



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología

**Determinación de la actividad antagonista de
microorganismos ambientales frente a *Escherichia coli*
ATCC 25922**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Para optar el Grado Académico de Bachiller en Microbiología y
Parasitología

AUTOR

Ana Paula PALACIOS RODRIGUEZ

ASESORES

Dr. Tito Libio SÁNCHEZ ROJAS

Dr. Abraham Omar ESPINOZA CULUPÚ (Coasesor)

Lima, Perú

2022



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Palacios, A. (2022). *Determinación de la actividad antagonista de microorganismos ambientales frente a Escherichia coli ATCC 25922*. [Trabajo de investigación de bachiller, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

| Datos de autor | |
|----------------------------------|---|
| Nombres y apellidos | Ana Paula Palacios Rodriguez |
| Tipo de documento de identidad | DNI |
| Número de documento de identidad | 72472425 |
| URL de ORCID | https://orcid.org/0000-0003-2687-3208 |
| Datos de asesor | |
| Nombres y apellidos | Tito Libio Sánchez Rojas |
| Tipo de documento de identidad | DNI |
| Número de documento de identidad | 08550935 |
| URL de ORCID | https://orcid.org/0000-0003-3853-2128 |
| Datos de coasesor | |
| Nombres y apellidos | Abraham Omar Espinoza Culupú |
| Tipo de documento de identidad | DNI |
| Número de documento de identidad | 42688779 |
| URL de ORCID | https://orcid.org/0000-0002-5553-6385 |
| Datos del jurado | |
| Presidente del jurado | |
| Nombres y apellidos | Elena Luzgarda Quillama Polo |
| Tipo de documento | DNI |
| Número de documento de identidad | 10143497 |
| Miembro del jurado 1 | |
| Nombres y apellidos | Mónica Rocío Huamán Iturrizaga |
| Tipo de documento | DNI |

| | |
|--|---|
| Número de documento de identidad | 08138468 |
| Miembro del jurado 2 | |
| Nombres y apellidos | Nora Yessenia Vera Obando |
| Tipo de documento | DNI |
| Número de documento de identidad | 41851323 |
| Datos de investigación | |
| Línea de investigación | A.1.2.2. Principios Bioactivos |
| Grupo de investigación | Investigación y Desarrollo de Procesos Biotecnológicos Agroindustriales y Ambientales |
| Agencia de financiamiento | Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. Programa de Promoción de Trabajo de Investigación para obtener el grado académico de Bachiller. Código: B20100240a |
| Ubicación geográfica de la investigación | Edificio: Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología (223) – Facultad de Ciencias Biológicas – Universidad Nacional Mayor de San Marcos País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Cercado de Lima Latitud: -12.059689388919 Longitud: -77.08211374385 |
| Año o rango de años en que se realizó la investigación | Octubre 2020 – Julio 2021 |
| URL de disciplinas OCDE | Biología celular, Microbiología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.01 Biotecnología relacionada con la Salud https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.04.01 |



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE BACHILLER EN MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA (MODALIDAD: SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN)

Siendo las 16:05 horas del 07 de febrero de 2022, en el Salón de Grados Virtual de la Facultad de Ciencias Biológicas cuya dirección electrónica fue <https://zoom.us/j/93184507588?pwd=MTFXVGpodDhLMnJPSXEzMzI3RDIWUT09> y en presencia del Jurado formado por los profesores que suscriben, se inició la sesión para optar al **Grado Académico de Bachiller en Microbiología y Parasitología (Modalidad: Trabajo de Investigación)** de ANA PAULA PALACIOS RODRIGUEZ.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° UNMSM-20210091831, la graduando expuso su Trabajo de Investigación: “**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGONISTA DE MICROORGANISMOS AMBIENTALES FRENTE A *Escherichia coli* ATCC 25922**”, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 18, calificativo: Aprobado con mención honrosa.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Grado Académico de Bachiller en Microbiología y Parasitología (Modalidad: Trabajo de Investigación)** a ANA PAULA PALACIOS RODRIGUEZ y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo grado, conforme a ley.

Siendo las 17:50 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 07 de febrero de 2022.

Mg. ELENA QUILLAMA POLO
(PRESIDENTA)

Dr. TITO SANCHEZ ROJAS
(ASESOR)

Mg. NORA VERA OBANDO
(MIEMBRO)

Blga. MONICA HUAMAN ITURRIZAGA
(MIEMBRO)

Este trabajo de investigación va dedicado a mi familia por sus buenos deseos durante toda mi etapa universitaria especialmente a mi madre y a mi abuela por ser mi motivación cada día, por su apoyo incondicional, por la confianza depositada en mí en cada uno de los pasos que he dado a lo largo de mi vida, por sus buenos consejos y por todo su amor.

Agradecimientos

A mi asesor Dr. Tito Libio Sánchez Rojas y co-asesor Dr. Abraham Omar Espinoza Culupú por su confianza, apoyo, enseñanzas y recomendaciones durante el desarrollo del trabajo de investigación.

A mis compañeros de laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología - Facultad de Ciencias Biológicas (UNMSM) Diego Macedo Prada y Jean-Paul Núñez Mejía por su ayuda y por los consejos brindados.

A mis compañeros de promoción Lucia Ramos, Diego Ocan y Valeria Goycochea por su amistad y su apoyo.

Agradezco a mi jurado revisor, Mg. Nora Vera, Blga. Mónica Huamán y Mg. Elena Quillama por brindarme su tiempo y sus revisiones; cada una de sus correcciones han enriquecido este trabajo.

También agradezco al Dr. Juan Jiménez, por darme la oportunidad de pertenecer por un tiempo a su laboratorio, por apoyarme en mi etapa universitaria y por todos sus consejos.

Finalmente, agradezco al Vicerrectorado de Investigación y Posgrado (VRIP) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por su contribución en el financiamiento del presente trabajo con el código B20100240a gracias al programa de “Promoción de trabajo de investigación para optar el grado de Bachiller”.

Contenido

| | |
|--|----|
| 1.INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1.Objetivos | 3 |
| 1.1.1.Objetivo general..... | 3 |
| 1.1.2.Objetivos específicos | 3 |
| 1.2.Hipótesis..... | 3 |
| 1.2.1.Hipótesis..... | 3 |
| 2.ESTADO DEL CONOCIMIENTO..... | 5 |
| 3.MATERIALES Y MÉTODOS | 8 |
| 3.1.Material biológico | 8 |
| 3.2 Metodología..... | 8 |
| 3.2.1 Reactivación y caracterización de los microorganismos | 8 |
| 3.2.1.1.Reactivación de las cepas de levaduras | 8 |
| 3.2.1.2.Reactivación de las bacterias | 8 |
| 3.2.1.2.1. Cepas de <i>Bacillus</i> | 8 |
| 3.2.1.2.2. Cepa de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | 9 |
| 3.2.2.Prueba de antagonismo en placa | 9 |
| 3.2.2.1.Preparación del inóculo de <i>E. coli</i> ATCC 25922..... | 9 |
| 3.2.2.2.Preparación del inóculo de levadura..... | 10 |
| 3.2.2.2.1. Construcción de la curva estándar | 10 |
| 3.2.2.3.Preparación del inóculo de <i>Bacillus</i> | 10 |
| 3.2.2.4.Método de inóculo en superficie (<i>spot technique</i>) para levaduras | 11 |
| 3.2.2.5.Método de difusión en pozos para <i>Bacillus</i> | 12 |
| 3.2.2.6.Determinación del porcentaje relativo de inhibición (PRI)..... | 12 |
| 3.2.3.Selección de microorganismos con mayor actividad de antagonismo. | 13 |

| | |
|---|----|
| 3.2.4.Evaluación de la influencia del tiempo de incubación en la actividad antagonista de las cepas seleccionadas. | 13 |
| 3.2.5.Cinética de crecimiento de las cepas antagonistas | 13 |
| 3.2.6.Análisis estadístico..... | 14 |
| 4.RESULTADOS | 15 |
| 4.1 Reactivación de las cepas..... | 15 |
| 4.1.1. Reactivación de las cepas de levaduras | 15 |
| 4.1.2. Reactivación de las cepas de <i>Bacillus</i> | 16 |
| 4.1.3. Reactivación de la cepa de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | 19 |
| 4.1.4. Prueba de antagonismo..... | 20 |
| 4.1.4.1. Prueba de antagonismo de levaduras por el método de inóculo en superficie (<i>spot technique</i>)..... | 20 |
| 4.1.4.2. Prueba de antagonismo en placa por método de difusión en pozos | 21 |
| 4.1.4.3. Selección de microorganismos con mayor actividad antagonista..... | 22 |
| 4.1.4.5. Influencia del tiempo en la actividad antagonista de las cepas seleccionadas | 24 |
| 4.1.5. Cinética de crecimiento de las cepas de <i>Bacillus</i> | 29 |
| 4.1.5.1. Cinética de crecimiento en medio TSB | 29 |
| 4.1.5.2. Tasa de crecimiento de las cepas de <i>Bacillus</i> | 31 |
| vii.DISCUSIÓN..... | 34 |
| viii.CONCLUSIONES..... | 38 |
| ix.RECOMENDACIONES..... | 39 |
| x.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 40 |
| XI. ANEXO | 45 |

Índice de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Ensayo de <i>screening</i> de antagonismo realizado en cepas de levaduras nativas contra <i>E. coli</i> ATCC 25922..... | 20 |
| Tabla 2. Ensayo de <i>screening</i> de antagonismo realizado en cepas de <i>Bacillus</i> contra <i>E. coli</i> ATCC 25922..... | 21 |
| Tabla 3. Actividad antagonista (zona de inhibición, índice de actividad y porcentaje relativo de inhibición) del cultivo bacteriano de las cepas de <i>Bacillus</i> a las 24 horas de incubación. | 23 |
| Tabla 4. Actividad antagonista (zona de inhibición, índice de actividad y porcentaje relativo de inhibición) del sobrenadante libre de células de las cepas de <i>Bacillus</i> a las 24 horas de incubación... .. | 23 |
| Tabla 5. Actividad antagonista (zona de inhibición, índice de actividad y porcentaje relativo de inhibición) del cultivo bacteriano de las cepas de <i>Bacillus</i> en medio TSB en diferentes tiempos de incubación (24, 48 y 72 horas)..... | 26 |
| Tabla 6. Actividad antimicrobiana (zona de inhibición, índice de actividad y porcentaje relativo de inhibición) del sobrenadante libre de células de las cepas de <i>Bacillus</i> en medio TSB en diferentes tiempos de incubación (24, 48 y 72 horas). | 27 |
| Tabla 7. Tasas de crecimiento de cepas de <i>Bacillus</i> en medio TSB | 31 |
| Tabla 8. Cepas de levaduras empleadas en la evaluación de la actividad antagonista contra <i>E. coli</i> ATCC 25922. | 45 |
| Tabla 9. Cepas de <i>Bacillus</i> empleadas en la evaluación de la actividad antagonista contra <i>E. coli</i> ATCC 25922. | 47 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Fig. 1. Coloración Gram de cepa SC | 15 |
| Fig. 2. Coloración Gram de cepa 2RYP11 | 15 |
| Fig. 3. Comportamiento cultural de la cepa TLJ8 en medio YPG | 16 |
| Fig. 4. Comportamiento cultural de la cepa 2RHP4 en medio YPG..... | 16 |
| Fig. 5. Comportamiento cultural de la cepa 2RHP5 en medio YPG..... | 16 |
| Fig. 6. Comportamiento cultural de la cepa BS3. | 17 |
| Fig. 7. Comportamiento cultural de la cepa BS21.. | 17 |
| Fig. 8. Comportamiento cultural de <i>Bacillus</i> en HiCrome Bacillus Agar..... | 18 |
| Fig. 9. Morfología microscópica y comportamiento cultural de <i>E. coli</i> ATCC 25922. | 19 |
| Fig 10. Actividad antagonista de las cepas de <i>Bacillus</i> frente a <i>E. coli</i> ATCC 25922..... | 48 |
| Fig 11. Actividad antagonista de las cepas BS3, BS4, BS17 y BS21 en diferentes tiempos de incubación..... | 28 |
| Fig 12. Cinética de crecimiento de la cepa BS3 a través del tiempo | 29 |
| Fig 13. Cinética de crecimiento de la cepa BS4 a través del tiempo | 30 |
| Fig 14. Cinética de crecimiento de la cepa BS17 a través del tiempo | 30 |
| Fig 15. Cinética de crecimiento de la cepa BS21 a través del tiempo | 31 |
| Fig 16. Tasa de crecimiento de la cepa BS3..... | 32 |
| Fig 17. Tasa de crecimiento de la cepa BS4..... | 32 |
| Fig 18. Tasa de crecimiento de la cepa BS17..... | 33 |
| Fig 19. Tasa de crecimiento de la cepa BS21..... | 33 |
| Fig 20. Actividad antagonista del cultivo bacteriano y sobrenadante de las cepas de <i>Bacillus</i> contra <i>E. coli</i> ATCC 25922..... | 24 |
| Fig 21. Actividad antagonista del cultivo bacteriano de las cepas de <i>Bacillus</i> contra <i>E. coli</i> ATCC 25922 a las 24, 48 y 72 horas de incubación..... | 48 |
| Fig 22. Actividad antagonista del sobrenadante libre de células de las cepas de <i>Bacillus</i> contra <i>E. coli</i> ATCC 25922 a las 24, 48 y 72 horas de incubación. | 48 |

Resumen

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son causantes de problemas en salud pública, de la población peruana y otros países. Los patotipos de *Escherichia coli* pertenecen a los grupos de patógenos causantes de estas infecciones. En el tratamiento contra estos agentes infecciosos se utilizan antibióticos; sin embargo, debido al incremento de la resistencia bacteriana, estos se han vuelto ineficaces. En la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento, el presente trabajo tiene como objetivo determinar la actividad antagonista de microorganismos ambientales contra *Escherichia coli* ATCC 25922. Para este estudio, la actividad antimicrobiana de 33 cepas de *Bacillus* y 32 cepas de levaduras fueron evaluadas mediante el método de difusión en pozos y el método de inóculo en superficie (*spot technique*), respectivamente. Las levaduras no mostraron actividad antagonista mientras que las cepas de *Bacillus* BS3, BS4, BS17 y BS21 presentaron dicha actividad. La cepa BS4 mostró un mayor tamaño en el diámetro de los halos de inhibición con valores de 27.00 ± 2.65 mm y 15.67 ± 1.15 cuando se utilizó el cultivo bacteriano (CB) y el sobrenadante libre de células (SLC), respectivamente. Además, la actividad antagonista se mantuvo constante a las 24, 48 y 72 horas de incubación. Según los resultados obtenidos, se concluye que el uso del cultivo bacteriano evidenció mayor actividad antagonista en comparación al sobrenadante libre de células. Los resultados sugieren que los metabolitos secretados por estas cepas de *Bacillus* tendrían potencial antimicrobiano contra *Escherichia coli* ATCC 25922.

Palabras claves: resistencia bacteriana, metabolitos antimicrobianos, *Bacillus*, actividad antagonista

Abstract

Foodborne diseases are the cause of public health problems in Peru and other countries. *Escherichia coli* pathotypes are within the group of pathogens that cause these infections. Antibiotics are used in the treatment against these infectious agents; however, due to increased bacterial resistance, these have become ineffective. In the search for new treatment alternatives, the present work aims to determine the antagonist activity of environmental microorganisms against *Escherichia coli* ATCC 25922. For this study, the antimicrobial activity of 33 *Bacillus* strains and 32 yeast strains was evaluated using the method of well diffusion and the Spot technique, respectively. The yeasts did not show antagonistic activity while *Bacillus* strains BS3, BS4, BS17 and BS21 showed this activity. The BS4 strain showed a larger size in the diameter of the inhibition zones with values of 27.00 ± 2.65 mm and 15.67 ± 1.15 when the bacterial culture (BC) and the cell-free supernatant (CFS), respectively, with significant differences. The antagonist activity remained constant at 24, 48 and 72 hours of incubation. According to the results obtained, it is concluded that the use of bacterial culture showed greater antagonistic activity than the cell-free supernatant. The results suggest that the metabolites secreted by these strains would have antimicrobial potential against *Escherichia coli* ATCC 25922.

