

Estandarización de un protocolo de extracción para la obtención de metabolitos antimicrobianos producidos en fermentación sólida por un aislado nativo de Streptomyces sp. usando avena y ñame morado como sustrato

P09

Adan Bozziere¹, Charlotte Parabavide², Víctor Osorio³.

1. Estudiante de Ingeniería Biotecnológica. Universidad Francisco de Paula Santander. 2. Estudiante de Biotecnología. Facultad de Ciencias de la Salud, I.U. Colegio Mayor de Antioquia. 3. Docente Biotecnología.

INTRODUCCIÓN

Streptomyces es un género de bacterias Gram-positivas con importancia clínica e industrial debido a su capacidad para producir enzimas hidrolíticas y metabolitos con propiedades antimicrobianas, antioxidantes y anticancerígenas.

Aunque actualmente se estudia la producción de antimicrobianos por cultivos de Streptomyces en cultivos en fase sólida, en estos se obtienen caldos o sobrenadantes libres de células que contienen los compuestos de interés, pero también otros metabolitos como nutrientes no consumidos que dificultan la medición de la actividad y que deben separarse si se busca purificar el antibiótico deseado.



Figura 1. Cultivo de Streptomyces S40 en A. Agar MYE, B. en FES sobre avena/ñame

OBJETIVO

General. Establecer una metodología para la recuperación de compuestos con actividad antimicrobiana procedentes de extractos crudos obtenidos de procesos de fermentación en estado sólido con un aislado nativo del género Streptomyces.

Específicos.

- 1. Determinar el efecto de la proporción sobrenadante:solvente sobre el rendimiento de extracción y la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos por cultivo de Streptomyces sp. en estado sólido.
- 2. Determinar el efecto del tiempo de contacto con diferentes solventes sobre la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos.

Bibliografía

- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., & van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1-43.

- Lozada Tonato, H. O. (2018). Análisis químico mediante técnicas cromatográficas y espectroscópicas del antibiótico producido por los géneros *Stenotrophomonas* y *Burkholderia* aislados de muestras de suelo. (Tesis de pregrado). Universidad Politécnica Salesiana.

- Xu, X.Y., Song, Z.W., Yin, Y.C., Zhong, F.G., Song, J.Y., Huang, J.C., Ye, W.L. and Wang, P. (2021) Solid-State fermentation production of chitosanase by *Streptomyces* with waste mycelia of *Aspergillus niger*. *Advances in Enzyme Research*, 9, 10-18.

- Gebreyohannes, G., Moges, F., Sahile, S., & Raja, N. (2013). Isolation and characterization of potential antibiotic producing actinomycetes from water and sediments of Lake Tana, Ethiopia. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(6), 426–435.

- Kurnianto, M. A., Kusumaningrum, H. D., & Lioe, H. N. (2020). Characterization of *Streptomyces* isolates associated with estuarine fish *Chanos chanos* and profiling of their antibacterial metabolites-crude-extract. *International Journal of Microbiology*, 2020, 1–12.

