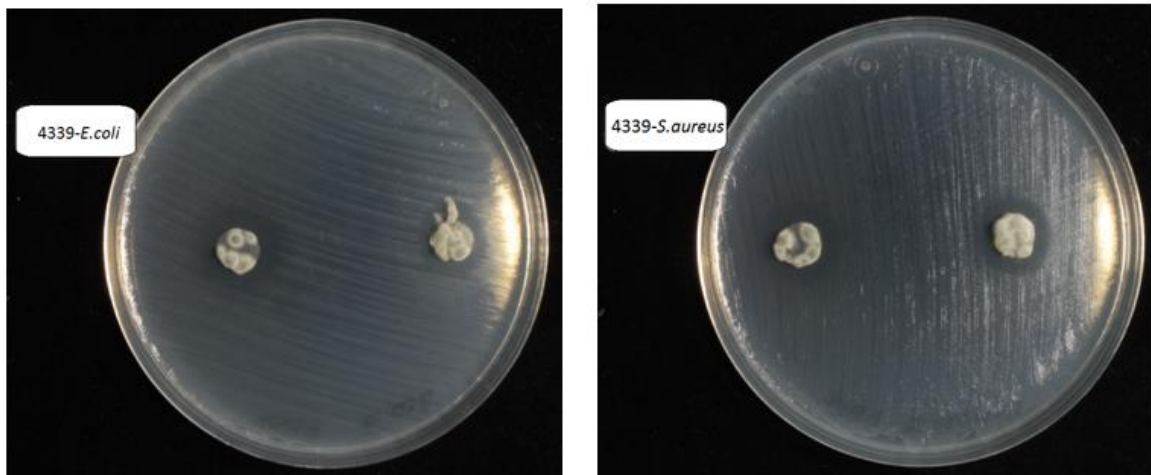


Figura 4.7. Imagen de uno de los enfrentamientos *in vitro* del ensayo.

Para llevar a cabo la siguiente fase del estudio se seleccionaron las cepas que generaron supresión para ambos patógenos (11 cepas). También se escogió una cepa por su capacidad para inhibir *S. aureus* en exclusiva. Esta cepa fue *Penicillium steckii* (HM-MES7-3A-07), cuyo promedio de inhibición fue de 19 mm.

4.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria

La CMI permite determinar cuál es la concentración necesaria para que un antibiótico sea capaz de inhibir el crecimiento del patógeno. Trata de una técnica espectrofotométrica mediante la cual se calcula la concentración de biomasa midiendo la turbidez. De esta forma, cuanto menor sea el valor de la turbidez, mayor será el efecto antimicrobiano y, por tanto, el crecimiento del patógeno será menor.

Partiendo de las cepas que dieron resultados positivos seleccionadas en el punto anterior, y tras la obtención de sus extractos acelulares se llevó a cabo el estudio de la CMI obteniendo los resultados representados en la **Tabla 4.2**. Estos datos muestran la dilución máxima de cada cepa en el estudio de la CMI frente a *S. aureus* y *E. coli* sin que se genere una aparición significativa de turbidez. Además, se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) de los hongos para garantizar que son estas cepas las que generan los compuestos antimicrobianos, tras el periodo de incubación.

Código	Identidad	CMI (<i>E. coli</i>)	CMI (<i>S. aureus</i>)	Recuento
HM-MPR-1B-06	<i>Fusarium oxysporum</i>	1/2	1/4	6,5x10 ⁶
HM-MPR-1B-15	<i>Penicillium spinulosum</i>	1/2	1/4	1,5x10 ⁶
HM-MPR-2A-09	<i>Penicillium spinulosum</i>	1/2	1/8	1,9x10 ⁷
HM-MPR-3B-07	<i>Penicillium spinulosum</i>	1/4	1/4	1x10 ⁶
HM-MESA1-1B-12	<i>Penicillium coprophilum</i>	1/8	1/16	2,6x10 ⁷
HM-TER2A-1B-17	<i>Penicillium dipodomycola</i>	1	1/2	8,5x10 ⁶
HM-TER2A-1B-18	<i>Fusarium oxysporum</i>	1/2	1/2	2x10 ⁶
HM-TER2B-1A-01	<i>Penicillium dipodomycola</i>	1/4	1/4	4,9x10 ⁷
HM-TER2B-2A-09	<i>Penicillium dipodomycola</i>	1/2	1/2	5,5x10 ⁷
HM-MES5-2A-05	<i>Penicillium dipodomycola</i>	1/4	1/4	2,1x10 ⁷
HM-MES7-3A-07	<i>Penicillium steckii</i>	-	1/2	2,8x10 ⁷
HM-PRF-3B-06	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	1	1/4	1,5x10 ⁶

Tabla 4.2. Resultados obtenidos de CMI y recuento (UFC/mL) para las cepas seleccionadas en el ensayo.

