



UNIVERSITAT DE BARCELONA



UNIVERSITAT DE BARCELONA  
FACULTAT DE FARMÀCIA  
Departament de Microbiologia i  
Parasitologia Sanitàries



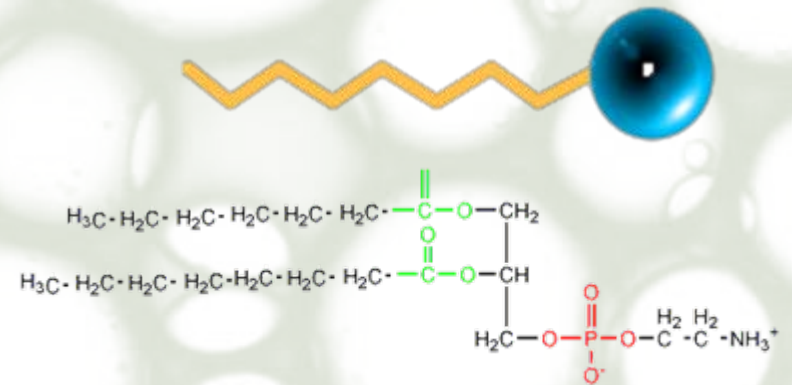
# **Búsqueda e Identificación de Nuevos Biotensioactivos de Origen Bacteriano**

**CÉSAR BURGOS DÍAZ  
OCTUBRE DE 2011**

# INTRODUCCION

# Los Tensioactivos

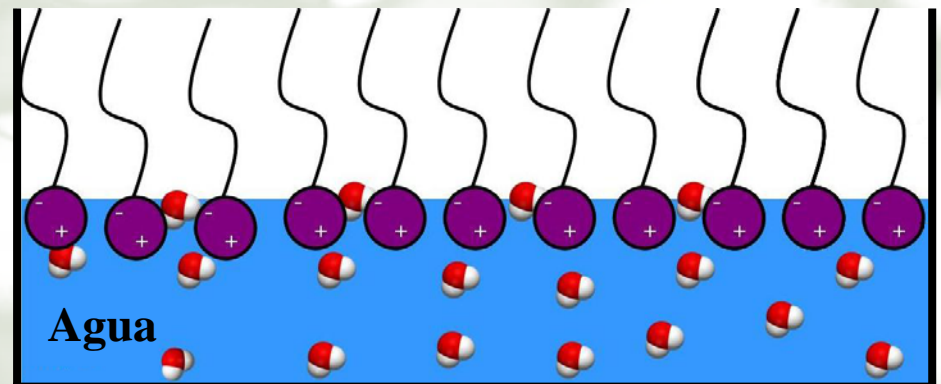
Los tensioactivos son moléculas anfipáticas que se acumulan en las interfases provocando un descenso de la tensión superficial. A concentraciones altas estas moléculas forman agregados como las micelas.



Aire

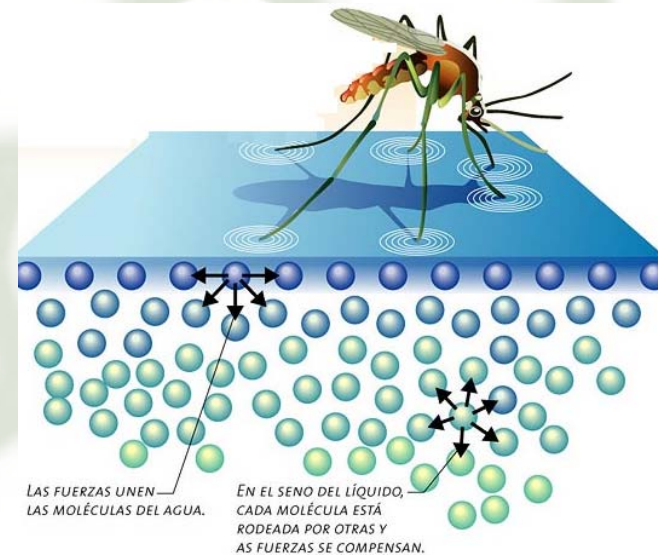
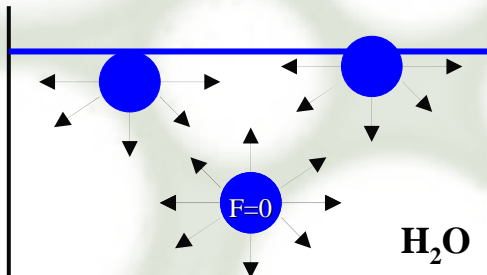
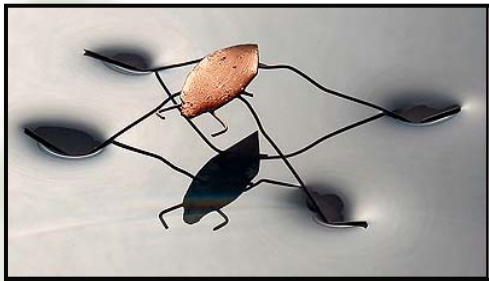
Cola hidrofóbica (apolar)

Cabeza Hidrofilica (polar)



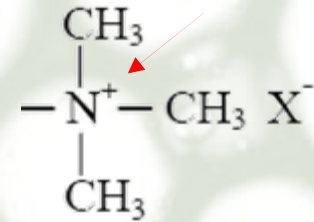
# Tensión superficial

- Las fuerzas intermoleculares de cualquier líquido, hacen que la superficie de este se comporte como si existiera una membrana de tensión que es difícil de romper.
- La cantidad de energía necesaria para romper esta membrana de tensión por unidad de área es lo que se conoce como **Tensión Superficial**. Esta definición implica que el líquido presenta una resistencia para aumentar su superficie. Es por esto, que se genera un especie de membrana a tensión en la capa exterior del líquido.



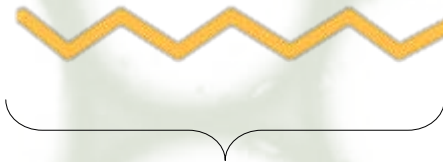
# Clasificación de los Tensioactivos

- Tensioactivos cationicos



Sales de alquitrilamonio

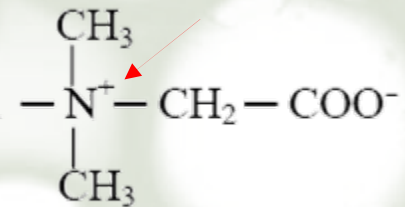
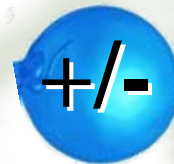
- Tensioactivos aniónicos



Cola hidrofobica

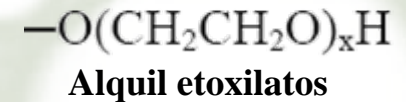


- Tensioactivos anfoteris



Alquil beteínas

- Tensioactivos no-ionicos



Cabeza hidrofílica



## Problemas de la utilización de los tensioactivos químicos

Los tensioactivos químicos presentan una alta resistencia a la degradación por microorganismos y alta toxicidad cuando se acumulan en el medio ambiente.

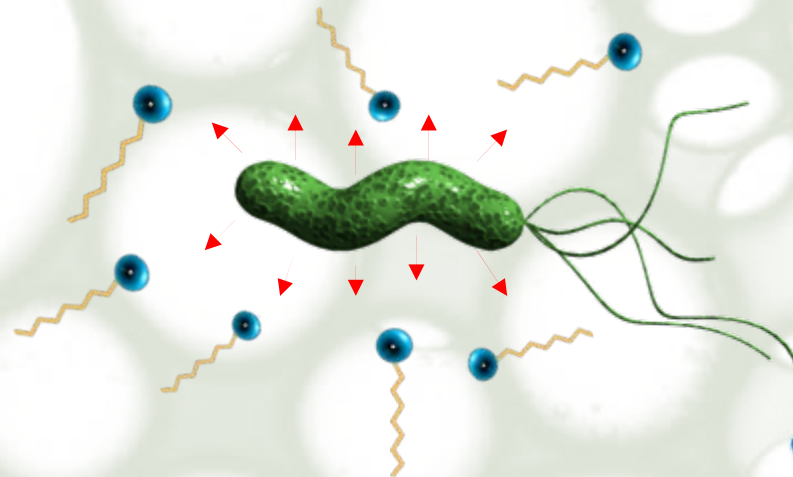


**Tensioactivos de origen químico**



## Problemas de la utilización de los tensioactivos químicos

Los tensioactivos químicos presentan una alta resistencia a la degradación por microorganismos y alta toxicidad cuando se acumulan en el medio ambiente.