METODOLOGÍA

1. Microorganismo



Streptomyces sp. aislado de un sistema de compostaje de IUCMA

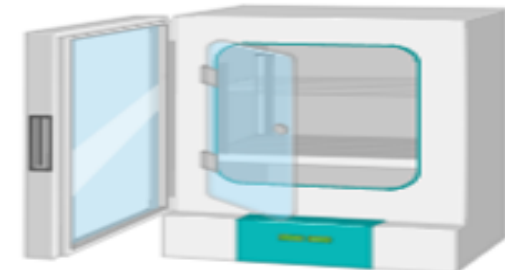
2. Fermentación sólida



Inóculo McFarland 8 24x10⁸ UFC/ml

75 %avena
25% ñame

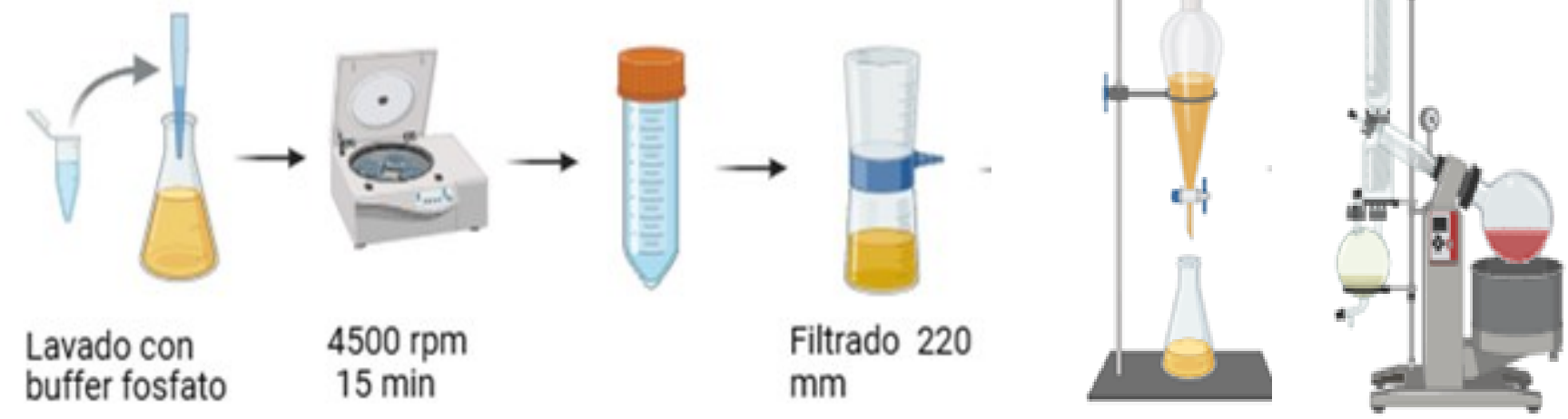
Sales



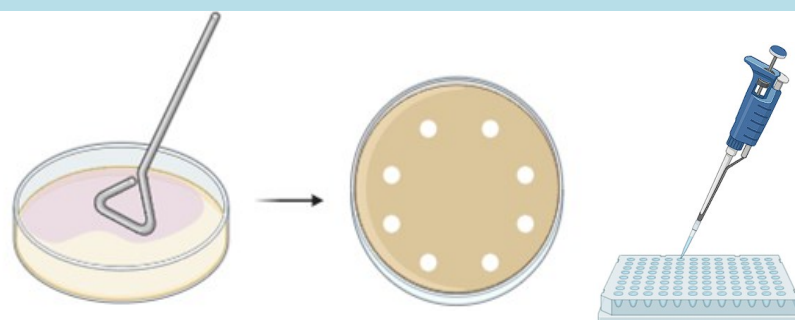
Incubación:

- Humedad 70%
- 10 días a 26°C - 28°C
- pH 7 inicial

3. Extracción



5. Actividad antimicrobiana



Difusión en disco y placa de 96 pozos
Medio de cultivo: LB
Testigos: *E. coli* 23923 y *S. aureus* 23924
Incubación: 37°C – 24 horas

6. Análisis estadístico



Optimización de parámetros y modelamiento

4. Diseño experimental

Nº Ensayo	Volumen solvente (mL)	Tiempo de contacto (h)	Solvente
1	200	10	Diclorometano
2	200	10	Etil acetato
3	200	10	Butanol
4	200	10	Etil acetato
5	200	10	Etil acetato
6	300	10	Diclorometano
7	300	2	Etil acetato
8	300	18	Etil acetato
9	250	10	Diclorometano
10	250	2	Butanol
11	100	14	Etil acetato
12	200	2	Diclorometano
13	250	18	Diclorometano
14	200	14	Diclorometano
15	150	10	Etil acetato
16	250	2	Butanol
17	200	18	Etil acetato
18	250	6	Diclorometano
19	100	10	Diclorometano
20	200	14	Diclorometano
21	200	10	Etil acetato

Variables respuesta:
% Inhibición, Diámetro halo

DCC con superficie de respuesta.