Los resultados obtenidos de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) evidenciaron diferentes comportamientos según el patógeno ensayado. En la **Tabla 4.2** se observa que para *S. aureus* los valores de CMI fueron menores que para *E. coli*. Estos resultados apoyaron la conclusión obtenida en el ensayo anterior de los enfrentamientos *in vitro*, donde se determinaba una mayor efectividad de los antibióticos producidos por hongos frente a Gram-positivos.

En el estudio de la CMI se encontraron varias cepas cuyo efecto inhibitorio dejaba de tener efecto diluido más allá de 1/2 para el patógeno Gram-negativo, es decir, solamente cuatro cepas alcanzaron diluciones de 1/4 o superior para *E. coli*. De esta forma, un 4% de las cepas totales mostraron una supresión significativa del crecimiento en Gram-negativos. En cambio, para *S. aureus* fueron ocho cepas las que alcanzaron un valor de dilución de 1/4 o superior, resultando un 8% de las cepas totales para Gram-positivos.

La cepa 4229 de *Penicillium spinulosum* generó una mayor inhibición del crecimiento en *S. aureus* (1/8) que en *E. coli* (1/2). De las doce cepas seleccionadas, tres de ellas fueron capaces de suprimir el crecimiento de ambos patógenos con una dilución de 1/4, estas cepas son 4783 y 5128, ambas cepas de *Penicillium dipodomycola*, y la cepa 4293 de *Penicillium spinulosum*.

Pero el caso más destacado fue el de la cepa 4339. Se trata de una cepa de *Penicillium coprophilum* que fue capaz de ejercer una supresión del crecimiento con una dilución de 1/16 del extracto acelular. Por lo tanto, los mejores resultados se obtuvieron de esta cepa siendo de 1/4 para *E. coli* y de 1/16 para *S. aureus*.

Una vez obtenidos los valores de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para cada cepa, se correlacionaron con el diámetro del halo de inhibición generado en los enfrentamientos *in vitro*. Para ello se calculó el coeficiente de correlación de Pearson para ambos ensayos. Los resultados para los dos casos fueron poco ajustados; para *S. aureus* -0,31 y para *E. coli* -0,51, lo cual indica que, si una variable aumenta, la otra disminuye. Sin embargo, los valores de R no mostraron una buena correlación entre los dos ensayos, por lo que, no se puede seleccionar una cepa simplemente en base al ensayo *in vitro* resultante. Los valores de la CMI y los resultados de los enfrentamientos son complementarios y

predicen de forma más eficaz la actuación de las moléculas antimicrobianas, bien porque en la prueba de CMI se prescinde del factor de difusión antibiótico a través del agar o bien porque la cantidad de inóculo patogénico es más reducido inicialmente, por lo que, la precisión del ensayo es superior. Este fenómeno se ha descrito anteriormente en estudios similares (Quintero et al., 2018).

4.3. Análisis cromatográfico

En el presente trabajo se identificaron múltiples especies de hongos que son una fuente altamente potencial en la detección de nuevos metabolitos con acción antimicrobiana, las cuales quedaron reflejadas en la **Tabla 4.2**. Por ello, debido a la enorme variedad de moléculas bioactivas que son generadas por los hongos, no se optó por realizar un estudio molecular de la producción de antibióticos (Lerma, 2019). En este caso se recurrió a equipos cromatográficos (HPLC acoplado a un analizador de masas Qtrap) para detectar biomoléculas de interés producidas por los agentes productores de antibióticos. Para llevar a cabo este ensayo se seleccionó una cepa productora de antibióticos que dio buenos resultados en el estudio de la CMI y un significativo diámetro del halo de inhibición, *Penicillium coprophilum* (4339).