Keywords: bacterial resistance, antimicrobial metabolites, *Bacillus*, antagonistic activity

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son un problema en salud que causan importantes pérdidas económicas. Según los reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), entre un 70 y 80% de los casos reportados de enfermedades gastrointestinales se producen debido a la ingesta de alimentos y aguas contaminadas con microorganismos patógenos que afectan la salud de quienes los consumen, resultando más afectados los niños menores de cinco años (Boschi-Pinto *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2017); en consecuencia, unas 600 millones de personas se enferman, mientras que 420 000, fallecen por esta misma causa (Olea *et al.*, 2012).

Estas infecciones se caracterizan por una variedad de síntomas gastrointestinales que abarcan desde náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal y fiebre (Rosas & Acosta, 2001) hasta presentar complicaciones severas como sepsis, meningitis, abortos, síndrome de Guillain-Barré o la muerte (Linscott, 2011).

Las ETA pueden ser producidas por diversos agentes patógenos como bacterias, virus, helmintos y protozoarios, según la OMS (2010). Dentro del grupo de bacterias se encuentran *Salmonella*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae* y los diferentes patotipos de *Escherichia coli* diarreogénicas (Boschi-Pinto *et al.*, 2008).

Estas infecciones representan un problema de salud creciente en todo el mundo provocando la disminución en la productividad de los países, familias e individuos, a consecuencia de su magnitud, morbilidad, mortalidad, impacto social y económico (Borgoño, 2019).

Bacterias patógenas como *Escherichia coli* diarrogénica (DEC) provocan diarrea en países en vía de desarrollo como el Perú; sin embargo, no siempre pueden ser detectadas en los laboratorios clínicos. En el año 2001, se reportó *E. coli* en muestras diarreicas de niños, en donde se obtuvo una mayor prevalencia de *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* enteropatógena (EPEC) con 9.9% y 8.5%, respectivamente. El patotipo más frecuente en diarreas graves fue *E.coli* enterotoxigénica (ETEC) mientras que en diarreas más leves se encontró EPEC (Ochoa *et al.*, 2011).

El tratamiento convencional de estas enfermedades diarreicas se basa en el uso de antibióticos. No obstante, el problema surge cuando se realiza un uso inapropiado o excesivo de los antimicrobianos, provocando que las bacterias desarrollen diversos mecanismos que les permiten hacerse inmunes a los tratamientos, los cuales pierden su eficacia; fenómeno que se denomina resistencia bacteriana. Este problema se ha incrementado a lo largo del tiempo, aumentando el costo de la atención médica con estadías más prolongadas en los hospitales y en casos severos, causando la muerte de millones de personas en el mundo. En el Perú, se ha reportado que el 35.3% de las bacteremias fueron debido a *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de amplio espectro (BLEE), es decir, bacterias resistentes a los antibióticos betalactámicos. En el análisis que realizaron sobre la mortalidad, se informó que este grupo de bacterias alcanzó un 63.3% (Adrianzén *et al.*, 2013).

Debido a este grave problema de la resistencia bacteriana, sería de gran ayuda que se pudieran utilizar terapias alternativas, como por ejemplo, el uso de extractos microbianos, aceites esenciales, plantas y metabolitos secundarios como agentes antimicrobianos potenciales (Nazzaro *et al.*, 2013). Por lo que, en el presente trabajo, se investigó dos grupos de microorganismos ambientales, productores de metabolitos antagonistas.

Por un lado, levaduras como potenciales fuentes de metabolitos antagonistas, contra bacterias productoras de ETA. Entre las principales sustancias que estas producen se encuentran los ácidos orgánicos, factores antibióticos, ácidos volátiles, peróxido de hidrógeno, entre otras (Hatoum *et al.*, 2012).

Por otro lado, el género *Bacillus* se destaca por producir una gran cantidad de metabolitos importantes, entre ellos destacan los péptidos ribosomales y no ribosomales con actividad antimicrobiana (Tamehiro *et al.*, 2002). Algunas cepas de *Bacillus* sintetizan bacteriocinas, efectivas contra bacterias de la misma especie mientras que otras producen antibióticos de amplio y reducido espectro contra bacterias gram negativas y gram positivas (Stein, 2005).

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo general

Determinar la actividad antagonista *in vitro* de microorganismos ambientales, aislados de relaves mineros altoandinos y suelos agrícolas de Junín, frente a *Escherichia coli* ATCC 25922.

1.1.2. Objetivos específicos

- Caracterizar morfo-culturalmente a los microorganismos empleados en el estudio.
- Evaluar la actividad antagonista *in vitro* de microorganismos ambientales frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 mediante el método de inóculo en superficie (*spot technique*) para levaduras y método de difusión en pozos para *Bacillus*.
- Seleccionar las cepas de microorganismos con mayor actividad antagonista frente a *E. coli* ATCC 25922.
- Evaluar la influencia del tiempo de incubación en la actividad antagonista de los microorganismos seleccionados frente a *E. coli* ATCC 25922.
- Determinar las fases de la cinética de crecimiento de los microorganismos seleccionados.

1.2. Hipótesis

1.2.1. Hipótesis

Ha: Los microorganismos ambientales evaluados presentan actividad antagonista frente a *Escherichia coli* ATCC 25922.

Ho: Los microorganismos ambientales evaluados no presentan actividad antagonista frente a *Escherichia coli* ATCC 25922.

1.2.2. Variables

Independientes: cepas de microorganismos ambientales, *Escherichia coli* ATCC 25922.

Dependientes: actividad antagonista de microorganismos ambientales frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, tiempo de incubación.

2. ESTADO DEL CONOCIMIENTO

Las levaduras constituyen un grupo grande y heterogéneo de microorganismos que, en la actualidad, atraen cada vez más la atención de los científicos y la industria. Además de su significativa contribución al desarrollo de características organolépticas favorables en los alimentos fermentados, destaca su actividad antagonista hacia las bacterias contaminantes y los mohos (Hatoum *et al.*, 2012).

El papel antagonista de las levaduras frente a otros microorganismos se ha atribuido a diferentes mecanismos como: la competencia por nutrientes, producción de ácidos orgánicos o volátiles, producción de altas concentraciones de etanol, secreción de compuestos antibacterianos y liberación de toxinas (Suzuki *et al.*, 2001; Rima *et al.*, 2012). Las toxinas son péptidos extracelulares o glicoproteínas dirigidas principalmente contra levaduras filogenéticamente relacionadas, con la cepa productora (Golubev, 2006). Aunque, en la actualidad, aún sigue en investigación si las toxinas solo van dirigidas a otras levaduras o también tienen efecto contra bacterias patógenas (Acuña-Fontecilla *et al.*, 2017). Estas toxinas son producidas por una variedad de levaduras de distintos géneros tales como *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Williopsis*, y *Zygosaccharomyces*.

Existen una variedad de estudios realizados por diferentes investigadores que permiten enfatizar el reciente uso de las levaduras como potenciales antagonistas *in vitro* contra bacterias patógenas productoras de ETA. El primer indicio de la actividad antagonista de las levaduras se publicó a principios del siglo XX por Hayduck (1909), quien reportó un extracto tóxico volátil termolábil de levadura con efecto antagonista. Estudios posteriores *in vitro* e *in vivo* han indicado que la levadura *Saccharomyces boulardii* puede prevenir las infecciones intestinales causadas por *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Yersinia enterocolitica* y *Candida albicans*, demostrando ser una buena candidata en la producción de antimicrobianos (Czerucka & Rampal, 2002).

Además, la investigación de Younis *et al.* (2017) reportó que algunas cepas de levaduras de productos lácteos tales como *Candida krusei*, *C. kefyr*, *C. tropicalis*, *C. intermedia*, *S. cerevisiae*, *C. intermedia*, *C. lusitaniae* y *C. tropicalis*, mostraron actividades antimicrobianas variables contra *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*. Dentro de las levaduras

que más destacan está *C. intermedia*, que mostró una alta actividad antimicrobiana contra *E. coli* (20 mm) y *S. aureus* (24 mm) y, una baja actividad antimicrobiana contra *P. aeruginosa* (6 mm).

En los últimos años, además de los mecanismos típicos involucrados en el papel antagonista de las levaduras, Ng *et al.* (2020) mencionaron que los compuestos fenólicos tales como fenilacetaldehído, ácido homogentísico y ácido fluorético de *Saccharomyces cerevisiae* cepa N2 exhibieron actividad antimicrobiana de amplio espectro contra patógenos alimentarios comunes como *E. coli* y *S. aureus*.

Todos los estudios mencionados anteriormente demuestran el potencial rol que tienen las levaduras como antagonistas de bacterias enteropatógenas, ya que no solo se reduce a la producción de ácidos orgánicos sino a la producción de distintos metabolitos participantes.

Por otro lado, el otro grupo que destaca en la producción de sustancias antimicrobianas son las bacterias, en particular el género *Bacillus*. Los miembros de este género son capaces de producir endosporas que son resistentes a condiciones ambientales desfavorables. Entre las especies más representativas de este género se encuentran *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* y *B. pumilus* (Sansinenea & Ortiz, 2011).

Bacillus secreta muchos metabolitos secundarios que incluyen antibióticos, antifúngicos y sideróforos. Esta bacteria es capaz de producir más de 200 antibióticos, los cuales difieren en su estructura y en su espectro de actividad (Moore, 2013; Sansinenea & Ortiz, 2011). El potencial de *Bacillus* se ha reconocido desde hace 50 años atrás, con la participación de péptidos con actividad antagónica que poseen diferentes pesos moleculares, propiedades bioquímicas y mecanismos de acción (Sansinenea & Ortiz, 2011; Tamehiro *et al.*, 2002).

Los péptidos antimicrobianos (AMPs) producidos por *Bacillus* representan un sistema de defensa contra bacterias patógenas que invaden los organismos y son efectivos cuando se usan como terapia contra bacterias resistentes a los antibióticos. Los AMPs se pueden dividir en péptidos ribosomales y no ribosomales. Los péptidos no ribosomales representan una gran familia de metabolitos bioactivos secundarios. Entre los péptidos más resaltantes por su actividad como antibióticos se encuentran la iturina, gramicidina, bacitracina, polimixinas, lipopéptido surfactina, subtilosina y subtilina (Chalasanani *et al.*, 2015; Hagelin *et al.*, 2004).

Por ejemplo, entre los antibióticos producidos por *B. subtilis* se encuentra 'bacilysocina 2' que es un fosfolípido antimicrobiano que puede ser extraído de esta bacteria utilizando

butanol (Tamehiro *et al.*, 2002). En cuanto a los lipopéptidos biosurfactantes, estos exhiben varias actividades biológicas incluyendo actividad superficial, así como actividades anti-enzimáticas. Los biosurfactantes producidos por *Bacillus* y *Pseudomonas* han generado gran interés gracias a su potencial para la industria agrícola, química, alimentaria y farmacéutica (Roongsawang *et al.*, 2011). Además, el lipopéptido 'surfactina 5' es un poderoso biosurfactante, el cual tiene una acción tipo detergente en las membranas biológicas y destaca por su poder de emulsionante, espumante, antiviral y antimicoplasma (Carrillo *et al.*, 2003).

Por otro lado, los péptidos ribosomales se encuentran distribuidos en la naturaleza y contienen entre 12 a 50 residuos de aminoácidos. Las bacteriocinas son AMPs sintetizados ribosomalmente por *Bacillus* y en su mayoría, tienen gran efecto contra cepas cercanas a la productora (Sumi *et al.*, 2015). En este grupo de AMPs se encuentra la subtilina producida *B. subtilis*, coagulina de *B. coagulans*, bacticina F4 de *B. thuringiensis*, turicina 17, entomocina 9 y cerecina de *B. cereus*, entre otras bacteriocinas (Aunpad & Na-Bangchang, 2007; Hammami *et al.*, 2012).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material biológico

Se empleó una cepa de referencia *Escherichia coli* ATCC 25922, veintinueve cepas de levaduras nativas aisladas de aguas contaminadas con relaves mineros de la Sierra Central del Perú (Región Junín y Pasco), tres cepas de levaduras aisladas de suelo fértil de cultivos de cacao *Theobroma cacao* L. de la provincia de Pichanaqui (Junín) y, treinta y tres cepas de *Bacillus* de la colección del Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas (FCB) – Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM).

3.2. Metodología

3.2.1 Reactivación y caracterización de los microorganismos

3.2.1.1. Reactivación de las cepas de levaduras

Treinta y dos cepas de levaduras se reactivaron en tubos de 16x150 mm que contenían 5 mL de caldo Yeast Peptone Glucose (YPG, por sus siglas en inglés) [extracto de levadura 5 g/L, peptona 10g/L y glucosa 30g/L] a pH 5, incubados por 48 a 72 horas a 28 °C y a una agitación de 100 rpm. Una vez observado el crecimiento por turbidez, se realizó tinción de Gram para verificar la pureza y posteriormente, el cultivo se sembró por agotamiento en placas con agar YPG (Extracto de levadura 5 g/L, peptona 10 g/L, glucosa 30g/L y agar 18 g/L) a pH 5, para observar la morfología y aislar colonias para los posteriores ensayos.

3.2.1.2. Reactivación de las bacterias

3.2.1.2.1. Cepas de *Bacillus*

Treinta y tres cepas de *Bacillus* se reactivaron en tubos de 16x150 mm con medio Tryptic Soy Broth (TSB, por sus siglas en inglés) a pH 7.2 durante 24 horas a 28 °C. Se realizó una tinción de Gram para corroborar la pureza del inóculo, posteriormente se tomó una asada

de caldo y se sembró por agotamiento en medio Tryptic Soy Agar (TSA, por sus siglas en inglés) a pH 7 durante 24 horas a 28 °C, con la finalidad de obtener colonias aisladas.

Las cepas de *Bacillus* que presentaron actividad antagonista, se sembraron en el medio Agar HiCrome Bacillus (peptona 10g/L, extracto de HM [equivalente al extracto de carne] 1g/L, D-manitol 10 g/L, cloruro de sodio 10g/L, mezcla cromogénica 3.2g/L, rojo de fenol 0.025 g/L y 15 g/L de agar), con el fin de identificar la especie. Las placas se incubaron durante 24 – 48 horas a 28°C, posteriormente se evaluó el aspecto de las colonias que crecieron y se compararon con el manual del medio de cultivo (Agar HiCrome Bacillus).

3.2.1.2.2. Cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922

La bacteria se reactivó en un tubo de 16x150 mm conteniendo medio TSB durante 24 horas a 37±0.5°C. Se realizó una tinción de Gram para corroborar la pureza del inóculo; posteriormente, se tomó una asada del caldo y se sembró por agotamiento en agar MacConkey para la obtención de colonias aisladas. Para los ensayos de antagonismo, esta bacteria se sembró en Agar Mueller Hinton.

3.2.2. Prueba de antagonismo en placa

La determinación de la actividad antagonista de las levaduras frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 se realizó mediante el método modificado ‘*Spot technique*’ según Lopes y Sangorrín (2010).

Para las cepas de *Bacillus*, la actividad antagonista se determinó mediante el método de difusión en pozos según Floriano *et al.* (1998) con algunas modificaciones. En este caso, se probó la actividad antagonista tanto del cultivo bacteriano (CB) como del sobrenadante libre de células (SLC).

3.2.2.1. Preparación del inóculo de *E. coli* ATCC 25922

Se seleccionaron 3 a 5 colonias de *E. coli* ATCC 25922 provenientes de una placa de 18 a 24 horas de incubación con agar Mueller Hinton y, se colocaron en tubos de 16x150 mm

con 5 mL de solución salina. La turbidez de la suspensión bacteriana se ajustó a la medida estándar de 0,5 de la escala de Mc Farland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL) según el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, 2019).