Factores:

- Tipo de solvente (Categórica)
- Tiempo de contacto (Continua)
- Proporción sobrenadante: extracto (Continua)

RESULTADOS PRELIMINARES

1. Efecto de la relación sobrenadante:solvente

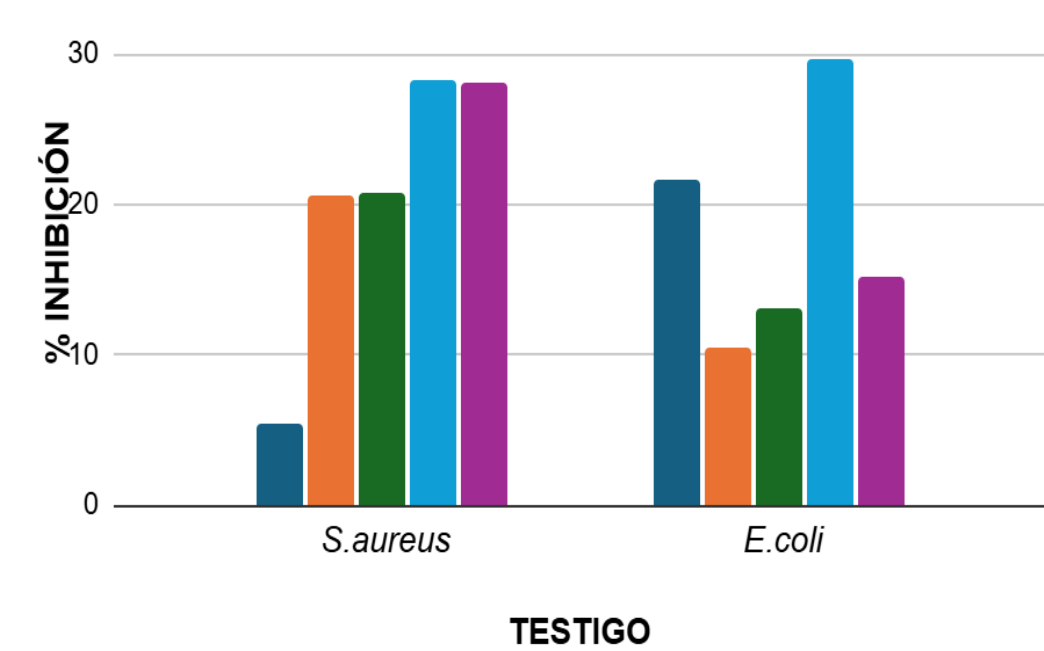


Figura 2. Inhibición de los extractos obtenidos con diferentes volúmenes de solvente. Volumen inicial de sobrenadante: 100 ml.