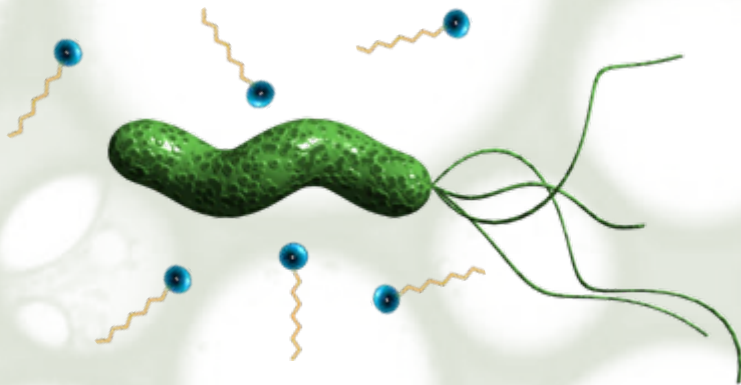


**Biotensioactivos (BT)**  
(Origen biológico)



## Biotensioactivos (BT)

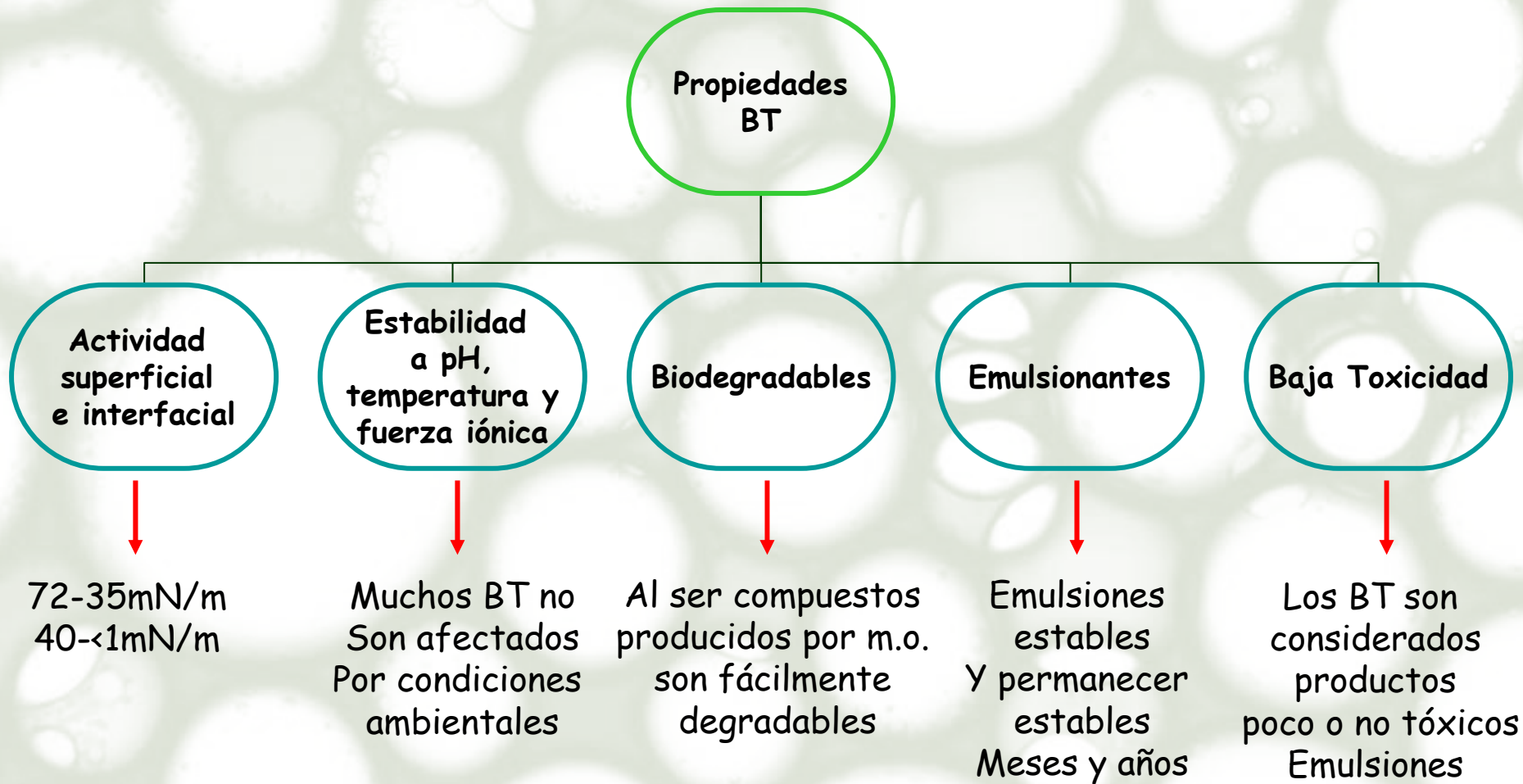
Existen microorganismos (bacterias, hongos y levaduras) que son capaces de sintetizar tensioactivos a los cuales se les denomina Biotensioactivos (BT).



Microorganismo	Biotensioactivo
<i>Pseudomonas sp.</i>	<b>Ramnolipidos</b>
<i>Mycobacterium sp.</i> <i>Corynebacterium sp.</i>	<b>Trealosa lípidos</b>
<i>Bacillus sp.</i> <i>Mycobacterium sp.</i> <i>Corynebacterium sp.</i>	<b>Lipopeptidos</b>
<i>Torulopsis sp.</i>	<b>Soforolipidos</b>
<i>Candida Sp.</i> <i>Corynebacterium sp.</i> <i>Micrococcus sp.</i>	<b>Fosfolipidos</b>
<i>Pseudomonas sp.</i> <i>Micrococcus sp.</i> <i>Penicillium sp.</i> <i>Aspergillus sp.</i> <i>Candida Sp.</i>	<b>Acidos grasos</b>