3.2.2.2. Preparación del inóculo de levadura

Se obtuvieron cultivos de levadura de la fase de estacionaria (48-72h) en tubos de 16x150 mm con 8 mL de medio YPG a pH 5. La turbidez de las suspensiones de los cultivos de levaduras indicó una concentración entre 10^7 - 10^8 UFC/mL.

Para estandarizar la concentración celular de las cepas de levaduras como medida de la biomasa, se construyó una curva estándar con densidad óptica en función de la concentración celular.

3.2.2.2.1. Construcción de la curva estándar

Se reactivaron las cepas de levaduras en un tubo con 8 mL de caldo YPG a pH 5 y se incubaron a 28°C y 120 rpm de agitación durante 30 horas. Pasado el tiempo correspondiente, el inóculo se escaló a un volumen de 72 mL de caldo YPG pH 5 contenido en un matraz de 250 mL y se incubó durante 30-48 horas. El volumen del inóculo se centrifugó a 5000 rpm durante 20 minutos, este proceso se repitió 3 veces y se realizaron lavados sucesivos con solución salina al 0.9%. Posteriormente, se realizaron diluciones de la biomasa obtenida (1/2, 1/4, 1/8 y 1/16) y se procedió a contar las células en una cámara de Neubauer para obtener la concentración celular.

A cada una de estas diluciones mencionadas (1/2, 1/4, 1/8 y 1/16), se le realizaron diluciones seriadas (hasta 10^{-5} o 10^{-6}) y las últimas dos diluciones se sembraron en placas con agar YPG pH 5 para el recuento de colonias. Finalmente, se midió la densidad óptica (DO) de cada una de las diluciones en el espectrofotómetro a 600nm. Todos estos datos (conteo en cámara de Neubauer, recuento en placa y lectura de la DO) se utilizaron para armar la curva de calibración de la biomasa.

3.2.2.3. Preparación del inóculo de *Bacillus*

Se obtuvieron cultivos de las cepas de *Bacillus* de la fase estacionaria (24 horas) en tubos de 16x150 mm conteniendo 8 mL de medio TSB a pH 7. La turbidez de las suspensiones

de los cultivos de *Bacillus* indicó una concentración de 10^7 - 10^8 UFC/mL. Posteriormente, parte del volumen de cultivo obtenido, se centrifugó a 5000 rpm durante 20 minutos y el sobrenadante resultante se filtró con filtros Millipore de 0.22 μ m. Dicho procedimiento se realizó ya que, en el ensayo de antagonismo, se probó tanto cultivo bacteriano (CB) como sobrenadante libre de células (SLC).

Para estandarizar la concentración celular de las cepas de *Bacillus*, se construyó una curva estándar con densidad óptica en función de la concentración celular con el mismo procedimiento que en el caso de las levaduras. Las variaciones que se realizaron fue el empleo de otro medio de cultivo y el tiempo de incubación. En este caso, se utilizó caldo TSB para el crecimiento de la bacteria y agar TSA para el recuento en placa. Finalmente, las placas se incubaron durante 24 horas a 28°C.

3.2.2.4. Método de inóculo en superficie (*spot technique*) para levaduras

Mediante el método modificado '*Spot technique*' de Lopes & Sangorrín (2010), se buscó determinar la actividad antagonista de las levaduras frente a *E. coli* ATCC 25922.

Para este ensayo, se diseminaron 100 microlitros de *E. coli* ATCC 25922 con un hisopo estéril en placas que contenían el medio sólido YGSA (extracto de levadura 5g/L, glucosa 20g/L, triptona 10g/L, NaCl 10g/L y agar 15g/L) a pH 5. La modificación que se realizó en el medio consistió en no agregar el colorante azul de metileno al 0.003%. Cabe resaltar, que el medio YGSA fue utilizado en este trabajo, debido a que en el estudio de Acuña-Fontecilla *et al.* (2017), se comprobó que este medio permitía el crecimiento de ambos tipos de microorganismos.

Luego de que se diseminó la bacteria testigo (*E. coli*), se esperó aproximadamente 15 minutos para que el cultivo se absorba en la superficie del agar. Finalmente, se inoculó 10 μ L de las suspensiones de cultivo de las levaduras en la superficie del agar, realizándose un total de 5 suspensiones de levaduras equidistantes en la placa. Las placas se incubaron a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 72 horas. El control negativo fue el caldo de cultivo y el control positivo el antibiótico ciprofloxacino 5ug.

3.2.2.5. Método de difusión en pozos para *Bacillus*.

Mediante el método de difusión en pozos según Floriano *et al.*, 1998, se determinó la actividad antagonista de *Bacillus* frente a *E. coli* ATCC 25922.

Para este ensayo, se sembraron 100 microlitros de *E. coli* ATCC 25922 por diseminación con un hisopo estéril en placas que contenían el medio sólido YGSA (extracto de levadura 5g/L, glucosa 20g/L, triptona 10g/L, NaCl 10g/L y agar 15g/L) a pH 5. Se esperó aproximadamente 15 minutos para que el cultivo se absorba en la superficie.

Posteriormente, se realizaron 5 pocillos de 6 mm de diámetro equidistantes en el medio de cultivo con un sacabocado estéril. En cada pozo, se depositaron 75uL tanto del cultivo proveniente de la fase estacionaria (24 horas) como del sobrenadante libre de células de cada cepa de *Bacillus*. Las placas se incubaron a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. El control negativo fue el caldo de cultivo y el control positivo fue el disco del antibiótico ciprofloxacino 5ug.

La actividad antagonista se evaluó midiendo el diámetro de la zona de inhibición (en mm) y se interpretó en comparación con el control negativo. Además, se calculó el índice de actividad de cada cepa usando la fórmula de Singariya *et al.*, (2011):

$$\text{Índice de actividad} = \frac{\text{Zona de inhibición de la cepa (mm)}}{\text{Zona de inhibición del antibiótico(mm)}}$$

3.2.2.6. Determinación del porcentaje relativo de inhibición (PRI)

El porcentaje relativo de inhibición de las cepas con respecto al control positivo fue calculado usando la siguiente fórmula de Dharajiya *et al.* (2014):

$$PRI = \frac{100 (X - Y)}{(Z - Y)}$$

Donde, X: Área total de inhibición producido por cada cepa; Y: Área del control negativo y Z: Área total de inhibición producido por el antibiótico.

El área total de inhibición fue calculada de la siguiente manera: $\text{área} = \pi r^2$, donde r: radio de la zona de inhibición.

3.2.3. Selección de microorganismos con mayor actividad de antagonismo.

Se seleccionaron las cepas que mostraron actividad antagonista según la medida del halo de inhibición, su índice de actividad y su porcentaje relativo de inhibición, con el fin de que se realicen estudios posteriores.

3.2.4. Evaluación de la influencia del tiempo de incubación en la actividad antagonista de las cepas seleccionadas.

Se evaluó la influencia del tiempo de incubación en la producción de metabolitos secundarios con potencial antimicrobiano por parte de las cepas seleccionadas. Para lo cual, el cultivo de las cepas se realizó en matraces de 250 mL conteniendo 100mL de caldo TSB a pH 7. Se tomó una alícuota del cultivo a las 24, 48 y 72 horas de incubación para realizar la prueba de antagonismo utilizando tanto el cultivo bacteriano como el sobrenadante libre de células. Los ensayos se realizaron por triplicado con la metodología propuesta.

3.2.5. Cinética de crecimiento de las cepas antagonistas

Se realizaron cinéticas de crecimiento de las cepas con actividad antagonista posteriormente a los ensayos realizados.

3.2.5.1. Siembra del inóculo

Para realizar el cultivo del inóculo, se empleó la metodología propuesta por Granger et al., 1992; que consiste en escalamiento seriados del inóculo del 10% hasta finalmente llegar al volumen deseado. Se tomó una asada de los ceparios de *Bacillus* y se sembró

en 10 mL de caldo TSB. Estos volúmenes se utilizaron como inóculo inicial correspondiente al 10% para un total de 100 mL de caldo. Estos se incubaron a 28 °C y 120 rpm de agitación durante 24 horas.

3.2.5.2. Escalamiento y evaluación de la cinética

Previa tinción de Gram para comprobar la pureza del inóculo, se trasvasó el volumen de cada cepa en un matraz de 250 mL conteniendo 90 mL del caldo de cultivo TSB. Después de cada 4 horas, se colectó 1 mL de cada matraz en un tubo eppendorf de 2 mL, este procedimiento se realizó por triplicado.

Finalmente, pasadas las 48 horas de crecimiento, cada muestra tomada se centrifugó a 12 000 rpm por 15 minutos, se descartó el sobrenadante y la biomasa obtenida se lavó y se resuspendió con solución salina 0.9%. El crecimiento bacteriano se midió en un espectrofotómetro a 600 nm. Las gráficas de las cinéticas de crecimientos se tabularon en UFC/mL y tiempo (horas).

3.2.6. Análisis estadístico

Todos los resultados fueron analizados mediante la prueba de ANOVA de dos vías y la diferencia entre los grupos se determinó mediante la prueba de Tukey o comparaciones múltiples con test de Dunnett analizadas por el programa GraphPad Prism 9 (Graph Pad, San Diego, California). Los datos se consideran estadísticamente significativos con un $p < 0.05$, y los resultados se representaron con la media y la desviación estándar de la media (\pm DE) de las tres repeticiones realizadas por cada ensayo.

4. RESULTADOS

4.1 Reactivación de las cepas

4.1.1. Reactivación de las cepas de levaduras

Se reactivaron un total de 32 levaduras que poseían diferente comportamiento cultural. Se diferenciaron según su morfología, la cual fue evidenciada mediante coloración Gram y su comportamiento cultural en placa.

Según la morfología celular, se observaron células ovaladas, grandes y gram positivas (Fig. 1) y células gram positivas, ovaladas y pequeñas (Fig. 2) en un microscopio óptico a 1000x de aumento.

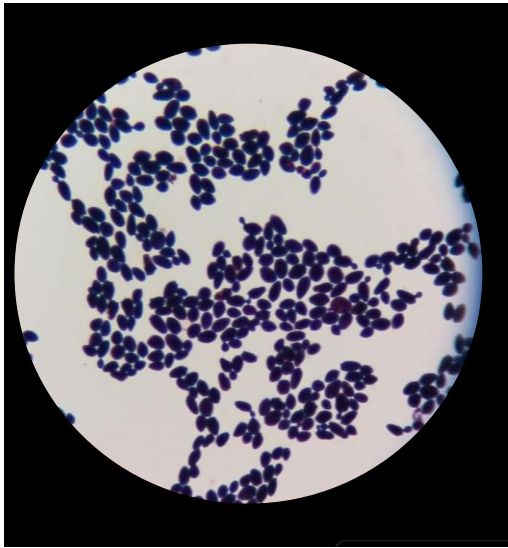


Fig. 1. Coloración Gram de cepa SC: Observación de células Gram positivas, ovaladas y grandes (1000x).

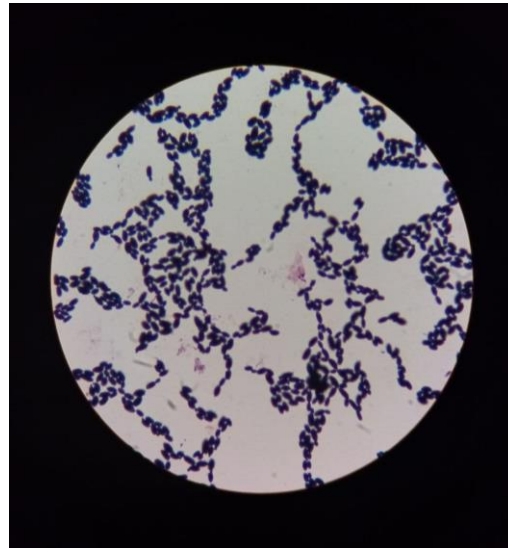


Fig. 2. Coloración Gram de cepa 2RYP11: Observación de células Gram positivas, ovaladas y pequeñas (1000x).

En cuanto al comportamiento cultural, se observaron colonias con diversas morfologías y pigmentaciones. Se observaron colonias circulares, de borde entero, rugosas, opacas y de consistencia blanda (Fig. 3), colonias secas, de borde regular y superficie rugosa (Fig. 4) y colonias rosáceas, cremosas, de borde regular y superficie lisa (Fig. 5).



Fig. 3. Comportamiento cultural de la cepa TLJ8 en medio YPG: Colonias circulares, de borde entero, rugosas, secas y opacas.



Fig. 4. Comportamiento cultural de la cepa 2RHP4 en medio YPG: colonias secas, de borde regular y superficie rugosa.

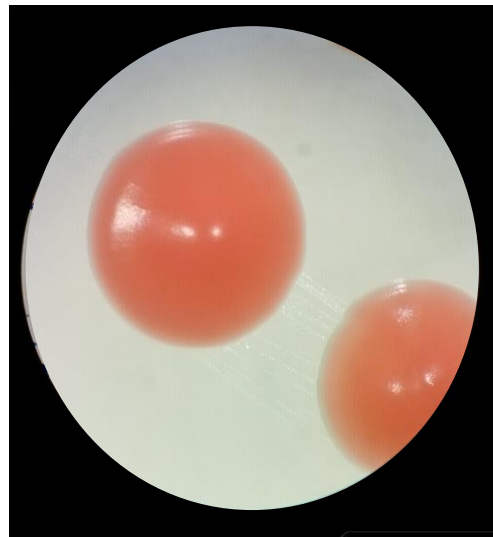


Fig. 5. Comportamiento cultural de la cepa 2RHP5 en medio YPG: colonias rosáceas, cremosas, de borde regular y superficie lisa.

4.1.2. Reactivación de las cepas de *Bacillus*

Las colonias de las cepas de *Bacillus* BS3 y BS21 presentaron las siguientes características en agar TSA: Presencia de colonias variables, tamaño y forma irregular, borde ondulado, superficie lisa, de aspecto butiroso, elevadas y de consistencia mucoide. Además, en la

coloración de Gram se observaron bacilos cortos y gram positivos en un microscopio óptico a 1000x de aumento (Figs. 6-7).

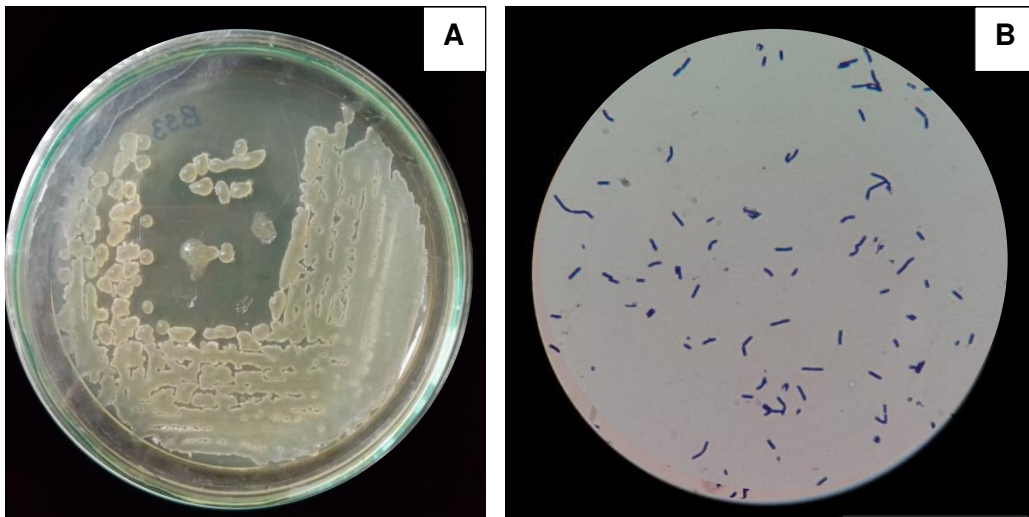


Fig. 6. Comportamiento cultural de la cepa BS3. (A) Colonias irregulares, lisas, elevadas, butirosas y de consistencia mucoide en agar TSA. (B) Coloración Gram de BS3: bacilos Gram positivos, cortos y de borde regular (24 horas).