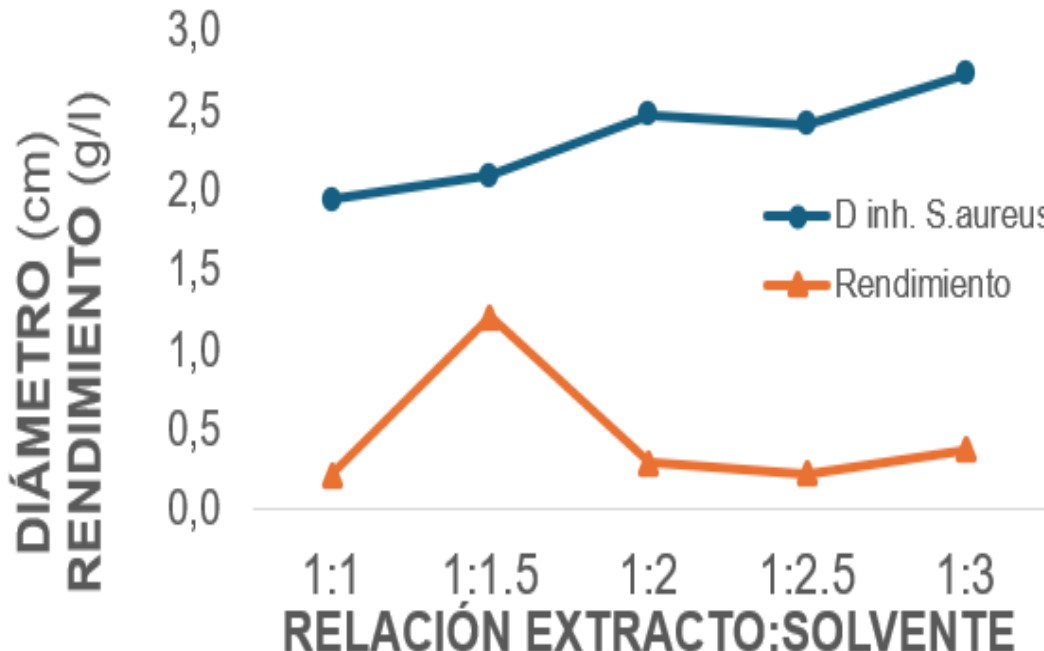


Figura 3. Diámetros halos de inhibición y rendimientos de extracción con diferentes relaciones sobrenadante: solvente.