La técnica de HPLC-MS/MS combina la separación de moléculas bioactivas con la detección y cuantificación de las mismas. Por ello se emplea con frecuencia en la industria farmacológica (Matamala, 2019). Además, para la detección de los compuestos con actividad antibacteriana, antifúngica y fitohormonas se realizó una búsqueda en una base de datos de 296 compuestos. Los resultados se muestran en un cromatograma cuya resolución va a depender de la selectividad y la retención proporcionalmente. A continuación, se muestran los cromatogramas obtenidos en el ensayo (**Figuras 4.8-4.9**):

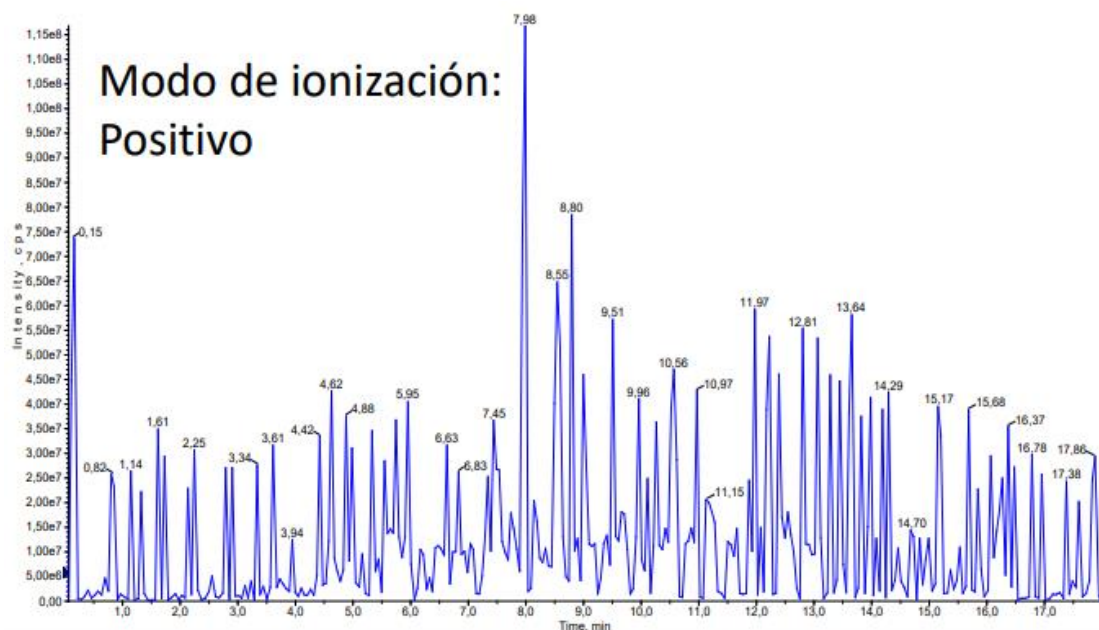


Figura 4.8. Cromatograma del extracto acelular de la cepa 4339 entre los tiempos 0 y 17 minutos.

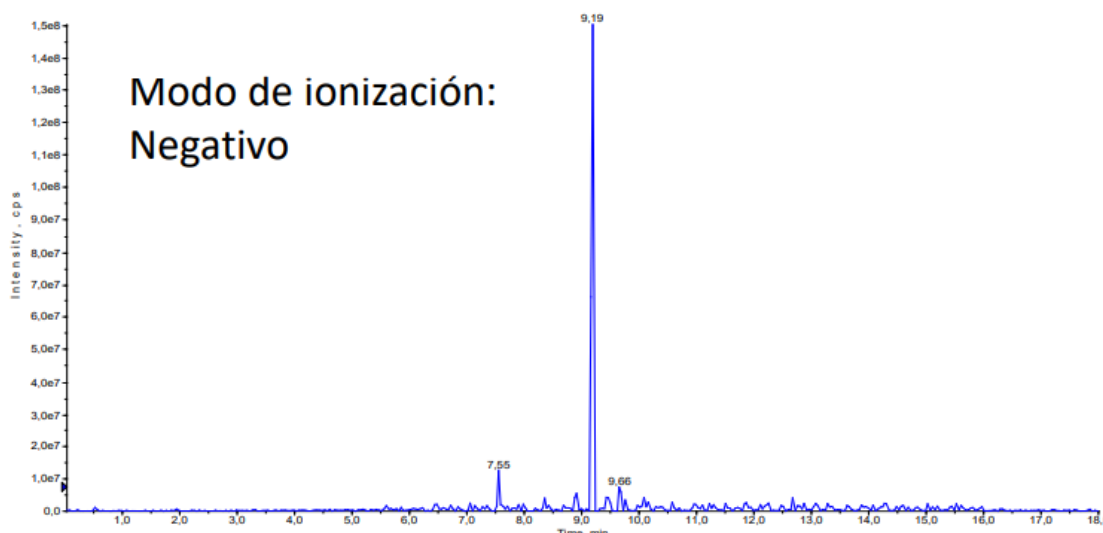


Figura 4.9. Cromatograma del extracto de muestra en blanco entre los tiempos 0 y 17 minutos.