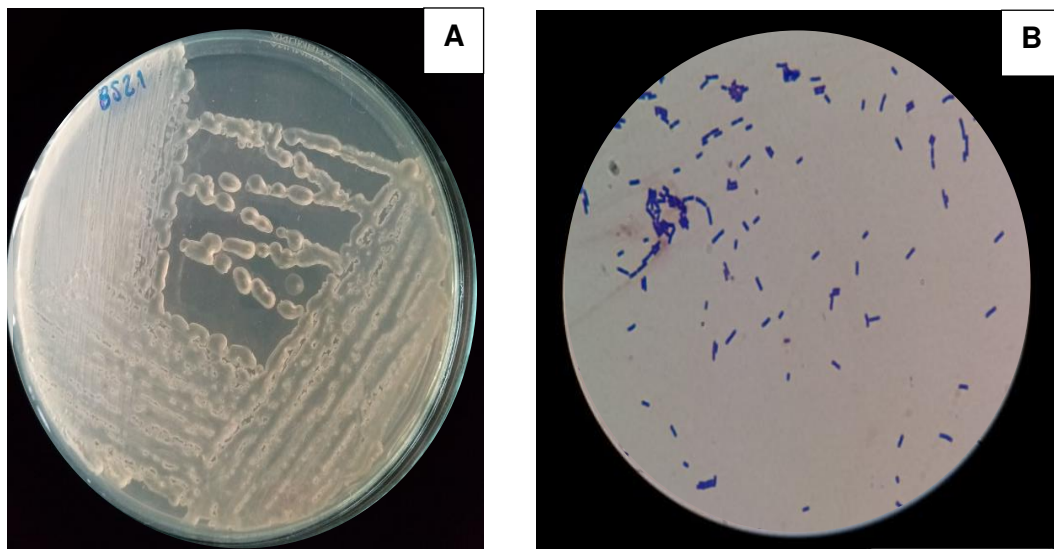


Fig. 7. Comportamiento cultural de la cepa BS21. (A) Colonias irregulares, lisas, elevadas, butirosas y de consistencia mucoide en agar TSA. (B) Coloración Gram de BS21: bacilos Gram positivos, cortos y de borde regular (24 horas).

Además, se utilizó HiCrome Bacillus Agar (agar cromogénico) para identificar la especie de *Bacillus* con la cual se trabajó; sin embargo, según el manual de dicho medio, ninguna de las posibles especies coincidía con el crecimiento de las cepas BS3, BS4, BS17 y BS21. En el caso de estas cepas, las colonias presentaron las siguientes características en *HiCrome Bacillus Agar*: colonias transparentes, de borde irregular, consistencia butirosa o mucosida y con crecimiento en la periferia. La lectura de las placas se realizó a las 30 – 48 horas (Fig. 8).

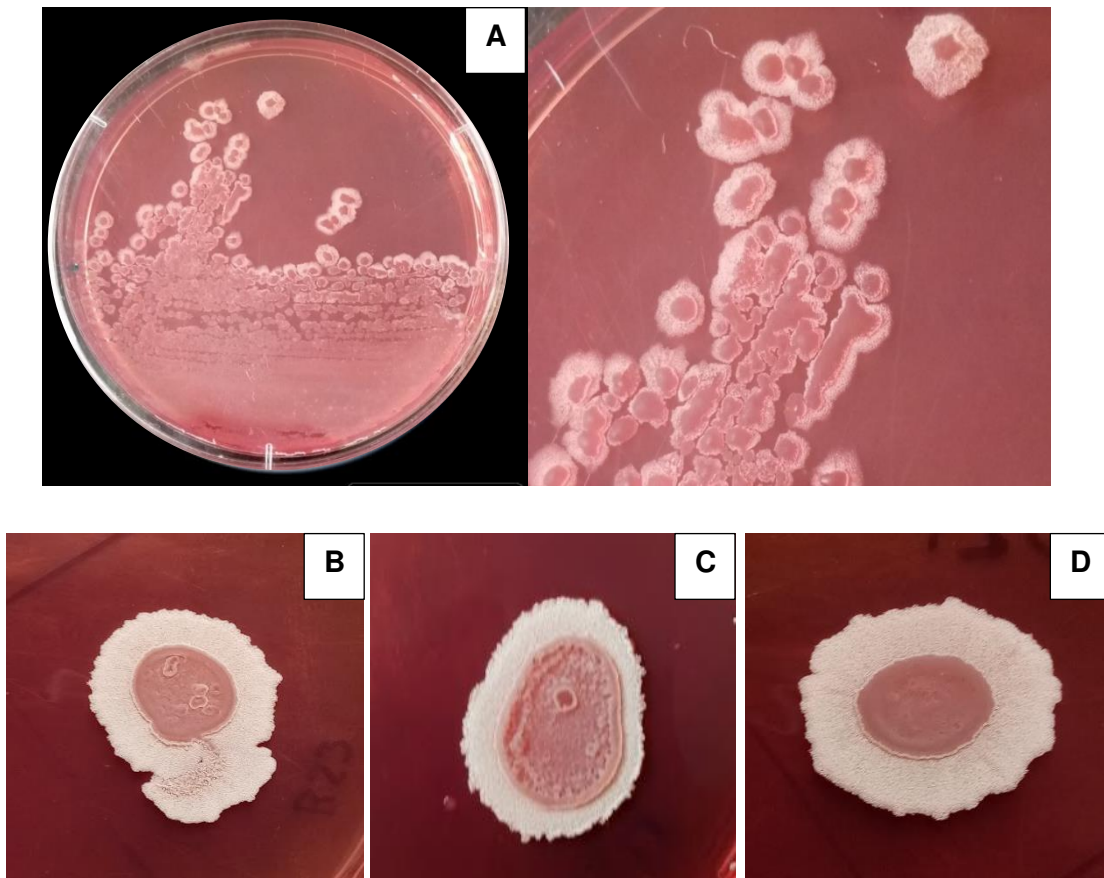


Fig. 8. Comportamiento cultural de *Bacillus* en HiCrome Bacillus Agar (Agar cromogénico): (A) BS4 (B) BS3, (C) BS17 y (D) BS21: Colonias transparentes, de borde irregular y con crecimiento en la periferia.

4.1.3. Reactivación de la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922

Se sembró la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 en caldo TSB y posteriormente, se realizó una tinción de Gram, donde se observaron bacilos cortos gram negativos (Fig. 9A). Posteriormente, esta bacteria se sembró en agar TSA, donde se observaron colonias de borde entero, cremas y planas (Fig. 9B) y, en agar MacConkey, donde se observaron colonias rosadas, de borde entero que presentaban halo de precipitación alrededor de las colonias (Fig. 9C-D).

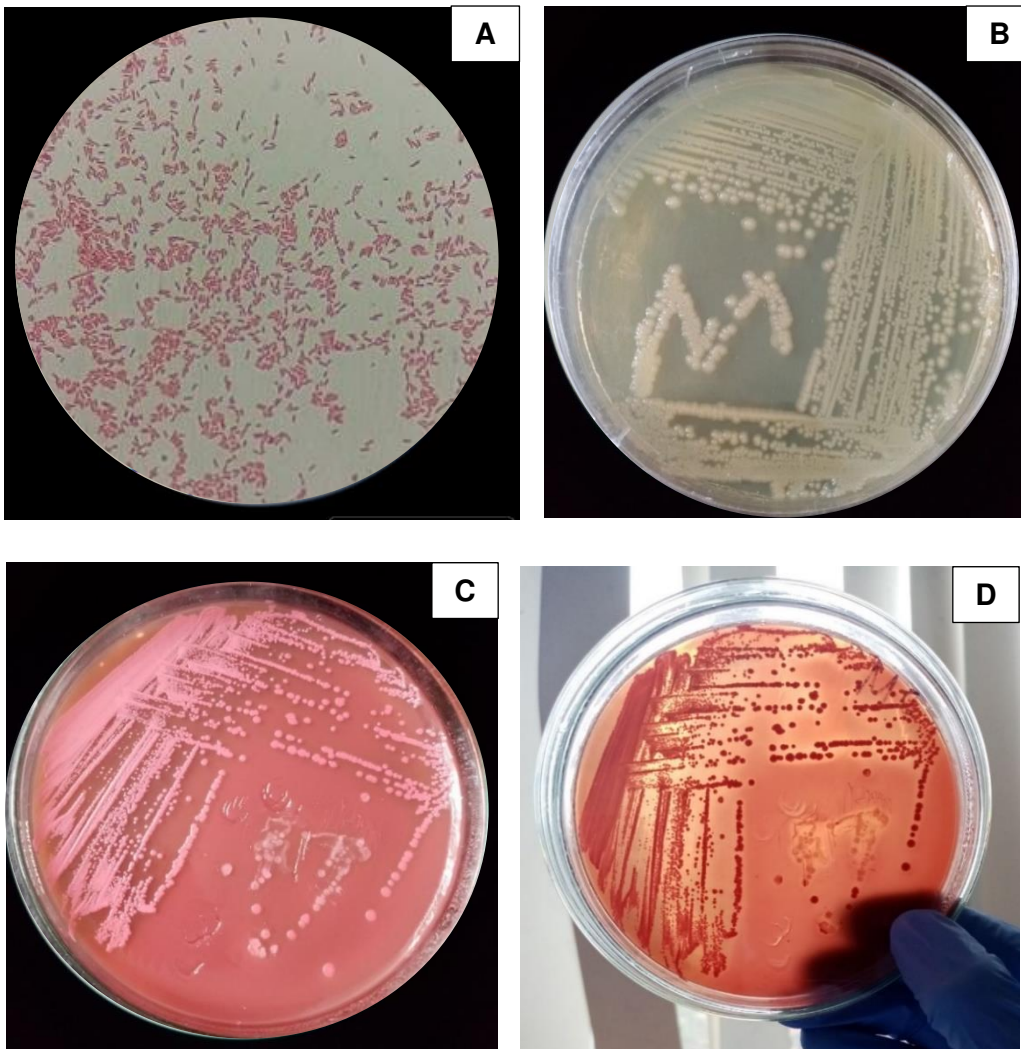


Fig. 9. Morfología microscópica y comportamiento cultural de *E. coli* ATCC 25922. (A) Coloración Gram: bacilos cortos y gram negativos, (B) Morfología de las colonias en medio TSA, (C y D) Colonias de *E. coli* ATCC 25922 en medio MacConkey: colonias puntiformes, rosadas y con halo de precipitación alrededor de ellas.

4.1.4. Prueba de antagonismo

4.1.4.1. Prueba de antagonismo de levaduras por el método de inóculo en superficie (*spot technique*)

Se realizó una prueba de *screening* de 32 cepas de levaduras nativas para determinar si poseían actividad antagonista contra *Escherichia coli* ATCC 25922. Ninguna de las 32 cepas de levaduras presentó dicha actividad (Tabla 1).

Tabla 1. Ensayo de *screening* de antagonismo realizado en cepas de levaduras nativas contra *E. coli* ATCC 25922.

| N° | Cepas | Presencia de inhibición | N° | Cepas | Presencia de inhibición |
|----|--------|-------------------------|----|--------|-------------------------|
| 1 | AMP3 | - | 17 | 4B | - |
| 2 | 1LYP2 | - | 18 | 2RHP5 | - |
| 3 | AMP4 | - | 19 | 2RHP4 | - |
| 4 | AMJ6 | - | 20 | 4LYP3 | - |
| 5 | 1RYL1 | - | 21 | SC | - |
| 6 | LT81 | - | 22 | 4.2.1 | - |
| 7 | 3RMP1 | - | 23 | 8JSAL1 | - |
| 8 | IM | - | 24 | 2RYP11 | - |
| 9 | 2SNP2 | - | 25 | 13M | - |
| 10 | 2LHJ2 | - | 26 | 18Z1 | - |
| 11 | 3RSJJ1 | - | 27 | 2.4.1 | - |
| 12 | 2LQP3 | - | 28 | E1 | - |
| 13 | AMP5 | - | 29 | 2RYP5 | - |
| 14 | 9JSAL1 | - | 30 | TLJ4 | - |
| 15 | 4LYP0 | - | 31 | TLJ7 | - |
| 16 | 4A | - | 32 | TLJ8 | - |

(+) Presencia de zona de inhibición, (-) No zona de inhibición.

4.1.4.2. Prueba de antagonismo en placa por método de difusión en pozos

Se realizó una prueba de *screening* de 33 cepas de *Bacillus* para su actividad antagonista contra *Escherichia coli* ATCC 25922. Según los resultados obtenidos, se hallaron 4 cepas con actividad antagonista frente a *E. coli* ATCC 25922 mediante el método de difusión en pozos (Tabla 2).

Tabla 2. Ensayo de *screening* de antagonismo realizado en cepas de *Bacillus* contra *E. coli* ATCC 25922.

| Nº | Cepas | Presencia de inhibición | Nº | Cepas | Presencia de inhibición |
|----|------------|-------------------------|----|----------|-------------------------|
| 1 | CatNa2A2 | - | 18 | 1PCB | - |
| 2 | ChiVIBa | - | 19 | A3 | - |
| 3 | CatNa2A1 | - | 20 | J8 | - |
| 4 | ChiVIAa | - | 21 | 10PA | - |
| 5 | LimVIIIFa | - | 22 | B9 | - |
| 6 | LimVIIAa | - | 23 | 16AH | - |
| 7 | SulMa16a1 | - | 24 | 11PB | - |
| 8 | ChiIAa | - | 25 | 5PC | - |
| 9 | Bti (VHO) | - | 26 | 21AH | - |
| 10 | HD73 | - | 27 | BPA | - |
| 11 | ChiVICa | - | 28 | LimVIIAa | - |
| 12 | LimVIIICa | - | 29 | LimVIBa | - |
| 13 | LimVIIIBa | - | 30 | BS3 | (+) |
| 14 | 120A | - | 31 | BS4 | (+) |
| 15 | LimVIIIC2a | - | 32 | BS17 | (+) |
| 16 | 9AHI | - | 33 | BS21 | (+) |
| 17 | Ica2 | - | | | |

(+) Presencia de zona de inhibición, (-) No zona de inhibición.

4.1.4.3. Selección de microorganismos con mayor actividad antagonista

Según los resultados obtenidos en el *screening* de las cepas de levaduras y de *Bacillus* se obtuvo que 4 cepas de *Bacillus* BS3, BS4, BS17 y BS21 poseían actividad antagonista. Al repetir el ensayo con las concentraciones referidas en la metodología, se evaluó tanto el cultivo directo como sobrenadante de estas cepas. En ambos casos, se realizó la medición del halo de inhibición considerando los 6 mm del diámetro del pocillo.

En el caso del cultivo bacteriano (CB), la cepa con mayor actividad antagonista fue BS4 con un halo de inhibición de 27.00 ± 2.65 mm, con un porcentaje relativo de inhibición (PRI) del 88.69% y un índice de actividad (IA) de 0.94 mientras que la cepa con menor actividad antagonista fue BS17 con un halo de inhibición de 21.67 ± 2.89 mm, con un PRI del 57.13% y un IA de 0.76 (Tabla 3 y Fig 10). De igual manera, cuando se determinó la actividad antagonista del sobrenadante libre de células (SLC), se halló que la cepa BS4 presentó la mayor actividad antagonista, con un halo de inhibición de 15.67 ± 1.15 mm, un PRI de 29.87% y un IA de 0,55 mientras que la cepa con menor actividad fue la cepa BS17, la cual tuvo la menor actividad, con un halo de 7.33 ± 0.58 mm, un PRI de 6.53% y un IA de 0.26 (Tabla 4 y Fig. 10).