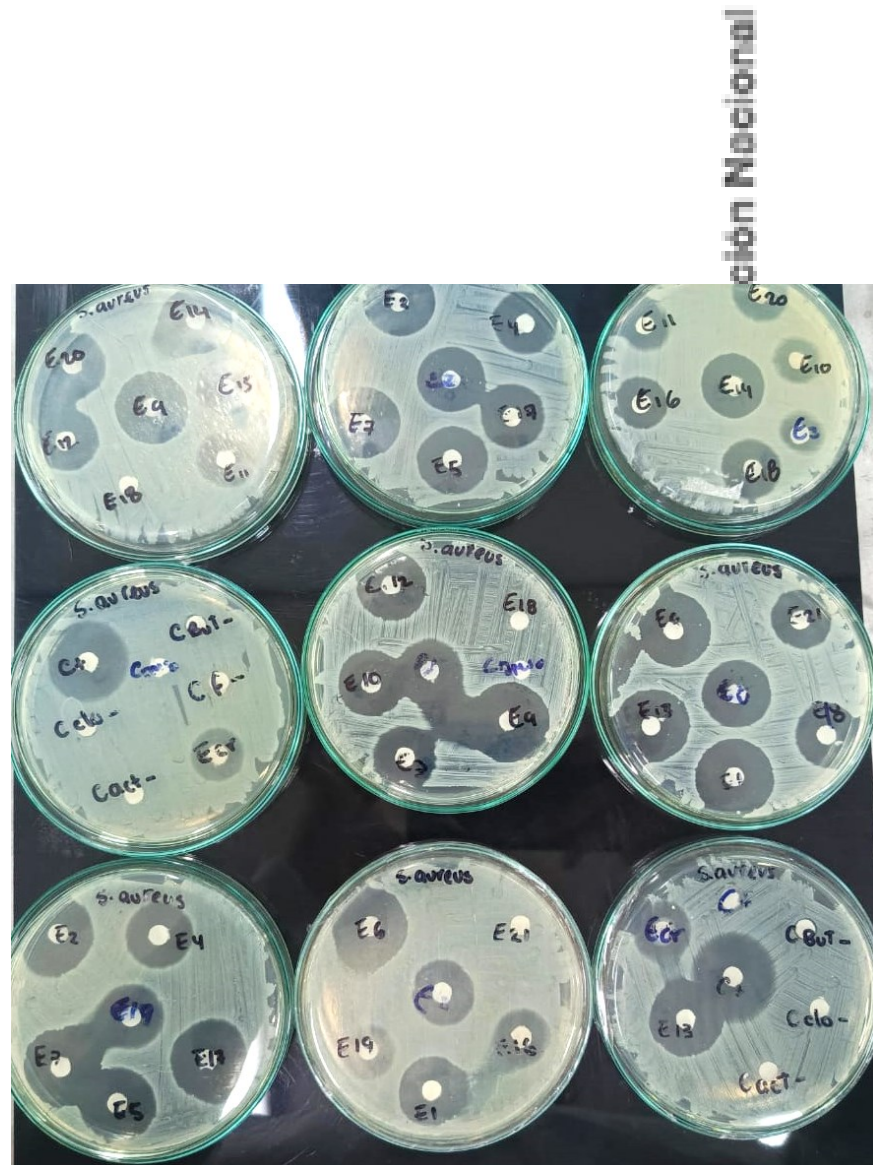


Figura 8. Ensayos de Difusión en discos para determinar inhibición de S. aureus

2. Efecto del tiempo de contacto

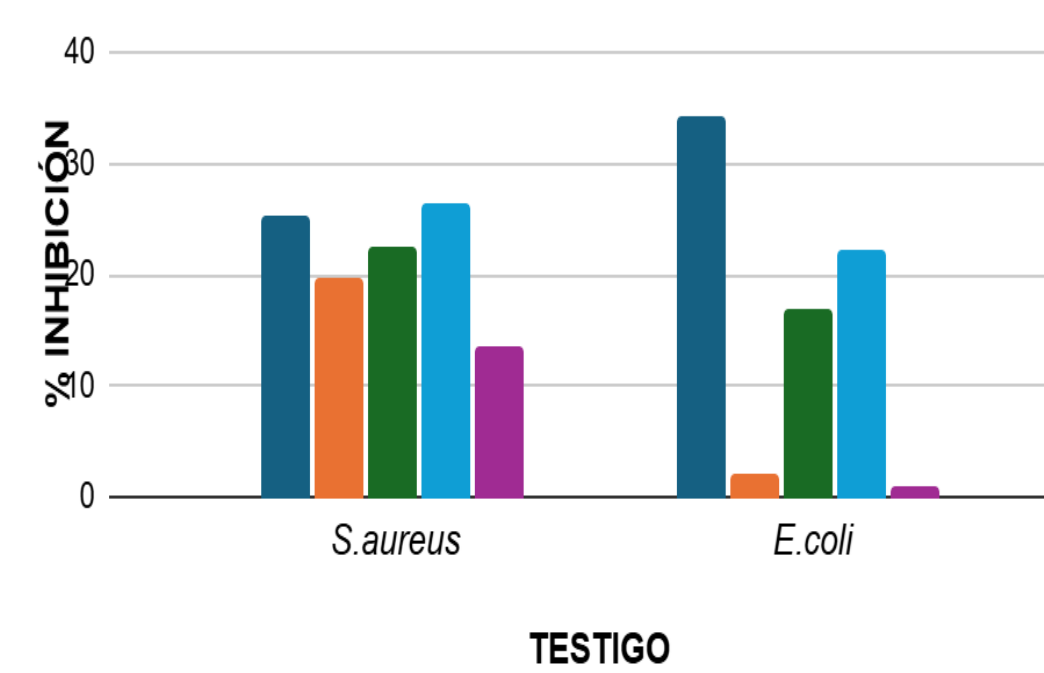


Figura 4. Inhibición de los extractos obtenidos con diferentes tiempos de contacto en el proceso de extracción.