Las interpretaciones de los cromatogramas revelan la detección de múltiples analitos. La mayoría de ellos se detectaron en el extracto de muestra en blanco, por lo tanto, resultaron ser falsos positivos como por ejemplo Benzododecinium, Hexazinone o Oxamyl, entre otros. En la muestra analizada se detectó un positivo en el tiempo de retención 7,98 minutos que recibe el nombre de Fenfuram. La comparación de los espectros experimentales obtenidos con los espectros teóricos junto con las transiciones MS/MS con las que se trabajó, permitió confirmar este resultado. Este compuesto, cuyo código de identidad es 90590, es un reconocido fungicida y bactericida. Su fórmula molecular es $C_{12}H_{11}NO_2$ y su peso molecular 201,22 g/mol (Base de datos Pubchem; <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Además, hubo dos compuestos que mostraron cromatogramas de una de las dos transiciones y espectros experimentales, aceptables. Estos analitos fueron Furalaxyl (fungicida, bactericida) y Methotrexate (citostático, inmunosupresor).

Aunque los resultados obtenidos en este trabajo revelan la producción de compuestos bioactivos interesantes por parte de la cepa *Penicillium coprophilum*, es importante confirmar estos resultados con más evidencias llevando a cabo diferentes estudios, ya sean genéticos o químicos. A pesar de ello, no hay que desestimar el potencial que muestran las moléculas que se han detectado, ya que tienen un importante interés sanitario y agronómico. El Fenfuram es un fungicida capaz de inhibir la enzima succinato deshidrogenasa y actuar como un antifúngico agroquímico. Se emplea para tratar semillas, de forma que puede prevenir, mitigar o destruir plagas. Las dos moléculas, que posiblemente sean producidas también por esta cepa, también son de importancia. El Furalaxyl es un fungicida que actúa previniendo plagas al igual que el Fenfuram. En cambio, el Methotrexate muestra una actividad antineoplásica e inmunosupresora ya que es capaz de unirse a la enzima dihidrofolato reductasa e inhibir la síntesis de nucleótidos, la síntesis de ADN y ARN. Su actividad inmunosupresora no muestra aún un mecanismo de acción claro (Base de datos Pubchem; <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

5. Conclusiones

- 1- Entre los diferentes microorganismos que conviven en el proceso de compostaje, los hongos presentan un gran potencial en la búsqueda de nuevas moléculas antimicrobianas que sean capaces de hacer frente al problema de las resistencias bacterianas.

- 2- En el compost existe una importante biodiversidad fúngica generadora de antibiosis, además de destacar el género *Penicillium* como principal agente productor de antibióticos, también son importantes géneros como *Fusarium*, *Cladosporium* y *Scopulariopsis*, entre otros.

- 3- Los aislados de hongos producen compuestos antimicrobianos con un efecto supresor del crecimiento de patógenos mayor en especies Gram-positivas, aunque el efecto que presentan en especies Gram-negativas también es considerable.

- 4- Los ensayos de la Concentración Mínima Inhibitoria permitieron conocer de forma más precisa el efecto supresor del antimicrobiano generado por los hongos del estudio, respecto a los clásicos ensayos de screening *in vitro*.

- 5- En función de los datos obtenidos de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y los enfrentamientos *in vivo*, se seleccionó una cepa de *Penicillium coprophilum*, cuya producción de moléculas bioactivas tiene interés para la agricultura y la industria biosanitaria.