Se mostraron diferencias significativas en todas las cepas de *Bacillus* empleadas con respecto a los diámetros de los halos de inhibición obtenidos por el CB y SLC en comparación con el control negativo, excepto la cepa BS17 que no mostró diferencia significativa cuando se utilizó el SLC (Fig. 20). Del mismo modo, hubo diferencias significativas para los valores de los porcentajes de inhibición y el índice de actividad. Además, tanto para los valores de CB y SLC, se mostraron diferencias significativas entre los diámetros de los halos de inhibición entre las cepas de mayor actividad (BS4) y la de menor actividad (BS17) (data no mostrada).

En resumen, la cepa BS4 presentó la mayor actividad antagonista en comparación con el control negativo tanto cuando se probó el CB como con el SLC.

Tabla 3. Actividad antagonista (zona de inhibición, índice de actividad y porcentaje relativo de inhibición) del cultivo bacteriano de las cepas de *Bacillus* a las 24 horas de incubación.

| Cepas | Medición del halo (mm) | | | Zona de inhibición (Promedio ± DE) | Porcentaje relativo de inhibición (PRI) | Índice de actividad (IA) |
|--------------------|---------------------------|----|----|---|--|-----------------------------|
| | M1 | M2 | M3 | | | |
| BS3 | 25 | 25 | 24 | 24.67 ± 0.58 | 74.04% | 0.86 |
| BS4 | 30 | 25 | 26 | 27.00 ± 2.65 | 88.69% | 0.94 |
| BS17 | 20 | 25 | 20 | 21.67 ± 2.89 | 57.13% | 0.76 |
| BS21 | 25 | 22 | 25 | 24.00 ± 1.73 | 70.08% | 0.84 |
| Control (+) | 28 | 30 | 28 | 28.67 ± 0.58 | 100% | 1 |
| Control (-) | - | - | - | - | - | - |

Zona de inhibición en mm (promedio ± DE), incluye 6mm del diámetro del pocillo, (-) No zona de inhibición, control (+): ciprofloxacino 5ug/mL, control (-): caldo de cultivo, DE: desviación estándar

Tabla 4. Actividad antagonista (zona de inhibición, índice de actividad y porcentaje relativo de inhibición) del sobrenadante libre de células de las cepas de *Bacillus* a las 24 horas de incubación.

| Cepas | Medición del halo (mm) | | | Zona de inhibición (Promedio ± DE) | Porcentaje relativo de inhibición (PRI) | Índice de actividad (IA) |
|--------------------|---------------------------|----|----|---|--|--------------------------------|
| | M1 | M2 | M3 | | | |
| BS3 | 10 | 8 | 11 | 9.67 ± 1.53 | 11.38% | 0.34 |
| BS4 | 17 | 15 | 15 | 15.67 ± 1.15 | 29.87% | 0.55 |
| BS17 | 7 | 7 | 8 | 7.33 ± 0.58 | 6.53% | 0.26 |
| BS21 | 12 | 11 | 12 | 11.67 ± 0,58 | 16.57% | 0.41 |
| Control (+) | 28 | 28 | 30 | 28.67 ± 1.15 | 100% | 1 |
| Control (-) | - | - | - | - | - | - |

Zona de inhibición en mm (promedio ± DE), incluye 6mm del diámetro del pocillo, (-) No zona de inhibición, control (+): ciprofloxacino 5ug/mL, control (-): caldo de cultivo, DE: desviación estándar

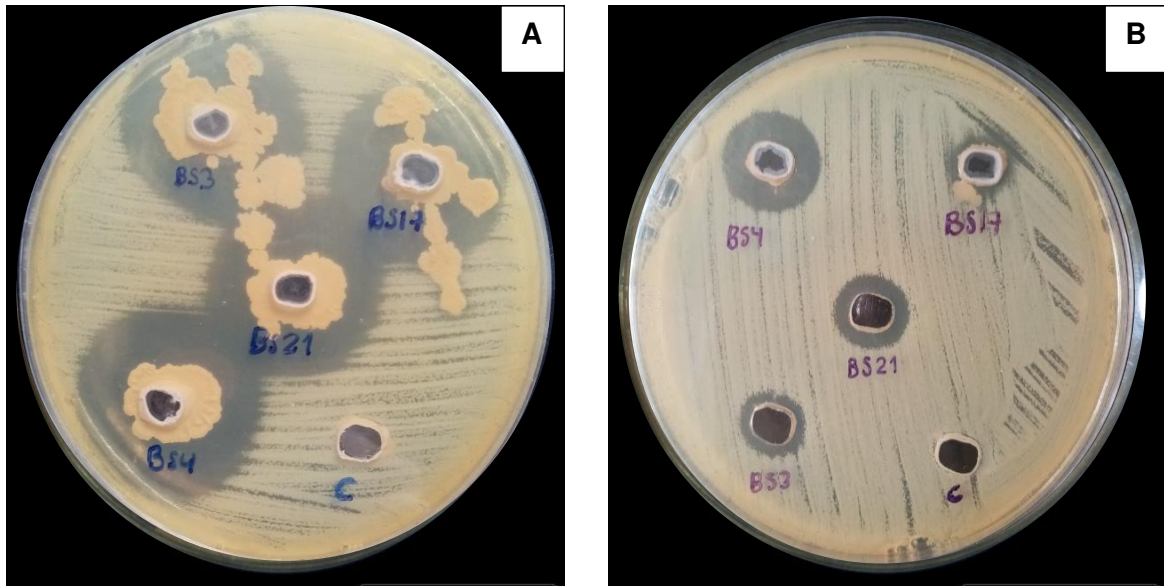


Fig 10. Actividad antagonista de las cepas de *Bacillus* frente a *E. coli* ATCC 25922. Se observaron halos de inhibición cuando se usó el (A) cultivo bacteriano y (B) sobrenadante libre de células.

4.1.4.5. Influencia del tiempo en la actividad antagonista de las cepas seleccionadas

Se realizaron ensayos de antagonismo para evaluar si el tiempo de incubación (24, 48 y 72 horas) influía en la actividad antagonista de las cepas seleccionadas de *Bacillus*.

Según los resultados obtenidos con respecto al cultivo bacteriano (CB) de las cepas de *Bacillus*, se observó que los diámetros de los halos de inhibición se mantuvieron constantes a lo largo del tiempo desde las 24 hasta las 72 horas (Tabla 5). Los valores de los halos de inhibición a las 24, 48 y 72 horas no presentaron diferencias significativas con respecto a cada cepa, con excepción de la cepa BS4, que solo presentó diferencias significativas entre las 48 y 72 horas de cultivo según la prueba de Tukey (Fig. 21).

Del mismo modo en el caso de los valores de los halos de inhibición obtenidos con sobrenadante libre de células (SLC) (Tabla 6), no se hallaron diferencias significativas en los diámetros de los halos de inhibición de cada cepa a lo largo del tiempo (Fig. 22).

La cepa que obtuvo mayor actividad antagonista es la cepa BS4 cuando se probó tanto el CB y el SLC. Con respecto al CB, los valores de los halos de inhibición obtenidos a las 24, 48 y 72 horas de incubación fueron 29.50 ± 0.70 mm, 29.00 ± 1.41 mm y 27.50 ± 0.71 mm, respectivamente (Fig. 21). Con respecto al SLC, se presentaron zonas de inhibición a las 24, 48 y 72 horas de incubación con valores de 24.67 ± 0.58 mm, 25.00 ± 0 mm y 25.00 ± 1.00 mm, respectivamente (Fig. 22). Las demás cepas mostraron halos de inhibición de similar tamaño y no presentaron diferencias significativas entre ellas (Fig. 11, 21 y 22).

Además, se pudo observar los halos de inhibición de las 4 cepas a las 72 horas utilizando tanto el CB y SLC (Fig. 11C y D), donde se evidencia un ligero mayor tamaño de los halos cuando la colonia está presente.

Tabla 5. Actividad antagonista (zona de inhibición, índice de actividad y porcentaje relativo de inhibición) del cultivo bacteriano de las cepas de *Bacillus* en medio TSB en diferentes tiempos de incubación (24, 48 y 72 horas).

| Cepas | Actividad antimicrobiana | | | | | | | | |
|--------------------|--------------------------|--------|------|--------------|--------|------|--------------|--------|------|
| | 24 horas | | | 48 horas | | | 72 horas | | |
| | ZI | PRI | IA | ZI | PRI | IA | ZI | PRI | IA |
| BS3 | 26.00 ± 1.41 | 84.24% | 0.90 | 27.00 ± 1.41 | 88.69% | 0.94 | 27.00 ± 0 | 88.69% | 0.94 |
| BS4 | 29.50 ± 0.70 | 105.9% | 1.03 | 29.00 ± 1.41 | 102.3% | 1.01 | 27.50 ± 0.71 | 92.01% | 0.96 |
| BS17 | 28.00 ± 2.83 | 95.38% | 0.98 | 27.50 ± 2.12 | 92.00% | 0.96 | 23.50 ± 2.12 | 67.19% | 0.82 |
| BS21 | 27.50 ± 3.54 | 92.00% | 0.96 | 26.50 ± 0.70 | 85.43% | 0.92 | 25.25 ± 0.35 | 77.57% | 0.89 |
| Control (+) | 28.67 ± 1.15 | 100% | 1 | 28.67 ± 1.15 | 100% | 1 | 28.67 ± 1.15 | 100% | 1 |
| Control (-) | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Zona de inhibición en mm (promedio ± DE), incluye 6mm del diámetro del pocillo, (-) No zona de inhibición, control (+): ciprofloxacino 5ug/mL, control (-): caldo de cultivo, ZI: Zona de inhibición. IA: Índice de actividad, PRI: Porcentaje relativo de inhibición

Tabla 6. Actividad antimicrobiana (zona de inhibición, índice de actividad y porcentaje relativo de inhibición) del sobrenadante libre de células de las cepas de *Bacillus* en medio TSB en diferentes tiempos de incubación (24, 48 y 72 horas).

| Cepas | Actividad antimicrobiana | | | | | | | | |
|--------------------|--------------------------|--------|------|--------------|--------|------|--------------|--------|------|
| | 24 horas | | | 48 horas | | | 72 horas | | |
| | ZI | PRI | IA | ZI | PRI | IA | ZI | PRI | IA |
| BS3 | 22.67 ± 0.58 | 62.52% | 0.79 | 24.33 ± 1.15 | 72.02% | 0.85 | 24.33 ± 0.57 | 72.02% | 0.85 |
| BS4 | 24.67 ± 0.58 | 74.04% | 0.86 | 25.00 ± 0 | 76.03% | 0.87 | 25.00 ± 1.00 | 76.03% | 0.87 |
| BS17 | 23.00 ± 1.73 | 64.36% | 0.80 | 22.67 ± 1,15 | 62.52% | 0.79 | 24.33 ± 2.31 | 72.02% | 0.85 |
| BS21 | 22.67 ± 1.15 | 62.52% | 0.79 | 22.67 ± 2.08 | 62.52% | 0.79 | 22.00 ± 1.73 | 58.88% | 0.77 |
| Control (+) | 28.67 ± 1.15 | 100% | 1 | 28.67 ± 1.15 | 100% | 1 | 28.67 ± 1.15 | 100% | 1 |
| Control (-) | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Zona de inhibición en mm (promedio ± DE), incluye 6mm del diámetro del pocillo, (-) No zona de inhibición, control (+): ciprofloxacino 5ug/mL, control (-): caldo de cultivo, ZI: Zona de inhibición. IA: Índice de actividad, PRI: Porcentaje relativo de inhibición

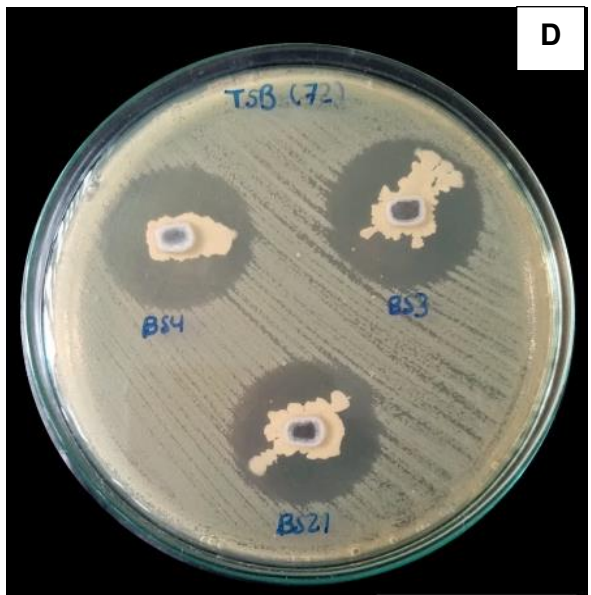
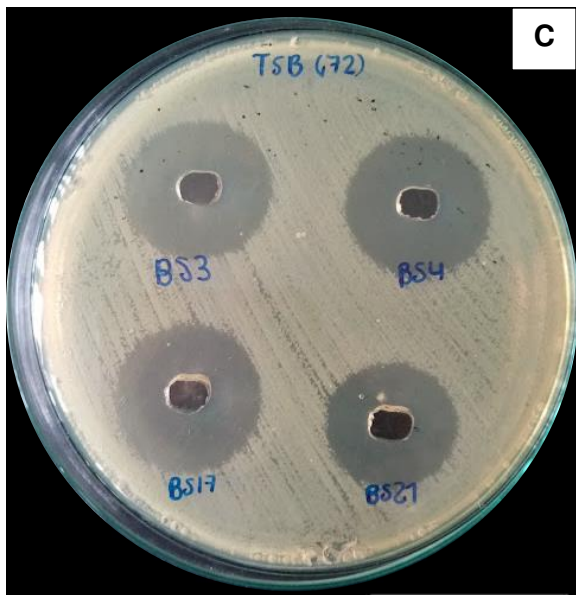
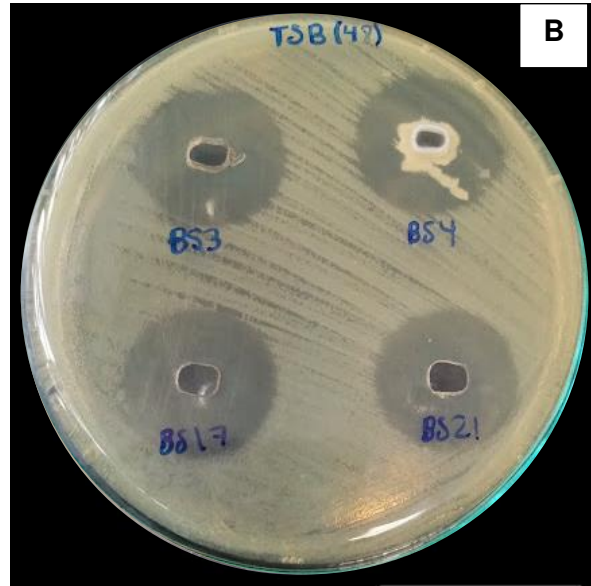
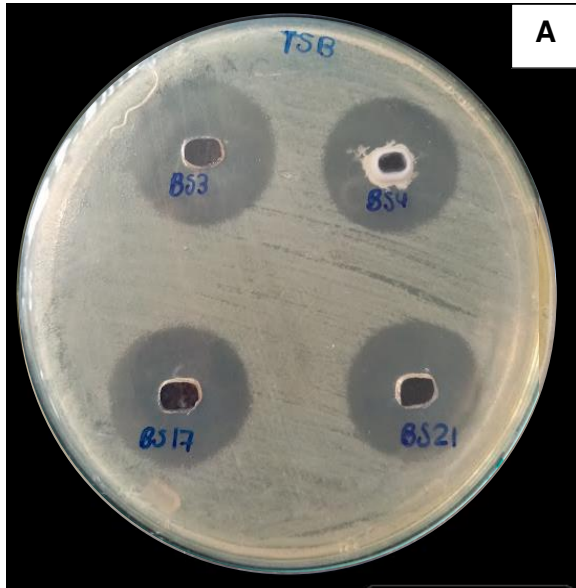


Fig 11. Actividad antagonista de las cepas BS3, BS4, BS17 y BS21 en diferentes tiempos de incubación. (A) Sobrenadante a las 24 horas de incubación, (B) Sobrenadante a las 48 horas de incubación, (C) Sobrenadante a las 72 horas de incubación y (D) Cultivo bacteriano a las 72 horas de incubación.