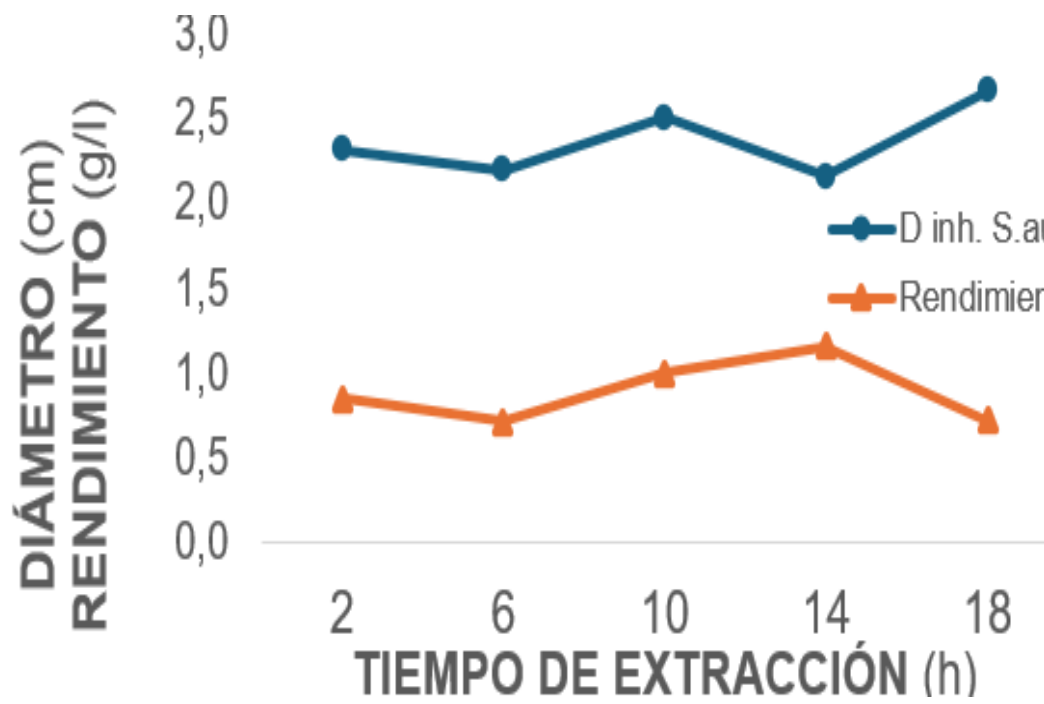


Figura 5.. Diámetros halos de inhibición y rendimientos de extracción con diferentes tiempos de extracción.