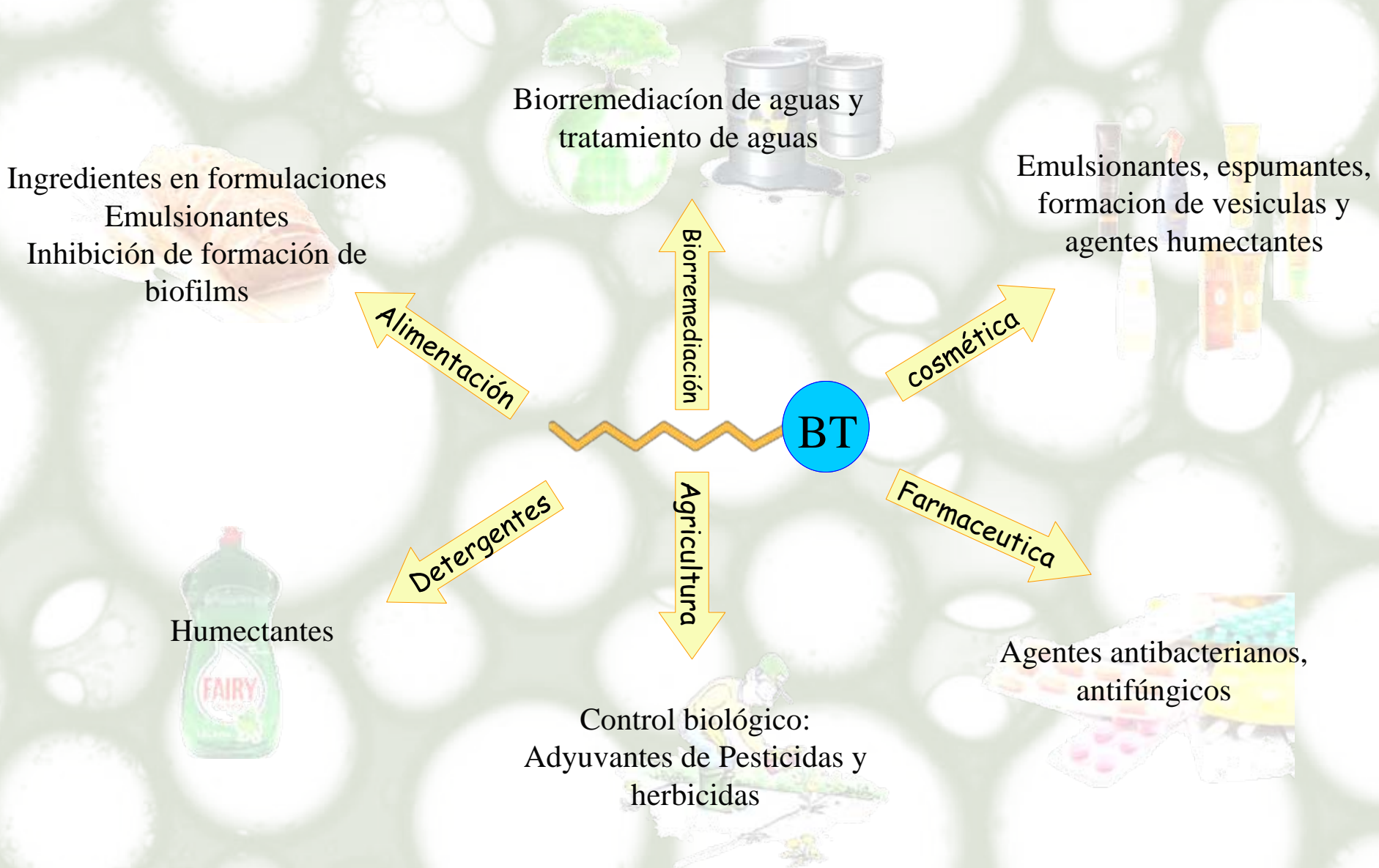
# Propiedades de los Biotensioactivos



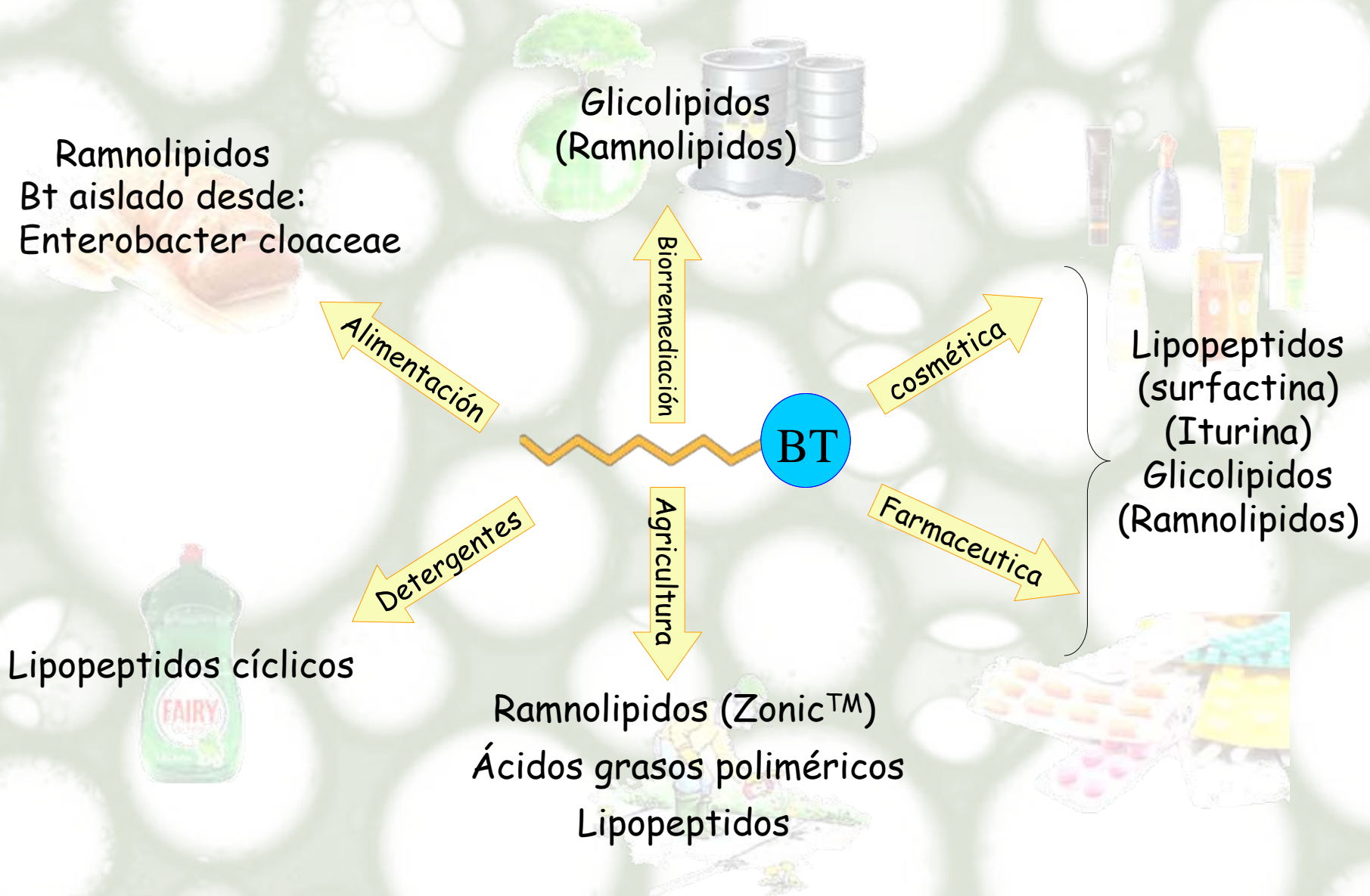
# Potenciales aplicaciones de los Biotensioactivos



# Potenciales aplicaciones de los Biotensioactivos

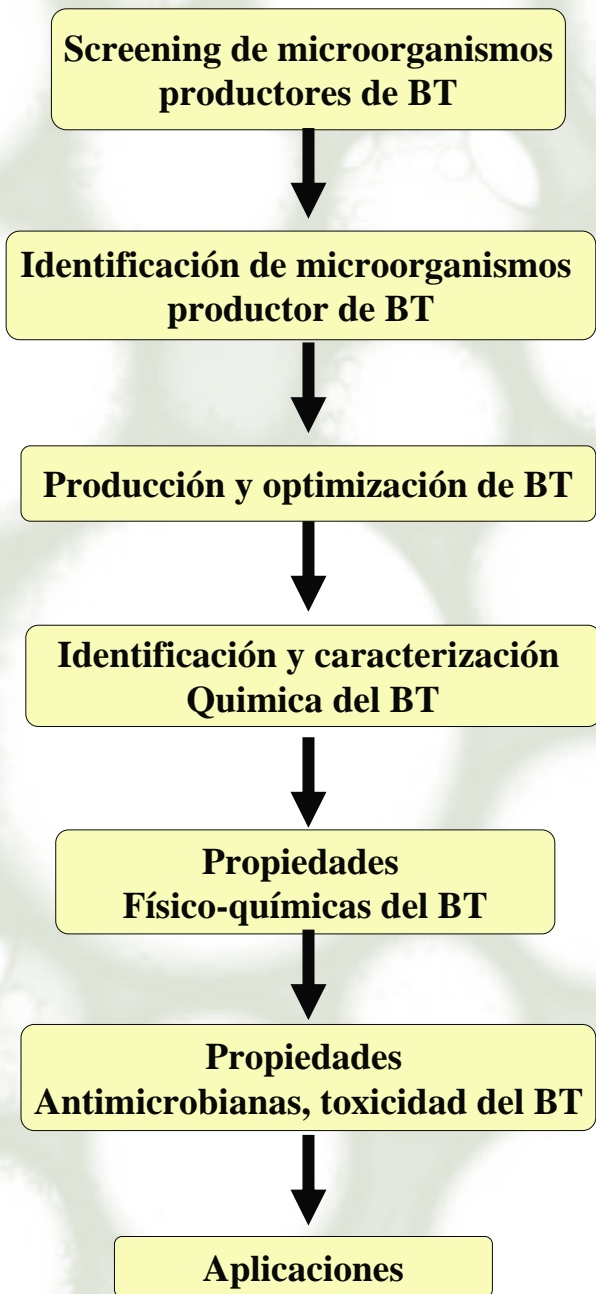


# Potenciales aplicaciones de los Biotensioactivos



## Función biológica de los biotensioactivos

- Capacidad para emulsionar y solubilizar nutrientes insolubles (hidrocarburos, lípidos, aceites) en fases acuosas.
- Facilitar el transporte de los nutrientes a nivel de membrana.
- Movilidad
- Comunicación célula-célula y formación de biofilm
- Actividad antibiótica



Esquema experimental para  
búsqueda, identificación de  
nuevos Biotensioactivos de  
origen bacteriano