4.1.5. Cinética de crecimiento de las cepas de *Bacillus*

Se determinó la cinética de crecimiento de las siguientes cepas: BS3, BS4, BS17 y BS21 en caldo TSB.

4.1.5.1. Cinética de crecimiento en medio TSB

En todas las cepas, se pudo observar que la fase exponencial empieza entre las 2 a 4 horas de crecimiento (Figs. 12-15).

En el caso de la cepa BS3, su fase exponencial duró aproximadamente 8 horas para después entrar en fase estacionaria (Fig. 12), en el caso de la cepa BS4, su fase exponencial duró 6 horas (Fig. 13). Por otro lado, la fase exponencial de la cepa BS17 duró 11 horas (Fig. 14) mientras que en la cepa BS21 duró 12 horas (Fig. 15), siendo la cepa con fase exponencial más prolongada.

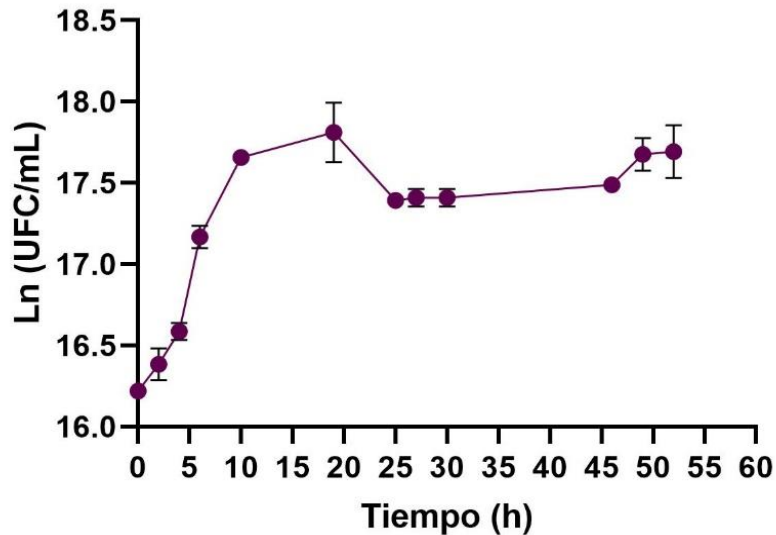


Fig 12. Cinética de crecimiento de la cepa BS3 a través del tiempo

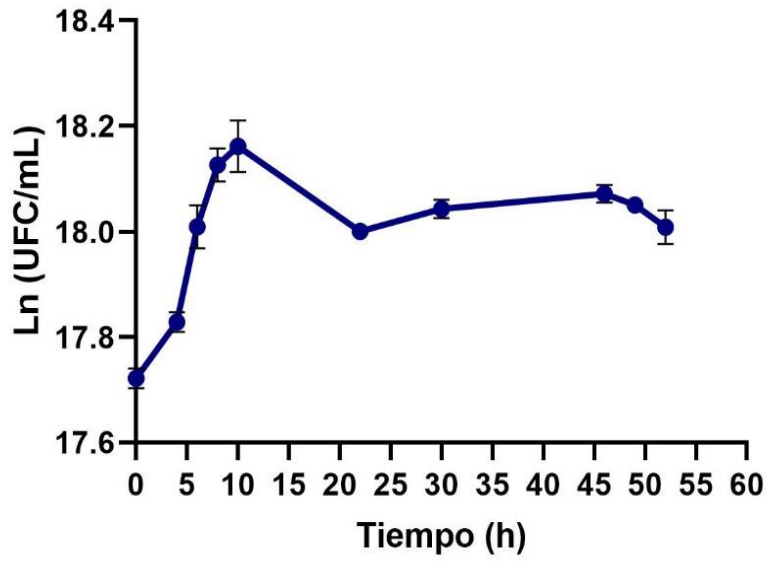


Fig 13. Cinética de crecimiento de la cepa BS4 a través del tiempo

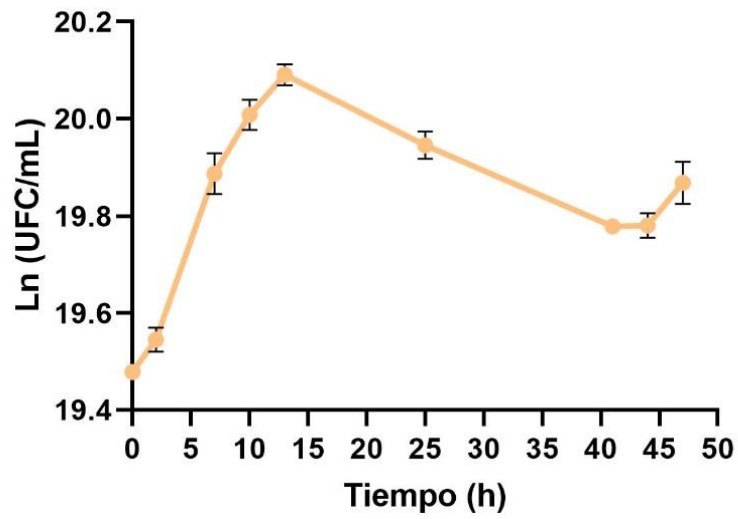


Fig 14. Cinética de crecimiento de la cepa BS17 a través del tiempo

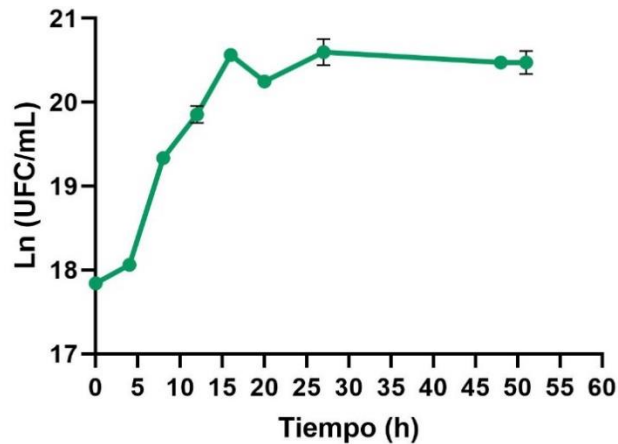


Fig 15. Cinética de crecimiento de la cepa BS21 a través del tiempo

4.1.5.2. Tasa de crecimiento de las cepas de *Bacillus*

La tasa de crecimiento se determinó para cada cepa (BS3, BS4, BS17 y BS21) a partir de la regresión lineal de la fase logarítmica de las curvas de crecimiento usando la siguiente fórmula:

$$\mu = \frac{\text{Ln}X_f - \text{Ln}X_o}{T_f - T_o}$$

Donde: Xf: población final; Xo: población inicial; Tf: tiempo final; To: tiempo inicial.

La tasa de crecimiento se expresó como la pendiente en cada una de las ecuaciones de las regresiones lineales de la fase logarítmica de las curvas de crecimiento de las cepas de *Bacillus* sp. (Tabla 7, Figs. 16 -19).

Tabla 7. Tasas de crecimiento de cepas de *Bacillus* en medio TSB.

| Cepas de <i>Bacillus</i> | Tasa de crecimiento $\mu_{max} (h^{-1})$ |
|--------------------------|---|
| BS3 | 0.1661 |
| BS4 | 0.05704 |
| BS17 | 0.05021 |
| BS21 | 0.2009 |

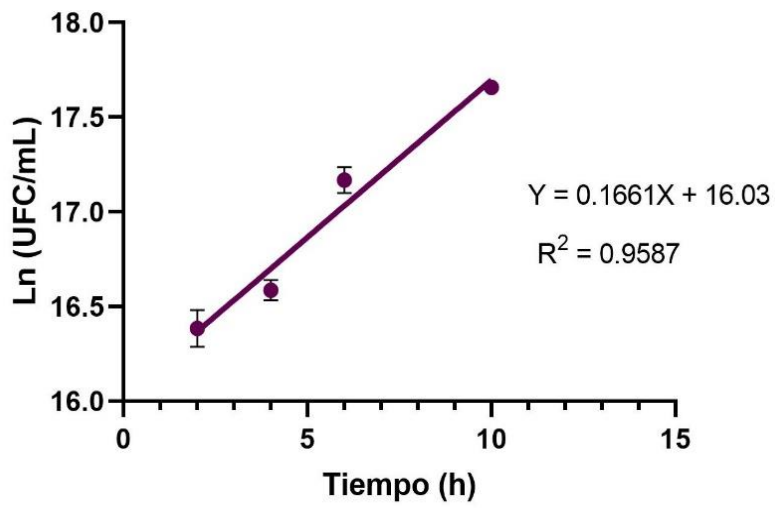


Fig 16. Tasa de crecimiento de la cepa BS3.

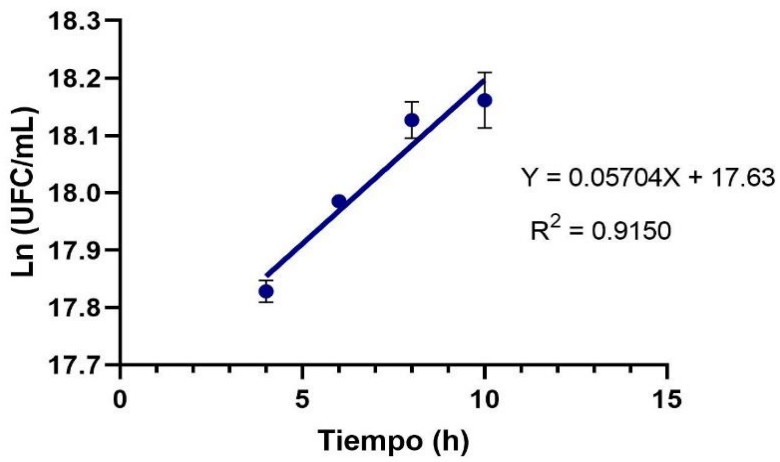


Fig 17. Tasa de crecimiento de la cepa BS4.

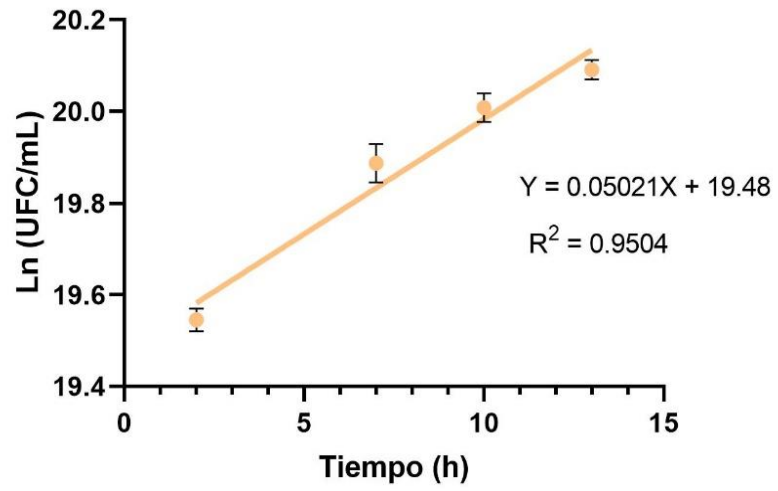


Fig 18. Tasa de crecimiento de la cepa BS17.

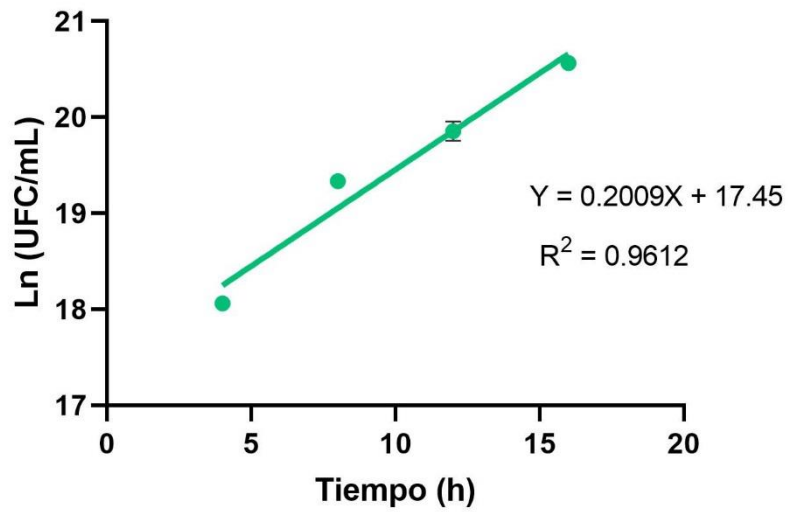


Fig 19. Tasa de crecimiento de la cepa BS21.

vii. DISCUSIÓN

Por muchos años, el metabolismo secundario de los microorganismos fue ignorado ya que se consideraba un estudio no esencial; sin embargo, en la actualidad, se descubrió que las sustancias producidas en la fase estacionaria poseían un rol importante en muchas áreas, entre ellas, la industria farmacéutica (Karlovsy, 2007).

En este trabajo, se abordaron dos grupos microbianos: levaduras y bacterias. En el caso de las levaduras evaluadas, ninguna de las 32 cepas presentó actividad antagonista frente a *E. coli* ATCC 25922 (Tabla 1). A pesar de que, en los antecedentes se describen varios estudios que respaldan su potencial antimicrobiano, el hecho de que no se presentaran zonas de inhibición contra la cepa testigo pudo deberse a la procedencia de las levaduras empleadas. La procedencia de las levaduras suele ser frutas maduras, bebidas fermentadas y/o alimentos; por lo cual, es probable que hayan tenido un contacto previo con bacterias y, por ende, hayan desarrollado mecanismos que beneficien su actividad antimicrobiana. Mientras que, en el presente estudio, la mayoría de ellas fueron aisladas de lagunas altoandinas contaminadas con relaves mineros, por lo que, es muy probable que el escaso o nulo contacto con *E. coli* haya sido un factor importante para la no producción de metabolitos antagonistas.

Asimismo, para reforzar lo mencionado anteriormente, el estudio de Acuña *et al.* (2010), sustenta que las levaduras evaluadas presentaban actividad antagonista, siempre y cuando, existía interacción entre estas y la bacteria testigo, ya que solo se evidenciaron halos de inhibición cuando la levadura estaba presente; por el contrario, cuando se probó el sobrenadante, no se observó la actividad antagonista. Esta interacción es importante debido a que, los nichos habituales de las levaduras, como las frutas maduras, se caracterizan por una compleja interacción y competencia con una multitud de cohabitantes como las bacterias (Barata *et al.*, 2012; Thompson, 1999). Las bacterias suelen secretar diversos compuestos como enzimas y ácidos grasos mientras que las levaduras, a modo de respuesta, acumulan estresores microbianos como el ácido acético, etanol y sustancias antimicrobianas volátiles (Piskure *et al.*, 2006). Este enunciado se refuerza con el estudio de Zhou *et al.* (2018), donde se evaluó una competencia por nutrientes entre levaduras y bacterias. Se emplearon 18 cepas de levaduras de la familia *Saccharomycetaceae*, las cuales se sembraron en presencia de bacterias, por al menos 130 pasajes. En el trabajo del autor en referencia, se demostró que el cariotipo de algunas levaduras cambió a lo largo

de los pasajes y que 8 de las 18 levaduras sufrieron cambios a nivel genómico. Estas 8 cepas de levaduras desarrollaron actividad antibacteriana, la cual no era evidente en las cepas ancestrales. Las levaduras mutantes se caracterizaron por una duplicación en la producción de etanol, capacidad de usar mayor número de fuentes de carbono y mayor tolerancia al estrés. Con este estudio se puede enfatizar que la interacción continua entre ambos microorganismos estimula el desarrollo de los mecanismos necesarios para el antagonismo.