3. Efecto del solvente

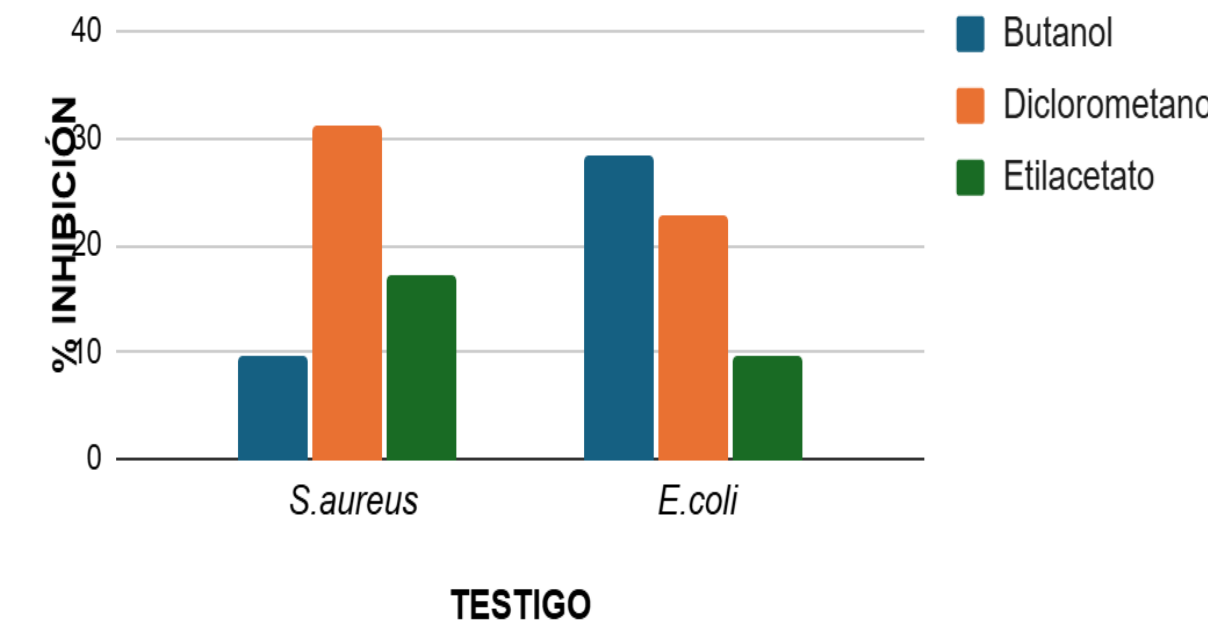


Figura 6.. Inhibición de los extractos obtenidos con diferentes solventes

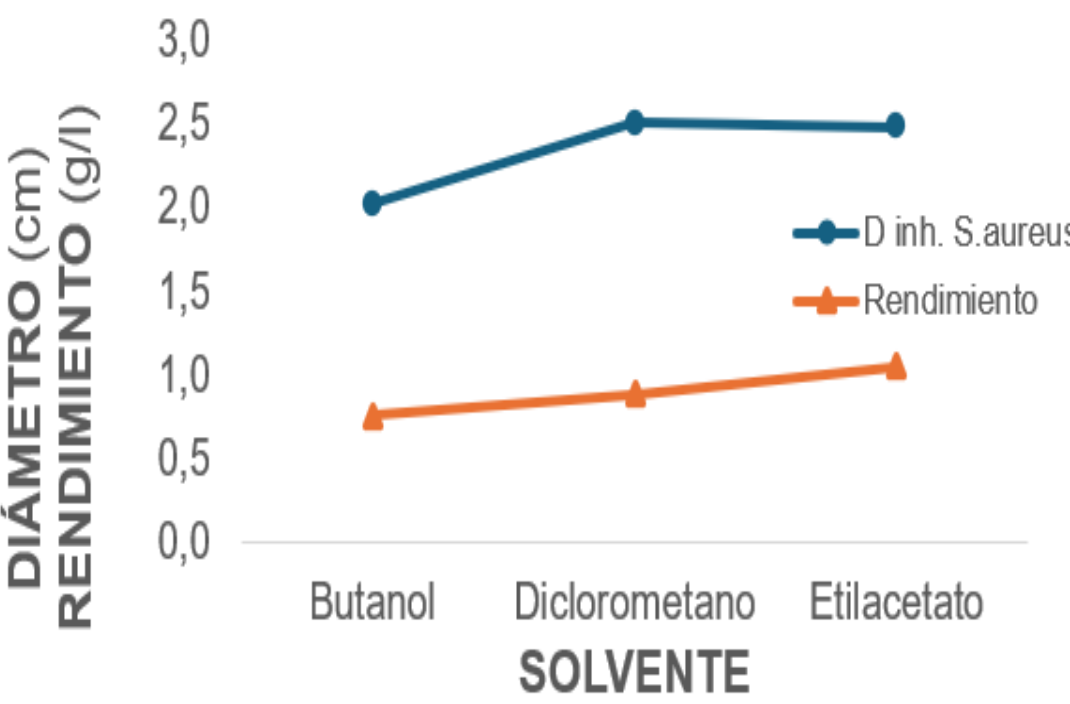


Figura 7.. Diámetros halos de inhibición y rendimientos de extracción obtenidos con diferentes solventes.

CONCLUSIONES

Los resultados preliminares muestran que puede haber un efecto de la proporción usada de solvente sobre la actividad antimicrobiana, pero no es claro el efecto del tiempo de contacto. Parece que no hay un efecto de los factores evaluados sobre el rendimiento de extracción.

No es claro el efecto del solvente sobre las variables evaluadas.

Se espera que el análisis estadístico respalde el cumplimiento total de los objetivos.