Screening de microorganismos productores de BT



Identificación de microorganismos productor de BT



Producción y optimización de BT



Identificación y caracterización Química del BT



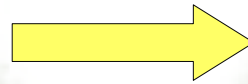
Propiedades Físico-químicas del BT



Propiedades Antimicrobianas, toxicidad del BT



Aplicaciones

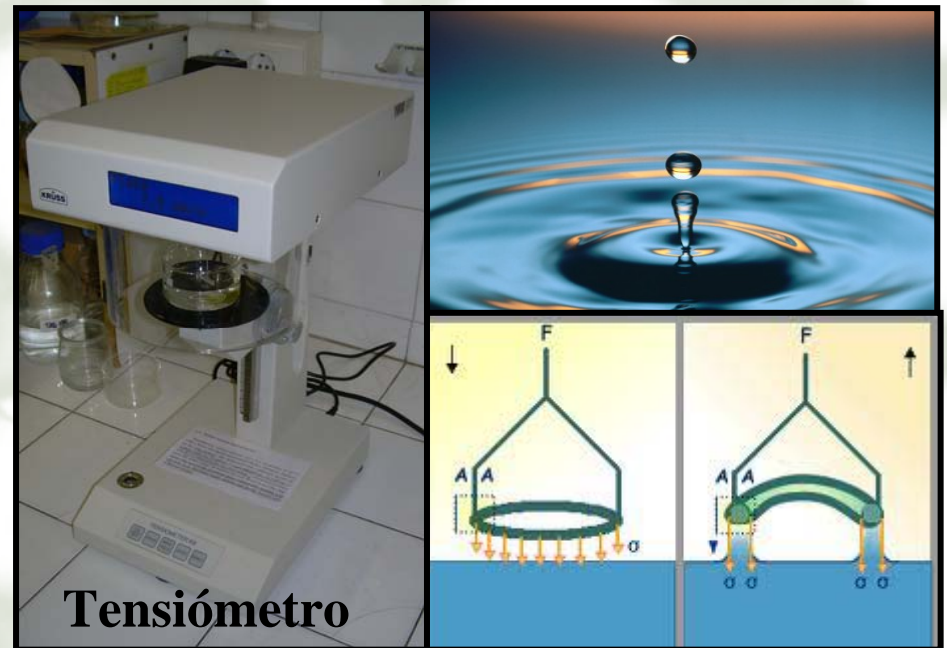


• Medidas de tensión superficial e interfacial del sobrenadante.

• Técnica del colapso de la gota

• Técnica de Oil Spreading

• Hemólisis



Screening de microorganismos  
productores de BT



Identificación de microorganismos  
productores de BT



• **Microbiología clásica.**  
(Gram, pruebas bioquímicas, API)

• **Biología Molecular**  
(RNA16S, otros genes de interés)

Producción y optimización de BT



Identificación y caracterización  
Química del BT



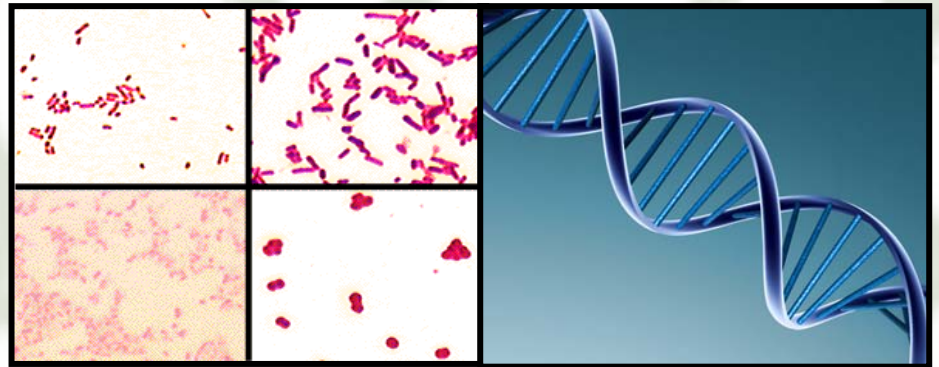
Propiedades  
Físico-químicas del BT

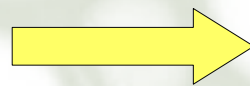
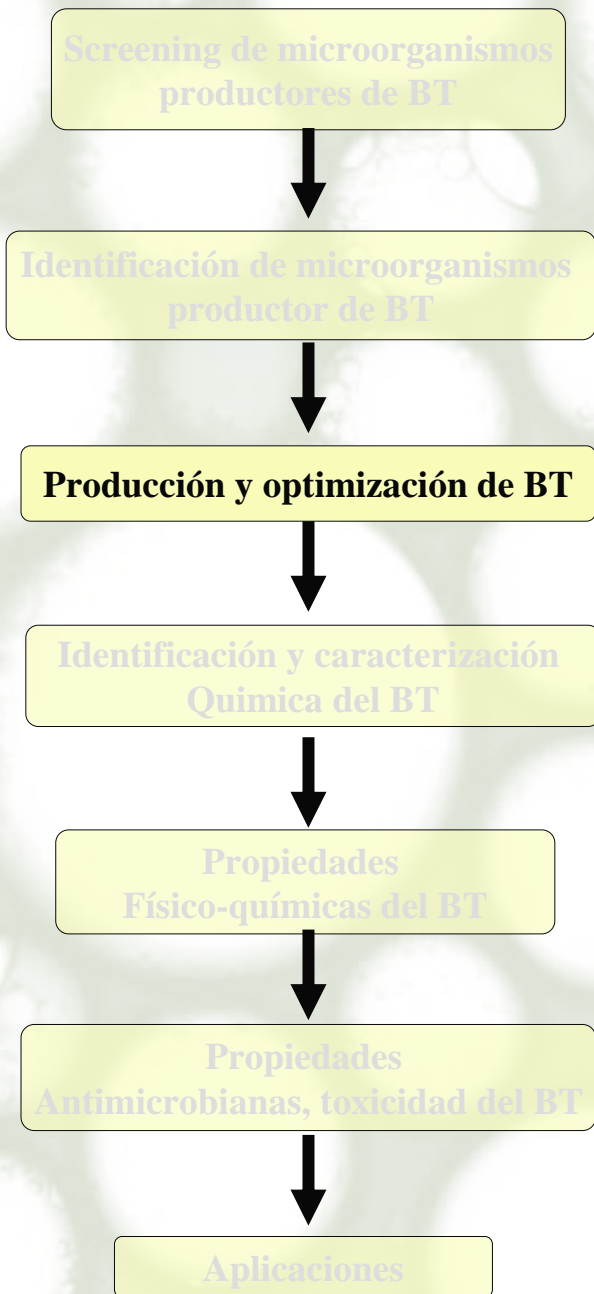


Propiedades  
Antimicrobianas, toxicidad del BT

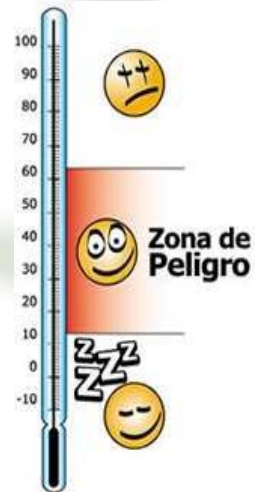


Aplicaciones





- **Concentraciones óptimas de los componentes del medio.**
- **Condiciones ambientales**
- **Ensayos en matraz y biorreactor**



Screening de microorganismos  
productores de BT



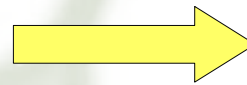
Identificación de microorganismos  
productores de BT