Por otro lado, el otro grupo evaluado fue el género *Bacillus*. La importancia de este grupo bacteriano radica en la sobresaliente producción de sustancias antibacterianas capaces de inhibir el crecimiento microbiano. A estas bacterias se les atribuye la producción de diversos metabolitos secundarios antagonistas de amplio espectro, como antibióticos, antifúngicos y sideróforos (Baruzzi *et al.* 2011; Velusamy & Gnanamanickam, 2008).

En el presente estudio, se trabajó con 33 cepas de *Bacillus* (Tabla 2). Las cepas BS3, BS4, BS17 y BS21 empleadas en este estudio no se lograron identificar mediante el uso de HiCrome Bacillus Agar (Fig. 8). Sin embargo, según sus características morfológicas, su comportamiento cultural (Figs. 6 y 7) y lo expuesto en el Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática se trata presuntivamente del género *Bacillus* (De Vos *et al.*, 2009); sin embargo, se requiere de pruebas bioquímicas y/o moleculares para lograr su correcta identificación a nivel de especie.

Con respecto a la actividad antagonista, las cepas BS3, BS4, BS17 y BS21 presentaron zonas de inhibición frente a *E. coli* ATCC 25922. En este estudio, se inoculó tanto el cultivo bacteriano (CB) y el sobrenadante libre de células (SLC) de las cepas de *Bacillus* mencionadas. Según los resultados obtenidos (Tablas 3 y 4), se pudo observar que, tanto en presencia del cultivo como del sobrenadante, las cepas mostraron actividad antagonista (Fig. 10). En todas las cepas se presentaron diferencias significativas entre los valores de los diámetros de las zonas de inhibición provocadas por el CB y el SLC frente al control negativo; donde la cepa BS4 mostró halos de inhibición de mayor tamaño, con valores de 27.00 ± 2.65 mm y 15.67 ± 1.15 mm cuando se utilizó el CB y el SLC, respectivamente (Fig. 20).

El género *Bacillus* suele mostrar actividad antimicrobiana de amplio espectro, es decir, tanto contra bacterias gram positivas como gram negativas. Sin embargo, en el estudio de Sci (2008), se demostró que las cepas que emplearon, poseían mayor efecto contra bacterias

gram positivas como *S. aureus* TISTR 517 y que, cuando se enfrentaban contra bacterias gram negativas como *E. coli* TISTR 887, era necesario implementar otros métodos de evaluación como *cross streak* o utilizar necesariamente el cultivo microbiano de *Bacillus* en lugar del sobrenadante, para que se evidencie un notorio efecto antagonista. De igual manera, en el estudio de Yilmaz, Soran & Beyatli (2006), las cepas de *B. brevis* que evaluaron tuvieron actividad antagonista contra *S. aureus* ATCC 25923 mientras que contra bacterias gram negativas como *E.coli* NRRL B-704, *Yersinia enterocolitica* ATCC1501 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 no tuvo efecto inhibitorio. Por lo que, el hecho de que las cepas empleadas en el presente estudio exhiban una alta actividad antimicrobiana contra una bacteria gram negativa, demuestra su gran potencial como antagonista.

Asimismo, según los resultados obtenidos, se observó que se evidenciaron mayores diámetros de halos de inhibición cuando se utilizó el cultivo bacteriano en comparación con el sobrenadante (Figs. 10 y 11). Esta idea se refuerza con el estudio de Dai *et al.*, (2018), quienes realizaron una prueba de antagonismo de bacterias lácticas contra patógenos alimentarios donde probaron células bacterianas, cultivo de bacterias ácido-lácticas y sobrenadante libre de células. Para la mayoría de las cepas, los efectos del cultivo de bacterias ácido-lácticas fueron superiores que los otros dos tratamientos. Este fenómeno puede atribuirse a las diferentes características metabólicas de cada cepa antagonista, la producción de diferentes tipos de cantidades de metabolitos antibacterianos y la acumulación y difusión de los metabolitos.

Por otro lado, al evaluar la influencia del tiempo de incubación de las cepas en la actividad antagonista, se evidenció que tanto en el CB y el SLC (Tabla 6 y 7), los halos de inhibición se mantuvieron constantes a las 24, 48 y 72 horas de incubación (Fig.11). No se mostraron diferencias significativas entre los tres tiempos de incubación (Figs. 21 y 22). La cepa BS4 presentó mayores valores de halos de inhibición con respecto a las otras cepas, donde la mayor actividad se evidenció a partir de las 24 horas utilizando CB y a las 72 horas cuando se utilizó el SLC. En el estudio de Usta & Demirkan., (2013) también evaluaron la influencia del tiempo en la actividad antagonista, donde se probaron 4 tiempos de incubación diferentes: 24, 48, 72 y 96 horas de incubación. En este trabajo, se evidenció que la actividad antagonista máxima se obtuvo a las 72 horas; además, se menciona que la actividad antagonista aumentaba gradualmente desde las 24 hasta las 72 horas y que, a partir de ese tiempo, comenzaba a disminuir; lo cual concuerda con este presente estudio (Tablas 5 y 6). Además, ellos indican, que la actividad antimicrobiana máxima depende de

la cepa de microorganismo con la que se trabaje y del tipo de vía metabólica que se active; sin embargo, generalmente en *Bacillus*, el tiempo de la actividad antimicrobiana se encuentra entre las 24 a 72 horas de incubación.

Con respecto a las cinéticas de crecimiento que se obtuvieron, se puede observar que, en la mayoría de los casos, la fase logarítmica de las cepas de *Bacillus* se inició entre las 4 y 5 horas y terminó entre las 10 y 12 horas, posteriormente se inició la fase estacionaria (Figs. 12-15). Estos datos, son de gran importancia porque permitirían determinar en qué momento se generan metabolitos antagonistas secundarios.

Entre las perspectivas futuras de este estudio, se buscará determinar la naturaleza de los metabolitos antimicrobianos secretados por las cepas prometedoras BS3, BS4, BS17 y BS21. Según la literatura, el género *Bacillus* suele sintetizar y secretar péptidos antimicrobianos como potenciales candidatos para superar el reto de la resistencia bacteriana. En algunos de los estudios ya presentados se han detectado péptidos tales como los lantibióticos, entre ellos la subtilina (Karlovsky, 2007); mersacidina, un péptido tetracíclico que pertenece también a los lantibióticos y que muestra actividad antagonista contra *S. aureus* meticilinoresistentes. Por otro lado, se encuentra la bacitracina, la cual es producida por *B. licheniformis*; coagulina producido por *B. coagulans*, cerecina 7 producido por *B. cereus*, entre otras bacteriocinas (Caulier *et al.*, 2019). La importancia de las cepas del presente estudio radica en su gran actividad antagonista que presenta contra una bacteria gram negativa, en este caso, *E. coli* ATCC 25922.

viii. CONCLUSIONES

- Las treinta y dos cepas de levaduras empleadas en este trabajo no presentaron actividad antagonista contra *Escherichia coli* ATCC 25922.
- De las 33 cepas de *Bacillus* empleadas, solo las cepas BS3, BS4, BS17 y BS21 presentaron actividad antagonista frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, donde la cepa BS4 mostró halos de inhibición de mayor tamaño con valores de 27.00 ± 2.65 mm y 15.67 ± 1.15 mm cuando se utilizó el cultivo bacteriano (CB) y el sobrenadante libre de células (SLC), respectivamente.
- La actividad antimicrobiana se mantuvo constante a las 24, 48 y 72 horas de incubación no mostrando diferencias significativas entre los distintos tiempos. La mayor actividad se evidenció a partir de las 24 horas con el cultivo bacteriano y, a las 72 horas con el sobrenadante.
- Las cinéticas de crecimiento realizadas a las cepas de *Bacillus* determinaron que la fase logarítmica se inició entre las 4 y 5 horas de cultivo y terminó entre las 10 y 12 horas, posteriormente se inició la fase estacionaria.
- El uso del cultivo bacteriano de *Bacillus* evidenció mayor actividad antagonista en comparación al sobrenadante libre de células.

ix. RECOMENDACIONES

- Se recomienda identificar bioquímica y molecularmente las cepas de *Bacillus* que presentaron actividad antagonista.
- Se recomienda evaluar la actividad antagonista de las cepas de *Bacillus* frente a otras bacterias ATCC o de origen hospitalario para ver su potencial antimicrobiano de amplio espectro.
- Posteriormente, se recomienda determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las cepas de *Bacillus* frente a *E. coli* ATCC 25922.
- Se recomienda analizar el sobrenadante de las cepas para conocer la naturaleza de los metabolitos antagonistas y caracterizarlos.

x. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuña-Fontecilla, A., Silva-Moreno, E., Ganga, M. A., & Godoy, L. (2017). Evaluation of antimicrobial activity from native wine yeast against food industry pathogenic microorganisms. *CYTA - Journal of Food*, 15(3), 457–465. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1297961>
- Adrianzén, D., Arbizu, Á., Ortiz, J., & Samalvides, F. (2013). Mortalidad por bacteriemia causada por *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. productoras de beta lactamasas de espectro extendido: cohorte retrospectiva en un hospital de Lima, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 30(1), 18–25. <https://doi.org/10.1590/s1726-46342013000100004>
- Aunpad, R., & Na-Bangchang, K. (2007). Pumilicin 4, a novel bacteriocin with anti-MRSA and Anti-VRE activity produced by newly isolated bacteria *Bacillus pumilus* strain WAPB4. *Current Microbiology*, 55(4), 308–313. <https://doi.org/10.1007/s00284-006-0632-2>
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, 153(3), 243–259. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.025>
- Baruzzi, F., Quintieri, L., Morea, M., & Caputo, L. (2011). Antimicrobial compounds produced by *Bacillus* spp . and applications in food. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, A. Méndez-Vilas (Ed.), January, 1102–1111. <http://www.formatex.info/microbiology3/book/1102-1111.pdf>
- Borgoño, N. (2019). Reporte de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) en el Perú. *Boletín Epidemiológico Del Perú.*, 15(28), 381–383.
- Boschi-Pinto, C., Velebit, L., & Shibuya, K. (2008). Estimating child mortality due to diarrhoea in developing countries. *Bulletin of the World Health Organization*, 86(9), 710–717. <https://doi.org/10.2471/BLT.07.050054>
- Carrillo, C., Teruel, J. A., Aranda, F. J., & Ortiz, A. (2003). Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1611(1–2), 91–97. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(03\)00029-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(03)00029-4)

- Caulier, S., Nannan, C., Gillis, A., Licciardi, F., Bragard, C., & Mahillon, J. (2019). Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00302>
- Chalasani, A. G., Dhanarajan, G., Nema, S., Sen, R., & Roy, U. (2015). An antimicrobial metabolite from *Bacillus* sp.: Significant activity against pathogenic bacteria including multidrug-resistant clinical strains. *Frontiers in Microbiology*, *6*(DEC), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01335>
- Czerucka, D., & Rampal, P. (2002). Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. *Microbes and Infection*, *4*(7), 733–739. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)01592-7](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01592-7)
- Dai, L., Yuan, Y., Zhang, Y., Wei, J., & Yue, T. (2018). Screening and Evaluation of Probiotics for Antimicrobial Activity against Foodborne Pathogenic Bacteria. *Food Science*, *39*, 93–101.
- De Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N., Ludwig, W., Rainey, F., Schleifer, K.-H., & Whitman, W. (2009). The Firmicutes. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Second Edi).
- Dharajiya, D., Patel, P., Patel, M., & Moitra, N. (2014). In vitro Antimicrobial Activity and Qualitative Phytochemical Analysis of *Withania somnifera* (L.) Dunal Extracts. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, *27*(3), 349–354. <https://doi.org/10.23959/sfmrl-1000016>
- Floriano, B., Ruiz-Barba, J. L., & Jiménez-Díaz, R. (1998). Purification and genetic characterization of enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*(12), 4883–4890. <https://doi.org/10.1128/aem.64.12.4883-4890.1998>
- Hagelin, G., Oulie, I., Raknes, Å., Undheim, K., & Clausen, O. G. (2004). Preparative high-performance liquid chromatographic separation and analysis of the Maltacine complex – a family of cyclic peptide antibiotics from *Bacillus subtilis*. *Journal of Chromatography B*, *811*(2), 243–251. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.09.008>
- Hammami, I., Jaouadi, B., Bacha, A. Ben, Rebai, A., Bejar, S., Nesme, X., & Rhouma, A. (2012). *Bacillus subtilis* bacteriocin Bac 14B with a broad inhibitory spectrum:

- Purification, amino acid sequence analysis, and physicochemical characterization. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 17(1), 41–49. <https://doi.org/10.1007/s12257-010-0401-8>
- Hatoum, R., Labrie, S., & Fliss, I. (2012). Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: From fundamental to novel applications. *Frontiers in Microbiology*, 3(DEC), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00421>
- Karlovsky, P. (2007). Secondary Metabolites in Soil Ecology. In *Secondary Metabolites in Soil Ecology* (pp. 1–19).
- Linscott, A. J. (2011). Food-Borne Illnesses. *Clinical Microbiology Newsletter*, 33(6), 41–45. <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2011.02.004>
- Lopes, C. A., & Sangorrín, M. P. (2010). Optimization of killer assays for yeast selection protocols. *Revista Argentina de Microbiología*, 42(4), 298–306. <https://doi.org/10.1590/S0325-75412010000400011>
- Moore, T. (2013). Antagonistic Activity of Bacillus Bacteria against Food-Borne Pathogens. *Journal of Probiotics & Health*, 01(03), 1–6. <https://doi.org/10.4172/2329-8901.1000110>
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451–1474. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>
- Ng, T. K., Yu, A. Q., Ling, H., Pratomo Juwono, N. K., Choi, W. J., Leong, S. S. J., & Chang, M. W. (2020). Engineering *Yarrowia lipolytica* towards food waste bioremediation: Production of fatty acid ethyl esters from vegetable cooking oil. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 129(1), 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.06.009>
- Ochoa, T. J., Mercado, E. H., Durand, D., Rivera, F. P., Mosquito, S., Contreras, C., Riveros, M., Lluque, A., & Barletta, F. (2011). Frecuencia y patotipos de *Escherichia coli* diarrogénica en niños peruanos con y sin diarrea Peruvian children with and without diarrhea. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 28(1), 13–20.
- Olea, A., Díaz, J., Fuentes, R., Vaquero, A., & García, M. (2012). Foodborne disease outbreaks surveillance in Chile. *Revista Chilena de Infectología*, 29(5), 504–510. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182012000600004>

- Piskure, J., Rozpedowska, E., Polakova, S., Merico, A., & Compagno, C. (2006). How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *TRENDS in Genetics*, *22*(4), 2–5.
- Roongsawang, N., Washio, K., & Morikawa, M. (2011). Diversity of nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants. *International Journal of Molecular Sciences*, *12*(1), 141–172. <https://doi.org/10.3390/ijms12010141>
- Rosas, A., & Acosta, M. (2001). *Manual Higiénico de Alimentos*.
- Sansinenea, E., & Ortiz, A. (2011). Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnology Letters*, *33*(8), 1523–1538. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0617-5>
- Sci, W. J. (2008). A Comparison of Two Methods Used for Measuring the Antagonistic Activity of *Bacillus* Species. *Culture*, *5*(2), 161–171.
- Singariya, P., Kumar, P., & Kumar, K. (2011). In-vitro bio-efficacy of stem extracts of *Ashwagandha* against some In-vitro bio-efficacy of stem extracts *Ashwagandha* against some pathogens of. *Journal of Current Pharmaceutical Research*, January.
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: Structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, *56*(4), 845–857. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>
- Sumi, C. D., Yang, B. W., Yeo, I. C., & Hahm, Y. T. (2015). Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: A new era for antibiotics. *Canadian Journal of Microbiology*, *61*(2), 93–103. <https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0613>
- Tamehiro, N., Okamoto-Hosoya, Y., Okamoto, S., Ubukata, M., Hamada, M., Naganawa, H., & Ochi, K. (2002). Bacilysoicin, a novel phospholipid antibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *46*(2), 315–320. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.2.315-320.2002>
- Thompson, J. N. (1999). The Evolution of Species Interactions. In *Science* (Vol. 284, Issue June, pp. 2116–2118).
- Usta, A., & Demirkan, E. (2013). The Effect of Growth Parameters on the Antibiotic Activity and Sporulation in *Bacillus* Spp. Isolated From Soil. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, *2*(2), 2310–2313.
- Velusamy, P., & Gnanamanickam, S. (2008). The Effect of Fungal Secondary Metabolites

on Bacterial and Fungal Pathogens. In *Secondary Metabolites in Soil Ecology* (pp. 129–140). https://doi.org/10.1007/978-3-540-74543-3_7