6. Bibliografía

- Bérdy, J. 2005. Bioactive Microbial Metabolites. *The Journal of Antibiotics* 58, 1-26.
- Bleicher, A., Kavanagh, A., Koch, S., Manning, C. y Rivera, M. 2020. Emerging and Ebbing Threats. <https://www.ucsf.edu/magazine/infectious-disease> Consultado mayo 2020.
- Calvo, J. y Martínez-Martínez, L. 2009. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 27, 44-52.
- Castellano-González, M.J. y Perozo-Mena, A.J. 2010. Mecanismos de resistencia a antibióticos β -lactámicos en *Staphylococcus aureus*. *Kasmera* 38(1), 18-35.
- Coombs, A. 2015. Disease Fighter Found in Fungi. <https://www.sciencemag.org/news/2005/10/disease-fighter-found-fungi> Consultado agosto 2020.
- Estrella-González, M.J., López-González, J.A., Suárez-Estrella, F., López, M.J., Jurado, M.M., Siles-Castellano, A.B. y Moreno, J. 2020. Evaluating the influence of raw materials on the behavior of nitrogen fractions in composting processes on an industrial scale. *Bioresource Technology* 303, 122945.
- Hernando-Amado, S., Sanz-García, F., y Martínez Menéndez, J.L. 2020. Rapid and robust evolution of collateral sensitivity in *Pseudomonas aeruginosa* antibiotic-resistant mutants. *Science Advances* 6, eaba5493.
- Jenssen, H., Hamill, P. y Hancock, R.E. 2006. Peptide Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 491-511.
- 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* 201, 456070.
- Jurado, M.M., Camelo-Castillo, A.J., Suárez-Estrella, F., López, M.J., López-González, J.A., Estrella-González, M.J., Siles-Castellano, A.B. y Moreno, J. 2020. *Journal of Environmental Management* 265, 110-528.
- Kawaguchi, M., Nonaka, K., Masuma, R. y Tomoda, H. 2013. New method for isolating antibiotic-producing fungi. *The journal of Antibiotics* 66, 17-21.
- Krylov, V.N. 2001. Phage Therapy in Terms of Bacteriophage Genetics: Hopes, Prospects, Safety, Limitations. *Russian Journal of Genetics* 37, 715-730.
- Laverty, G., Gorman, S.P. y Gilmore, B.F. 2011. The Potential of Antimicrobial Peptides as Biocides. *International Journal of Molecular Sciences* 12, 6566-6596.

- Lerma, M.R. 2019. Búsqueda de agentes productores de antibióticos entre aislados del género *Bacillus* procedentes del proceso de compostaje. Trabajo Final de Grado. Universidad de Almería.
- López-González, J.A. 2015. Aspectos microbiológicos del proceso de compostaje de restos vegetales. Tesis Doctoral. Universidad de Almería.
- López-González, J.A., Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M.C., López, M.J., Jurado, M.M. y Moreno, J. 2015b. Biodiversity and succession of mycobiota associated to agricultural lignocellulosic waste-based composting. *Bioresource Technology* 187, 305-313.
- López-González, J.A., Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M.C., López, M.J., Jurado, M.M. y Moreno, J. 2015a. Dynamics of bacterial microbiota during lignocellulosic waste composting: Studies upon its structure, functionality and biodiversity. *Bioresource Technology* 175, 406-416.
- 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.
- Martínez-Gallardo, M.R., López, M.J., Jurado, M.M., Suárez-Estrella, F., López-González, J.A., Sáez, J.A., Moral, R. y Moreno, J. 2020. Bioremediation of Olive Mill Wastewater sediments in evaporation ponds through in situ composting assisted by bioaugmentation. *Science of the Total Environment* 703, 135-537.
- Matamala, M. 2019. Producción de sustancias de carácter antimicrobiano por actinobacterias aisladas en procesos de compostaje. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Almería.
- McInnes, R.S., McCallum, G.E., Lamberte, L.E. y van Schaik, W. 2020. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in the human gut microbiome. *Current Opinion in Microbiology* 53, 35-43.
- Merino, L.A., Hreñuk, G.E., Ronconi, M.C. y Alonso, J.M. 2004. Resistencia a antibióticos y epidemiología molecular de *Shigella* spp. en el nordeste argentino. *Revista Panameña de Salud Pública* 15(4), 219-24.
- 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 aspect of compost production and use. *Acta Horticulturae (ISHS)* 1013, 443-457.
- Neher, D.A., Weicht, T.R., 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.