Producción y optimización de BT



Identificación y caracterización  
Química del BT



TLC, RMN, IR, HPLC



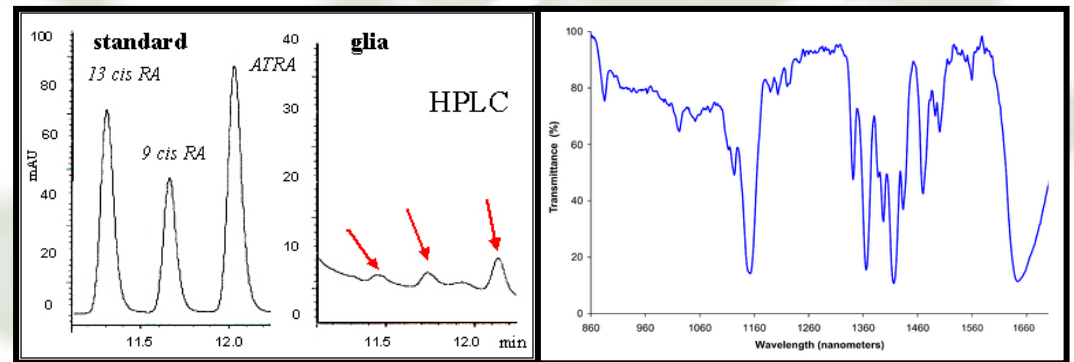
Propiedades  
Físico-químicas del BT

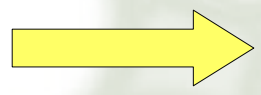
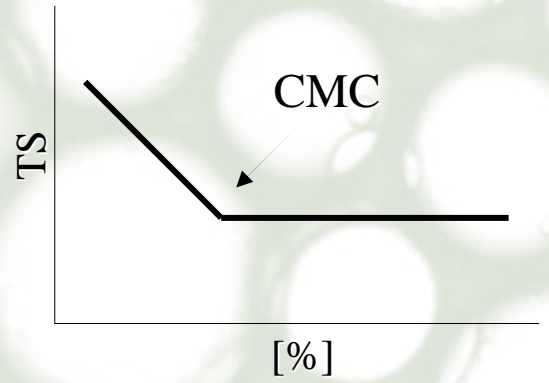
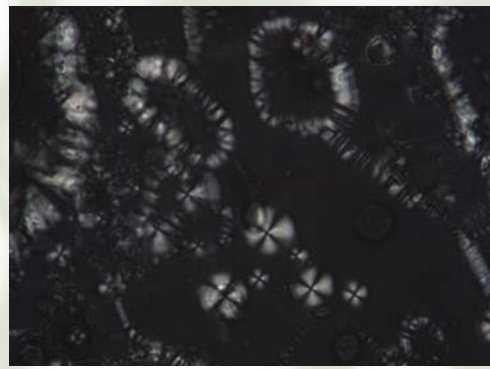
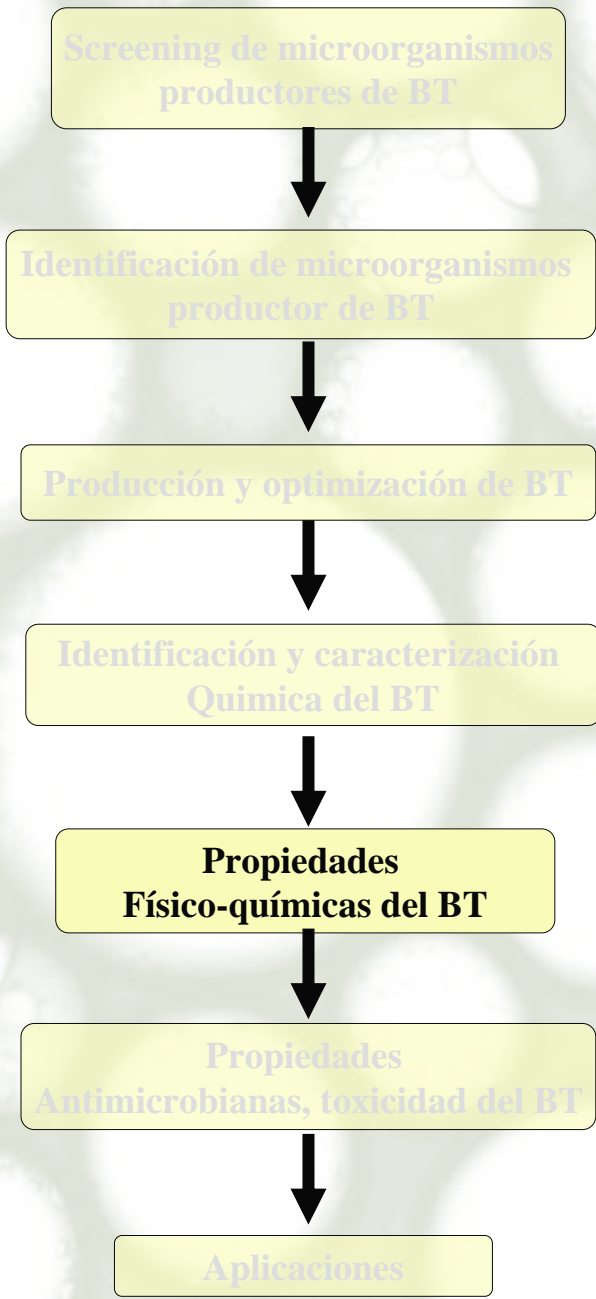


Propiedades  
Antimicrobianas, toxicidad del BT



Aplicaciones





- **CMC**
- **Capacidad emulsionante**
- **Estabilidad al PH, T°**
- **Efecto fuerza ionica**
- **Formación de cristales líquidos**

Screening de microorganismos  
productores de BT



Identificación de microorganismos  
productores de BT



Producción y optimización de BT



Identificación y caracterización  
Química del BT



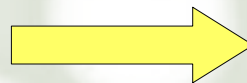
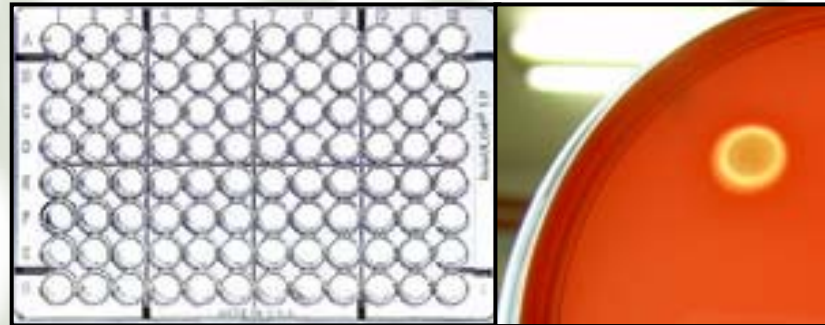
Propiedades  
Físico-químicas del BT



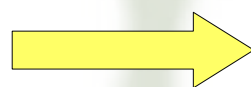
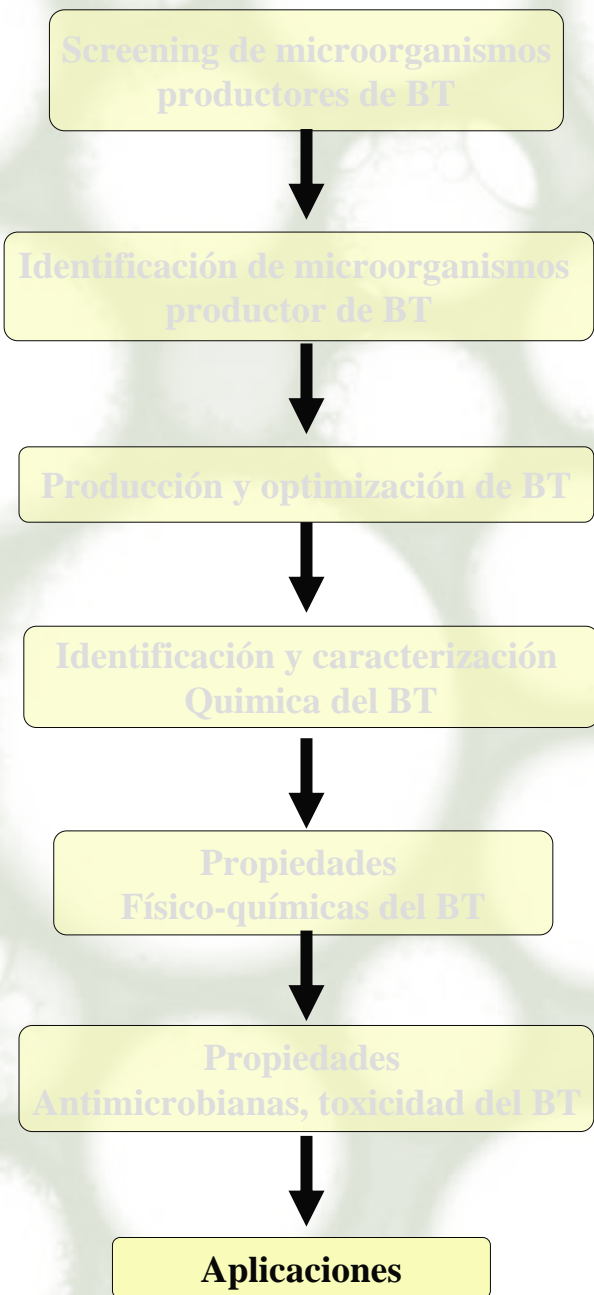
**Propiedades  
Antimicrobianas, toxicidad del BT**



Aplicaciones



• CMI, Hemólisis etc...



**Alimentación, cosmética, farmacia, biorremediación**

# OBJETIVOS

## BUSQUEDA DE NUEVOS BIOTENSIOACTIVOS

- Aislamientos e identificación de microorganismos procedentes de muestras ambientales.
- Estudiar la producción de biotensioactivos de las cepas aisladas utilizando diferentes fuentes de carbono ( $C_{12}$ , aceite de oliva, glicerol y glucosa).
- Determinar las mejores condiciones de cultivo para la producción del biotensioactivo.
- Estudiar y caracterizar químicamente el biotensioactivo.