Yang, S. C., Lin, C. H., Aljuffali, I. A., & Fang, J. Y. (2017). Current pathogenic *Escherichia coli* foodborne outbreak cases and therapy development. *Archives of Microbiology*, *199*(6), 811–825. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1393-y>

Yilmaz, M., Soran, H., & Beyatli, Y. (2006). Antimicrobial activities of some *Bacillus* spp. strains isolated from the soil. *Microbiological Research*, *161*(2). <https://doi.org/10.1016/j.micres.2005.07.001>

Younis, G., Awad, A., Dawod, R. E., & Yousef, N. E. (2017). Antimicrobial activity of yeasts against some pathogenic bacteria. *Veterinary World*, *10*(8), 979–983. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.979-983>

Zhou, N., Katz, M., Knecht, W., Compagno, C., & Piškur, J. (2018). Genome dynamics and evolution in yeasts: A long-term yeast-bacteria competition experiment. *PLoS ONE*, *13*(4), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194911>

XI. ANEXO

Tabla 8. Cepas de levaduras empleadas en la evaluación de la actividad antagonista contra *E. coli* ATCC 25922.

| N° | Código | Levaduras | Código de acceso (GenBank) | Lugar de muestreo (Ciudad) |
|----|--------|----------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 1 | AMP3 | <i>Yarrowia lipolytica</i> | FR856618.1 | Laguna Pacococha |
| 2 | 1LYP2 | <i>Cystobasidium sp.</i> | AM774153.1 | Relavera Yanamate |
| 3 | AMP4 | <i>Pichia fermentans</i> | MG015938.1 | Laguna Pacococha |
| 4 | AMJ6 | <i>Yarrowia lipolytica</i> | MG015940.1 | Laguna Pacococha |
| 5 | 1RYL1 | <i>Meyerozyma guilliermondii</i> | MH656369 | Represa Yuracmayo |
| 6 | LT81 | <i>Yarrowia lipolytica</i> | MG018364 | Lago Junín |
| 7 | 3RMP1 | <i>Meyerozyma guilliermondii</i> | MH656385 | Milpo |
| 8 | IM | <i>Yarrowia lipolytica</i> | MF101734.1 | Lago Junín |
| 9 | 2SNP2 | <i>Meyerozyma guilliermondii</i> | MH656365 | Lago Junín |
| 10 | 2LHJ2 | <i>Meyerozyma guilliermondii</i> | MH656367 | Laguna Huacracocha |
| 11 | 3RSJJ1 | <i>Meyerozyma guilliermondii</i> | MH656386 | Río San Juan |
| 12 | 2LQP3 | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | MG018366.1 | Laguna Quiulacocha |
| 13 | AMP5 | <i>Yarrowia lipolytica</i> | MF101734.1 | Lago Junín |
| 14 | 9JSAL1 | <i>Pichia fermentans</i> | KY442835.1 | - |
| 15 | 4LYP0 | <i>Meyerozyma guilliermondii</i> | MF769607.1 | Yanamate |
| 16 | 4A | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | MF927654.1 | Laguna Canchis |

| | | | | |
|-----------|--------|--|-------------------|-----------------------|
| 17 | 4B | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | MG707723.1 | Laguna Canchis |
| 18 | 2RHP5 | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | MG707723.1 | Relave Huarón |
| 19 | 2RHP4 | <i>Yarrowia lipolytica</i> | MF101734.1 | Relave Huarón |
| 20 | 4LYP3 | <i>Meyerozyma guilliermondii</i> | MG736036.1 | Yanamate |
| 21 | SC | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | KX428530.1 | - |
| 22 | 4.2.1. | <i>Yarrowia lipolytica</i> | MF101734.1 | - |
| 23 | 8JSAL1 | <i>Pichia fermentans</i> | KY442835.1 | |
| 24 | 2RYP11 | <i>Pichia fermentans</i> | KY442835.1 | - |
| 25 | 13M | <i>Yarrowia lipolytica</i> | - | - |
| 26 | 18Z1 | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | - | - |
| 27 | 2.4.1 | NI | - | - |
| 28 | E1 | NI | - | - |
| 29 | 2RYP5 | NI | - | - |
| 30 | TLJ4 | NI | - | Pichanaqui |
| 31 | TLJ7 | NI | - | Pichanaqui |
| 32 | TLJ8 | NI | - | Pichanaqui |

Tabla 9. Cepas de *Bacillus* empleadas en la evaluación de la actividad antagonista contra *E. coli* ATCC 25922.

| N° | Código | Lugar de muestreo (Ciudad) | N° | Código | Lugar de muestreo (ciudad) |
|-----------|---------------|-----------------------------------|-----------|---------------|-----------------------------------|
| 1 | CatNa2A2 | Piura | 17 | BS4 | Laboratorio |
| 2 | CatNa2A1 | Piura | 18 | BS17 | Laboratorio |
| 3 | ChiVIBa | Chiclayo | 19 | BS21 | Laboratorio |
| 4 | LimVIIAa | Lima | 20 | 120A | Lima |
| 5 | LimVIIAa | Lima | 21 | Bti (VHO) | Lima |
| 6 | SulMa16a1 | Sullana | 22 | 9AHI | Lima |
| 7 | ChiIAa | Chiclayo | 23 | Ica2 | Lima |
| 8 | HD73 | Lima | 24 | 1PCB | Lima |
| 9 | ChiVIAa | Chiclayo | 25 | A3 | Lima |
| 10 | LimVIIIFa | Lima | 26 | J8 | Lima |
| 11 | ChiVICa | Chiclayo | 27 | 10PA | Lima |
| 12 | LimVIIICa | Lima | 28 | B9 | Lima |
| 13 | LimVIIIBa | Lima | 29 | 16AH | Lima |
| 14 | LimVIIIC2a | Lima | 30 | 11PB | Lima |
| 15 | LimVIBa | Lima | 31 | 5PC | Lima |
| 16 | BS3 | Laboratorio | 32 | 21AH | Lima |
| | | | 33 | BPA | Lima |

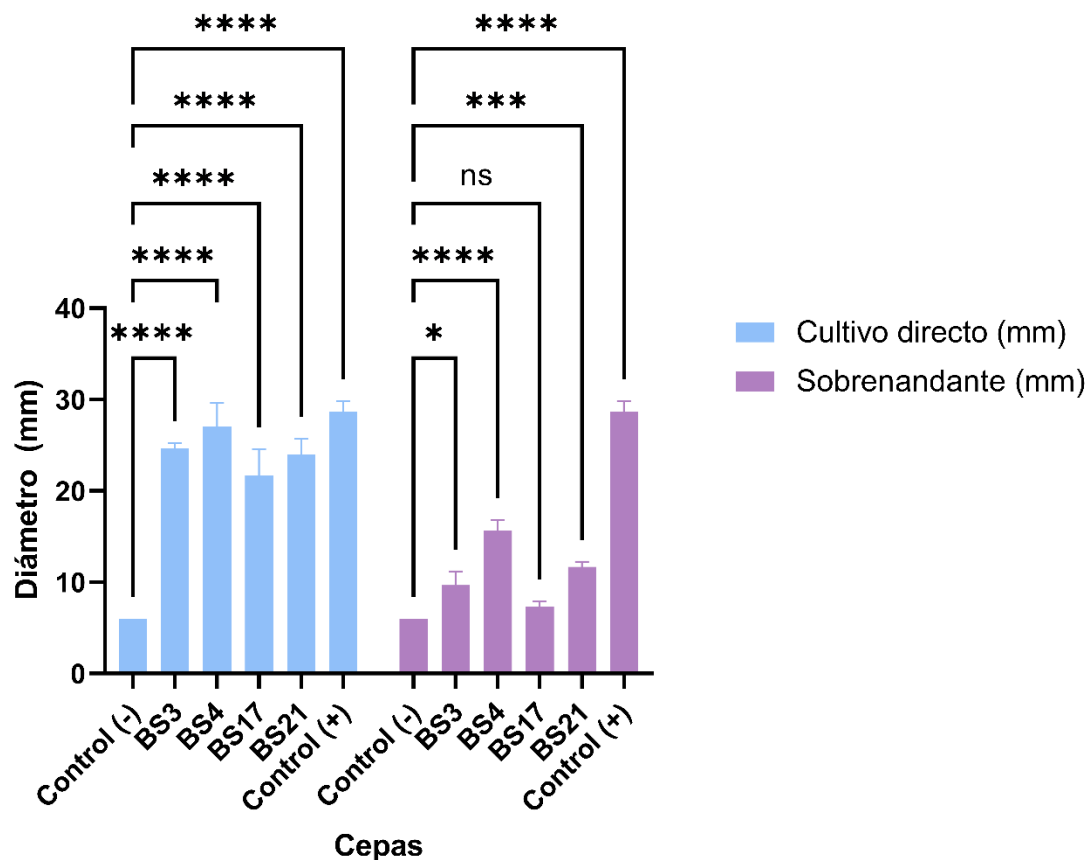


Fig 20. Actividad antagonista del cultivo bacteriano y sobrenadante de las cepas de *Bacillus* contra *E. coli* ATCC 25922. Las barras representan el promedio \pm desviación estándar de las medidas de los halos de inhibición en milímetros obtenidos de tres repeticiones independientes en comparación con el control negativo. Las barras con significancia estadística se denotan como * ($p \leq 0.05$), *** ($p \leq 0.001$) y **** ($p \leq 0.0001$) usando la prueba de comparación múltiple de Dunnett en ANOVA. Denotación 'ns' representa valores no significativos.

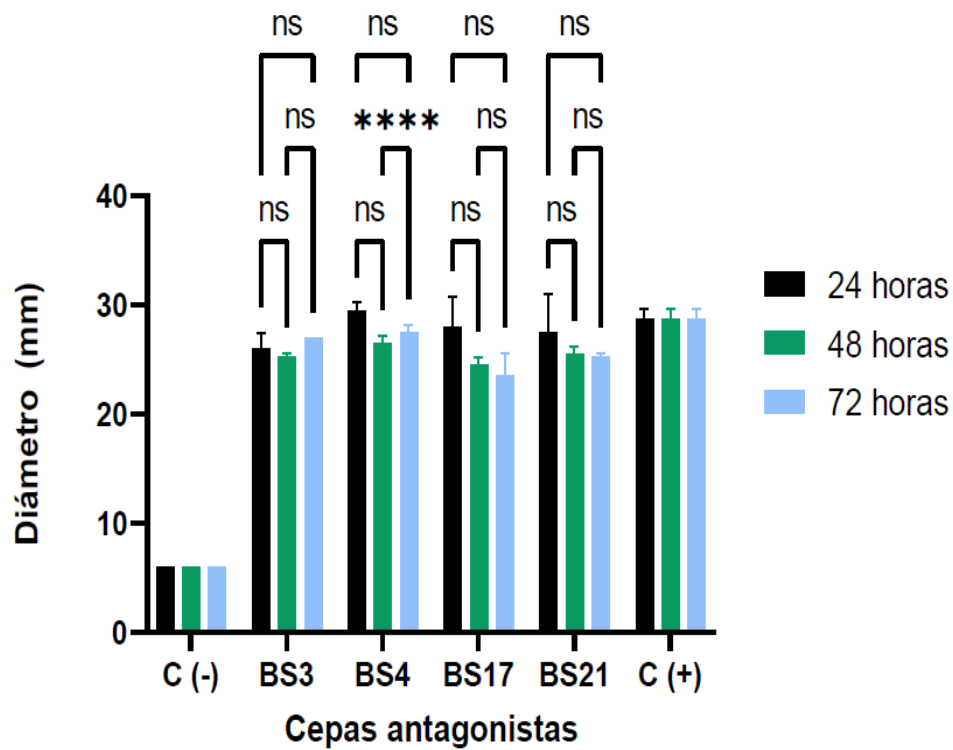


Fig 21. Actividad antagonista del cultivo bacteriano de las cepas de *Bacillus* contra *E. coli* ATCC 25922 a las 24, 48 y 72 horas de incubación. Las barras representan el promedio \pm desviación estándar de las medidas de los halos de inhibición en milímetros obtenidos de tres repeticiones independientes. La comparación se realizó entre los tres tiempos de incubación de cada cepa. Barra con significancia estadística denotada como **** ($p \leq 0.0001$) usando la prueba de comparación múltiple de Tukey en ANOVA. Denotación 'ns' representa valores no significativos.

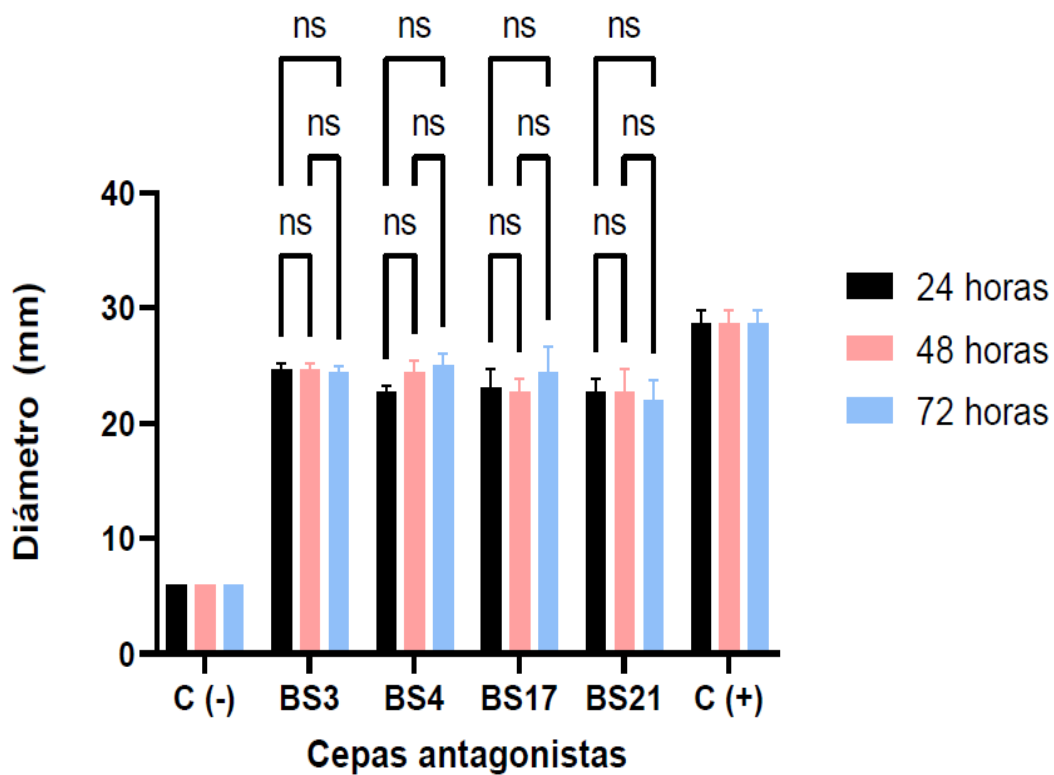


Fig 22. Actividad antagonista del sobrenadante libre de células de las cepas de *Bacillus* contra *E. coli* ATCC 25922 a las 24, 48 y 72 horas de incubación. Las barras representan el promedio \pm desviación estándar de las medidas de los halos de inhibición en milímetros obtenidos de tres repeticiones independientes. La comparación se realizó entre los tres tiempos de incubación de cada cepa. Barras denotadas como ns ($p > 0.05$) representa valores no significativos usando la prueba de comparación múltiple de Tukey en ANOVA.