- Pereira, E., Santos, A., Reis, F., Tavares, R.M., Baptista, P., Lino-Neto, T. y Almeida-Aguiar, C. 2013. A new effective assay to detect antimicrobial activity of filamentous fungi. *Microbiological Research* 168, 1-5.
- Pérez-Silva, A. 1959. Acción antimicrobiana de algunos antibióticos extraídos de hongos superiores. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 24, 1-13.
- Pergola, M., Persiani, A., Palese, A.M., Meo, V., Pastore, V., Adamo, C. y Celano, G. 2018. Composting: The way for a sustainable agriculture. *Applied Soil Ecology* 123, 744-750.
- Pinheiro, E.A.A., Pina, J.R.S., Feitosa, A.O., Carvalho, J.M., Borges, F.C., Marinho, P.S.B. y Marinho, A.M.R. Bioprospecting of antimicrobial activity of extracts of endophytic fungi from *Bauhinia guianensis*. *Revista Argentina de Microbiología* 49(1), 3-6.
- Quick, M. y Hollowood, E. 2014. Antibiotic Resistance. <https://www.cdc.gov/drugresistance/> Consultado mayo 2020.
- 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? *Revista Española de Quimioterapia* 31, 101-104.
- 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.
- 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., Rabinowitsch, 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.
- Siles-Castellano, A.B., López, M.J., López-González, J.A., Suárez-Estrella, F., Jurado, M.M., Estrella-González, M.J. y Moreno, J. 2020. Comparative analysis of phytotoxicity and compost quality in industrial composting facilities processing different organic wastes. *Journal of Cleaner Production* 252, 119-820.
- Stokes, J.M., Yang, K., Swanson, K., Jin, W., Cubillos-Ruiz, A., Donghia, N.M., McNair, C.R., French, S., Carfrae, L.A., Bloom-Ackermann, Z., Tran, V.M., Chiappino-Pepe, A., Badran, A.H., Andrews, I.W., Chory, E.J., Church, G.M., Brown, E.D., Jaakkola, T.S., Barzilay, R. y Collins, J.J. 2020. A deep learning approach to antibiotic discovery. *Cell* 180, 688-702.

- Suárez-Estrella, F., Jurado, M.M., López, M.J., López-González, J.A., Moreno, J. 2019. Role of bacteria isolated from a plant waste-based compost producing bioactive substances in the control of bacterial spot syndrome caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 20, 101-198.
- 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 blaNDM-5 and mcr-1 by an IncX3-X4 hybrid plasmid in *Escherichia coli*. *Nature Microbiology* 1, 16176
- Troncoso, C., Pavez, M., Santos, A., Salazar, R. y Barrientos, L. 2017. Implicancias Estructurales y Fisiológicas de la Célula Bacteriana en los Mecanismos de Resistencia Antibiótica. *Int. J. Morphol* 35(4), 1214-1223.
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A. y Itavaara, M. 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment. *Bioresource Technology* 72, 169-183.
- Turan, N.B. y Engin, E.O. 2018. Chapter Four - Quorum Quenching. In: Chormey, D.S., Bakırdere, S., Turan, N.B., Engin, G.O., *Fundamentals of Quorum Sensing, Analytical Methods and Applications in Membrane Bioreactors*. *Comprehensive Analytical Chemistry* 81, 117-149.
- Van-Ewijk, S. y Stegemann, J.A. 2020. Recognising waste use potential to achieve a circular economy. *Waste Management* 105, 1-7.
- Vargas-García, M.C., Suárez-Estrella, F., López, M.J. y Moreno, J. 2010. Microbial population dynamics and enzyme activities in composting processes with different starting materials. *Waste Management* 30, 771-778.
- Vivas, J.R. 2019. *Superbacterias*. Editorial Guadalmazán. España.
- 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 mayo 2020.
- WHO. 2014. El primer informe mundial de la OMS sobre la resistencia a los antibióticos pone de manifiesto una grave amenaza para la salud pública en todo el mundo. <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/es/> Consultado mayo 2020.
- WHO. 2017. Published list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> Consultado junio 2020.
- WHO. 2020. La falta de nuevos antibióticos pone en peligro los esfuerzos mundiales por contener las infecciones farmacorresistentes. <https://www.who.int/es/news->

[room/detail/17-01-2020-lack-of-new-antibiotics-threatens-global-efforts-to-contain-drug-resistant-infections](#) Consultado agosto 2020.

Wright, G.D. 2016. Antibiotic adjuvants: rescuing antibiotics from resistance. *Trends in Microbiology* 24, 862-871.

Yeaman, M.R. y Yount, N.Y. 2003. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacol Reviews* 55, 27-55.

Zaccardelli, M., De Nicola, F., Vilecco, D. y Scotti, R. 2013. The development and suppressive activity of soil microbial communities under compost amendment. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 13, 730-742.