# Capítulo I

Aislamientos, selección e  
identificación de microorganismos  
como productores de BT

# Aislamientos de bacterias a partir de Suelos volcánicos

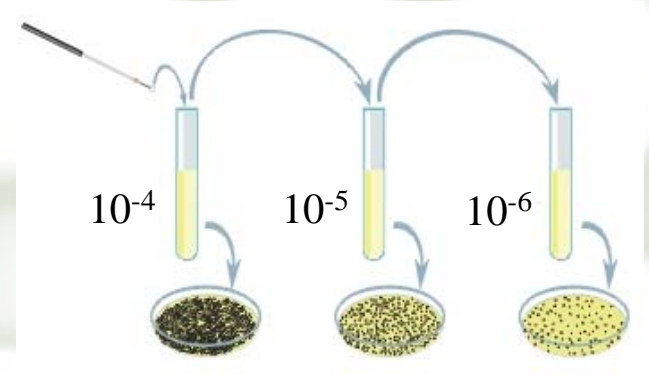


1g de Suelo

Sembrar



Diluciones



0,1 mL en placas de TSA y R2A

100 mL medio mineral (MM1):

- 0,5% citrato de sodio
- 0,5% C<sub>12</sub>
- 0,5% ext. levadura

(Se incuba a 30°C; agitador orbital por 7 días) (3veces)

Aislamiento

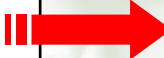


Cultivo puro

Gram, prueba de la oxidasa, catalasa, movilidad, O/F y crecimiento en McConkey

# Estudio de la Tensión Superficial de las cepas seleccionadas

## Resultados de los aislamientos

Tipo de Muestra	Cepas aisladas	Gram
Suelos Volcánicos (10 muestras)	54	31 (BGN) 
		19 (BGP)
		2 (CGP)
		2 levaduras

- Crecimiento en MM1 con C<sub>12</sub> (2%) (se incubó a 30°C)
- Centrifugar para eliminar células.
- Sobrenadante:
- Tensión superficial

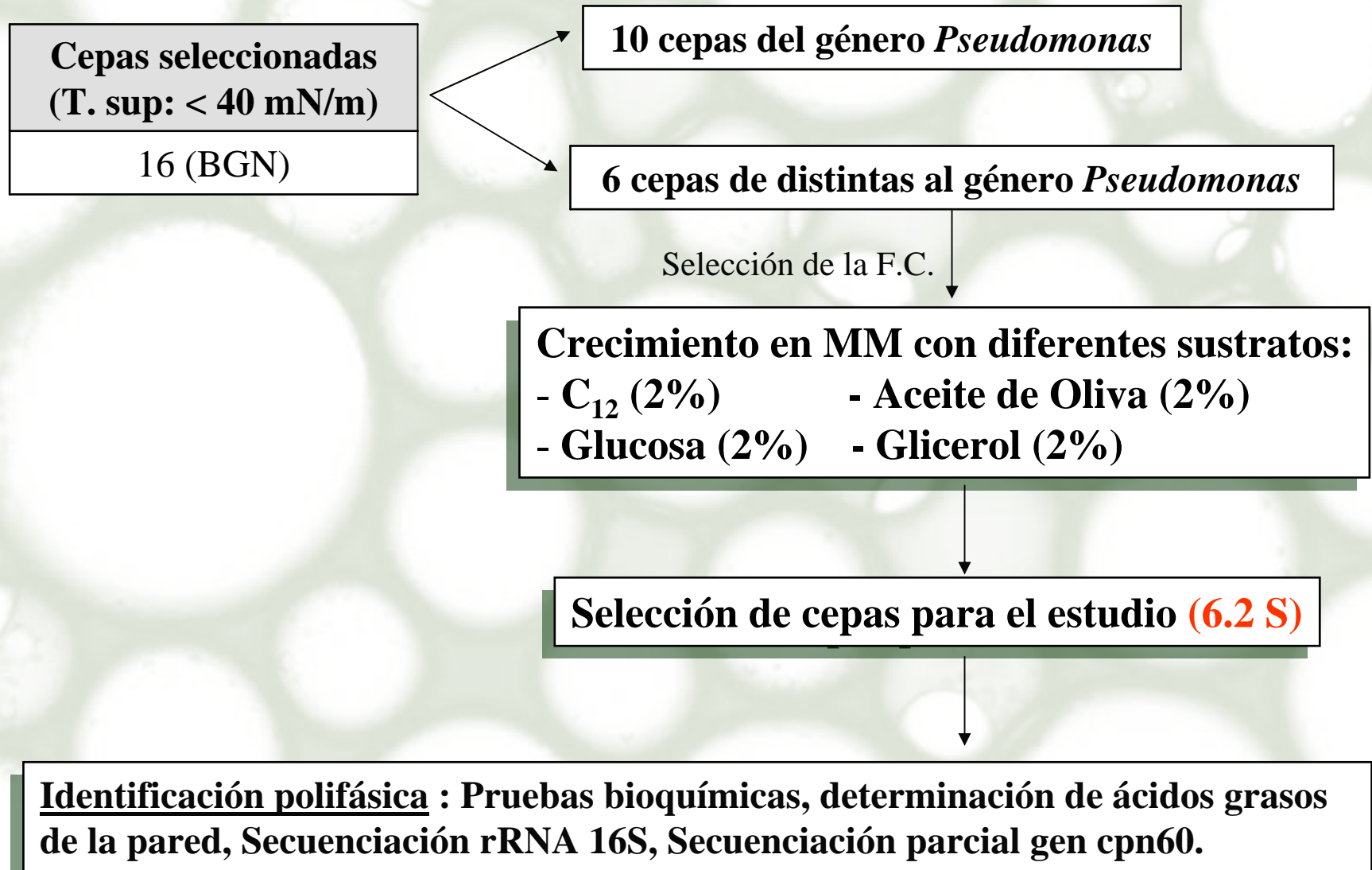
## Valores de Tensión Superficial de los microorganismos aislados



Cepas estudiadas	Cepas seleccionadas (T. sup: < 40 mN/m)
31 (BGN)	16 (BGN)

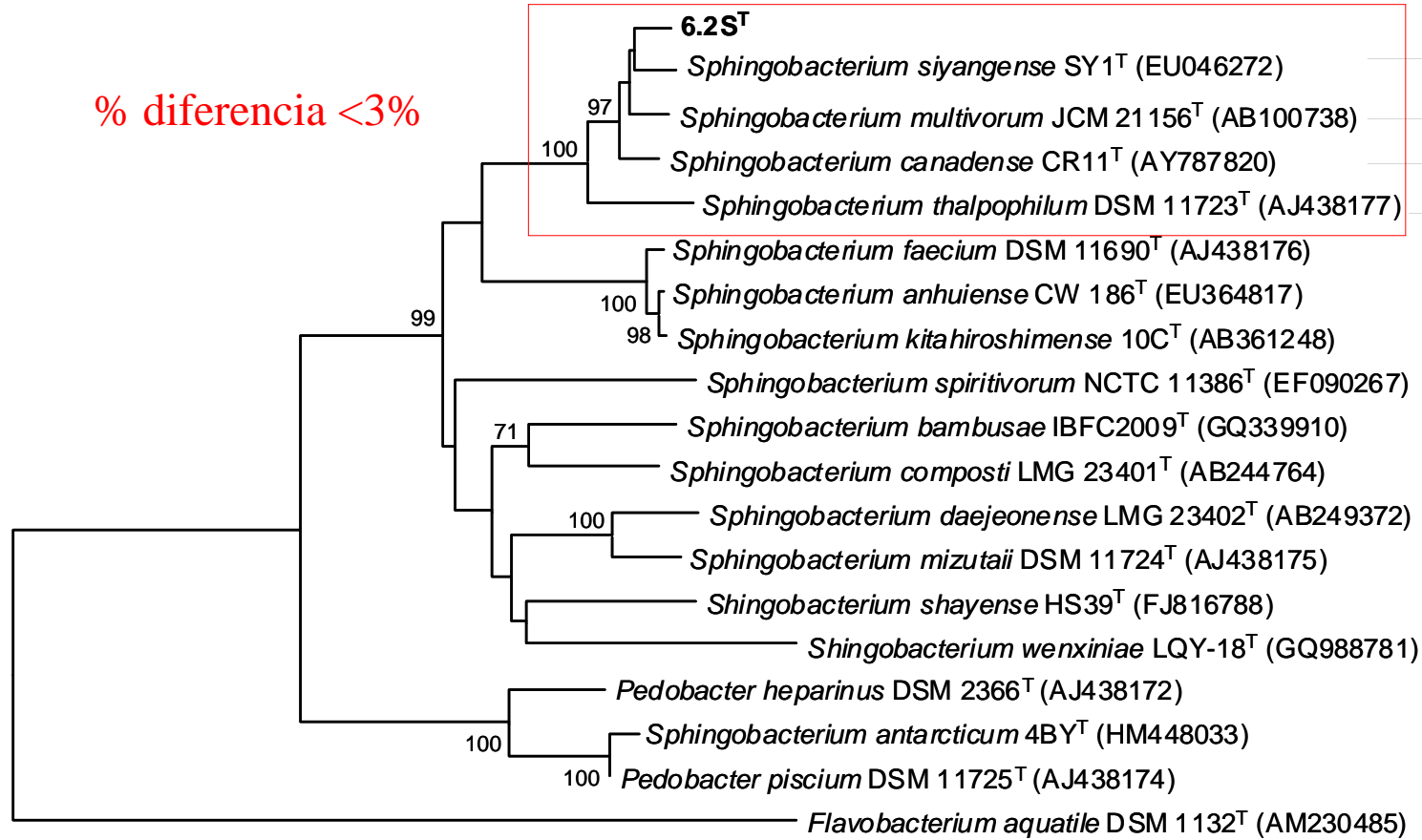
API 20 NE

## Selección de cepas para el estudio



# Secuenciación del RNA 16S

% diferencia <3%



Especies pertenecientes al mismo cluster

- ▶ 99%
- ▶ 98,6%
- ▶ 98,8%
- ▶ 97%

0.02

# Pruebas bioquímicas

cepas	<i>S. multivorum</i>	<i>S. siyangense</i>	<i>S. thalpopilum</i>	<i>S. canadense</i>	6.2 S
<b>Crecimiento en:</b>					
5°C	-	-	-	-	-
42°C	-	-	+	-	-
<b>Hidrólisis de:</b>					
DNA	+	+	+	+	+
Almidón	+	+	+	+	+
Esculina	+	+	+	+	+
Gelatina	-	-	+	+	+
Ureasa	+	+	+	+	+
Tween 80	-	-	-	-	-
<b>Asimilación de:</b>					
L-Ramnosa	+	+	+	+	+
L-Arabinosa	+	+	+(d)	+	+
D-Manitol	-	-	-	-	-
D-Melibiosa	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	-	-	+
Piruvato	-	-	-	-	-
L-Glutamato	-	-	-	-	-
L-Sorbitol	-	-	-	-	-
D-ribosa	-	-	-	-	-
Glucosa	+	+	+(d)	+	+
<b>Producción de ácido desde:</b>					
L-Ramnosa	-	-	-	-	-
L-Arabinosa	+	-	+	+	-
Sacarosa	+	+(d)	+	+	+(d)
D-Glucosa	+	+	+	+	+
D-Manitol	-	-	-	-	-
D-Melibiosa	-	-	-	+(d)	-
Sorbitol	-	-	-	-	-

## Diferencias:

← Crecimiento a 42°C

← Hidrólisis de la gelatina

← Asimilación de glicerol

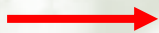
Producción de ácido desde:

← L-arabinosa

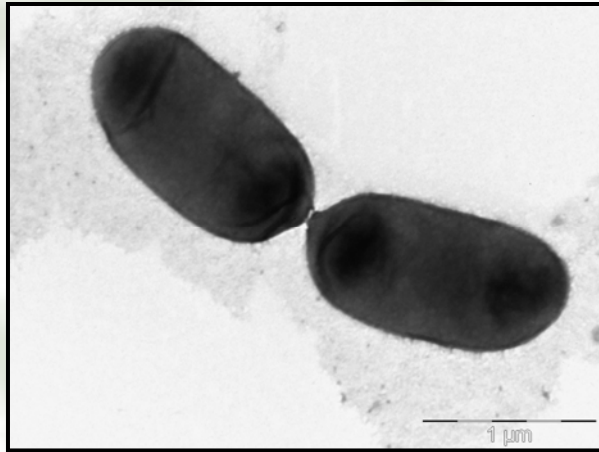
← D-melibiosa

## Antibiograma

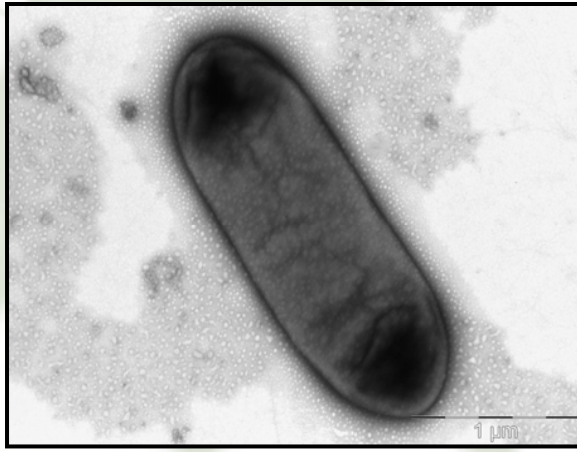
Antibiótico	Cepa 6.2S	<i>S.canadense</i>	<i>S.siyangense</i>	<i>S.multivorum</i>	<i>S.talpophilum</i>
Ampicilina (AM10)	R	R	R	S	R
Aztreonam (ATM30)	R	R	R	I	R
Cefalotina (CF30)	R	I	R	S	R
Cefoxitina (FOX30)	R	R	R	I	I
Ceftriaxona (CRO30)	S	S	S	S	I
Ciprofloxacina (CIP5)	I	S	S	S	S
Cloranfenicol (C30)	R	S	S	I	R
Eritromicina (E15)	R	R	I	I	R
Estreptomina (S10)	R	R	R	S	R
Gentamicina (GM10)	R	R	R	I	R
Imipenem (IMP10)	S	S	R	S	S
Tetraciclina (TE30)	R	R	S	S	I
Ticarcilina (TIC75)	I	R	R	S	R
Diferencias	---	3	5	11	4



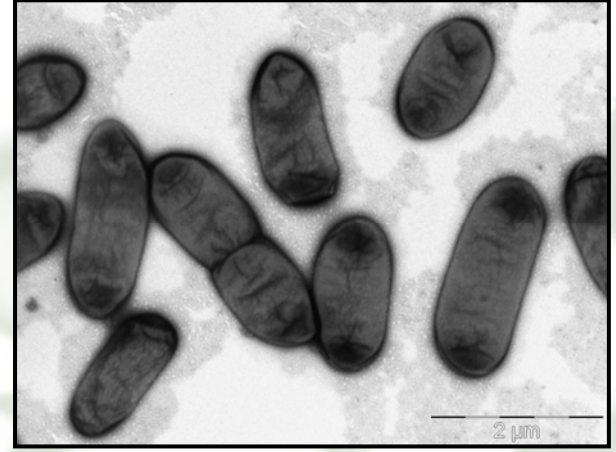
*“Sphingobacterium detergens”*



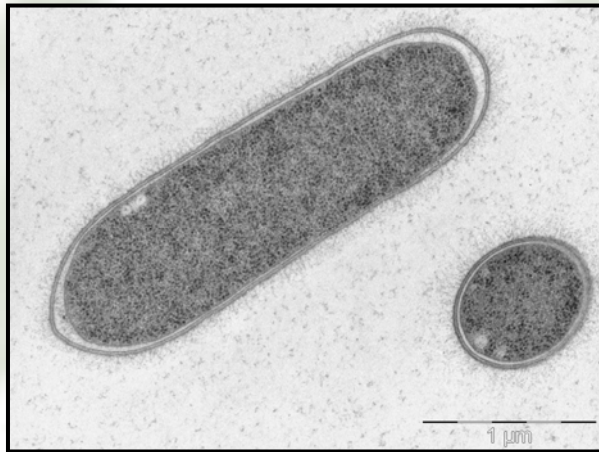
a)



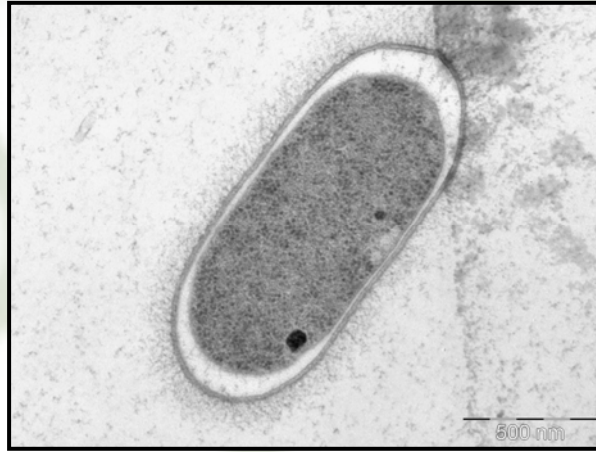
b)



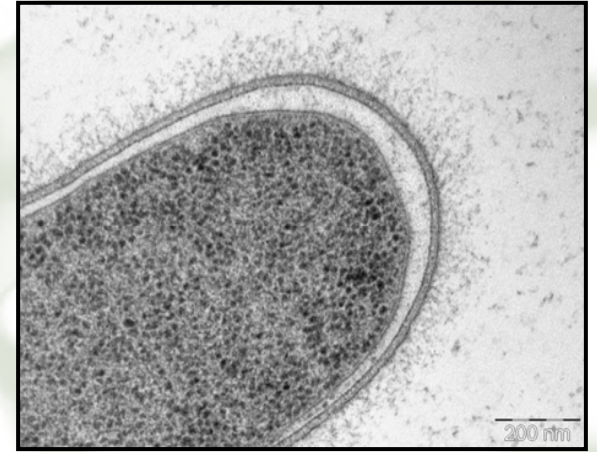
c)



d)



e)



f)

## Capítulo II

# Optimización de la Producción del Nuevo BT

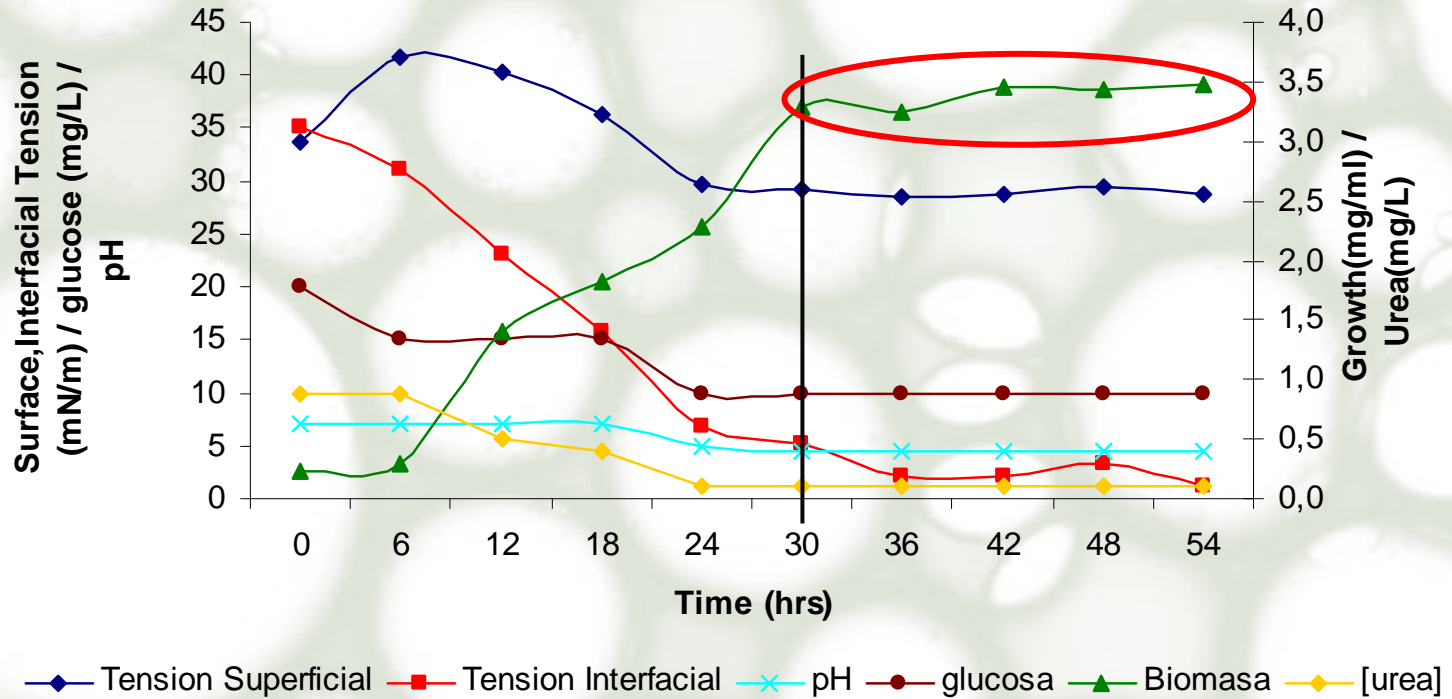
## Composición medio de cultivo (MCA):

Sal Mineral	Concentración (g/L)
CaCl <sub>2</sub>	0,01
<b>Urea</b>	<b>0,88</b>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0
KCl	1,0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5
Sol. Oligoelementos	0,05 mL/L
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,01
<b>Glucosa</b>	<b>20</b>

Fuente de carbono: C<sub>12</sub> (1,5%)

Medio	Tensión superficial	Tensión interfacial	Biomasa	Extracto
MM1 (inicial)	37 mN/m	10 mN/m	0,57 mg/mL	68 mg/L
MCA	<b>36,2 mN/m</b>	<b>5 mN/m</b>	<b>3,8 mg/mL</b>	190 mg/L
<b>MCA (2010)</b>	<b>36,2 mN/m</b>	<b>5 mN/m</b>	<b>3,8 mg/mL</b>	<b>400 mg/L</b>
optimización extracción	- Concentración del sobrenadante del medio de cultivo por LIOFILIZACIÓN - Tres extracciones con Acetato de etilo-Metanol (8:1)			

## Curva de crecimiento de la bacteria



## Capítulo III

**Identificación Química del  
Nuevo Biotensioactivo por la  
bacteria *S. detergens*.**

**Crecimiento en medio mineral MM (optimizado) (se incuba a 30°C)**

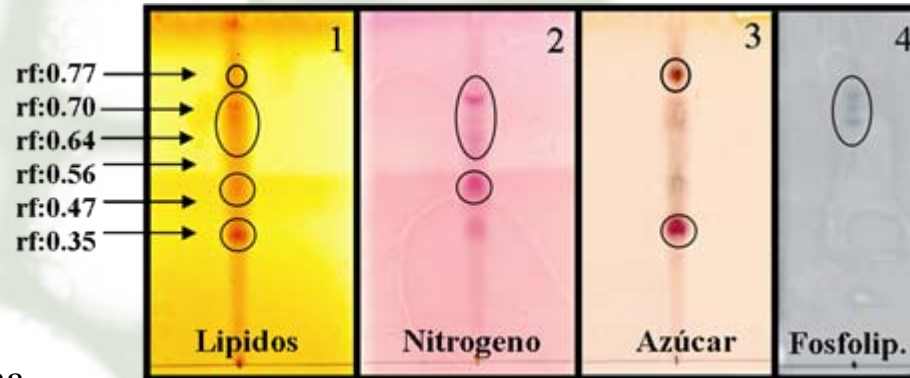
Se centrifuga el medio para eliminar las células

**Sobrenadante:  
Extracción Orgánica (Acetato de Etilo-Metanol)**

Extracto

- Cromatografía de capa fina/ Revelado: reactivo de Molish, atmósfera de yodo, reactivo de la ninhidrina, Molibdenum Blue Spray
- Purificación: columna de sílica / TLC preparativa
- Identificación de los compuestos del BT (HPLC luz dispersa; HPLC-MS-MS, RMN)

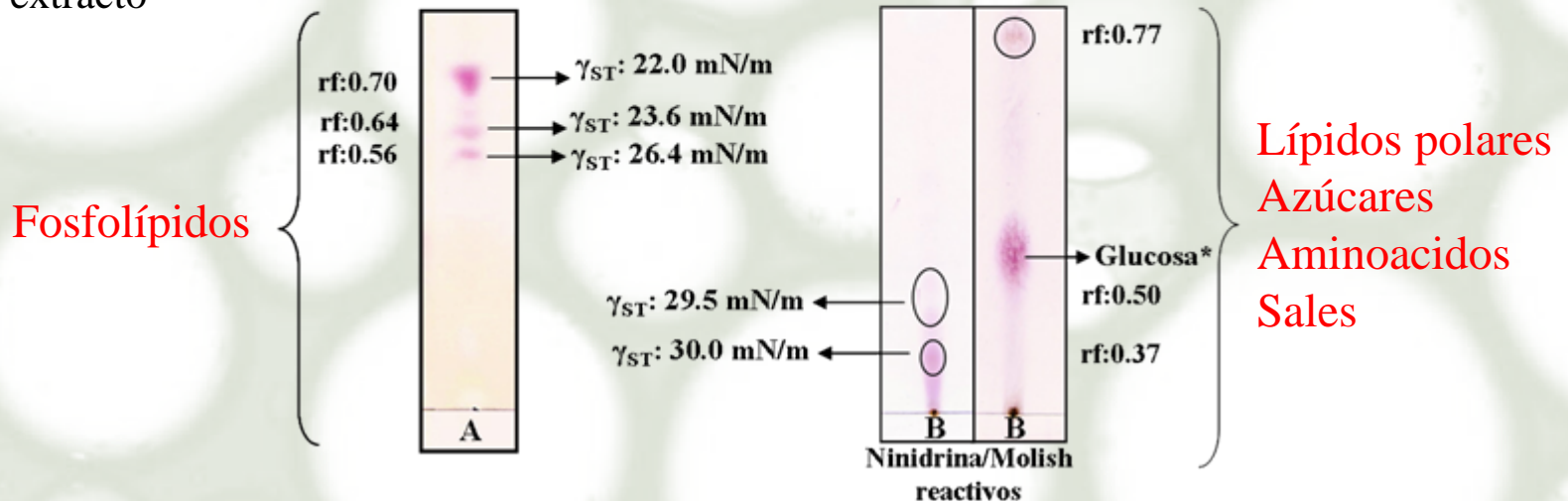
## Resultados de la extracción de los productos biotransformados y Cromatografía en capa fina (TLC).



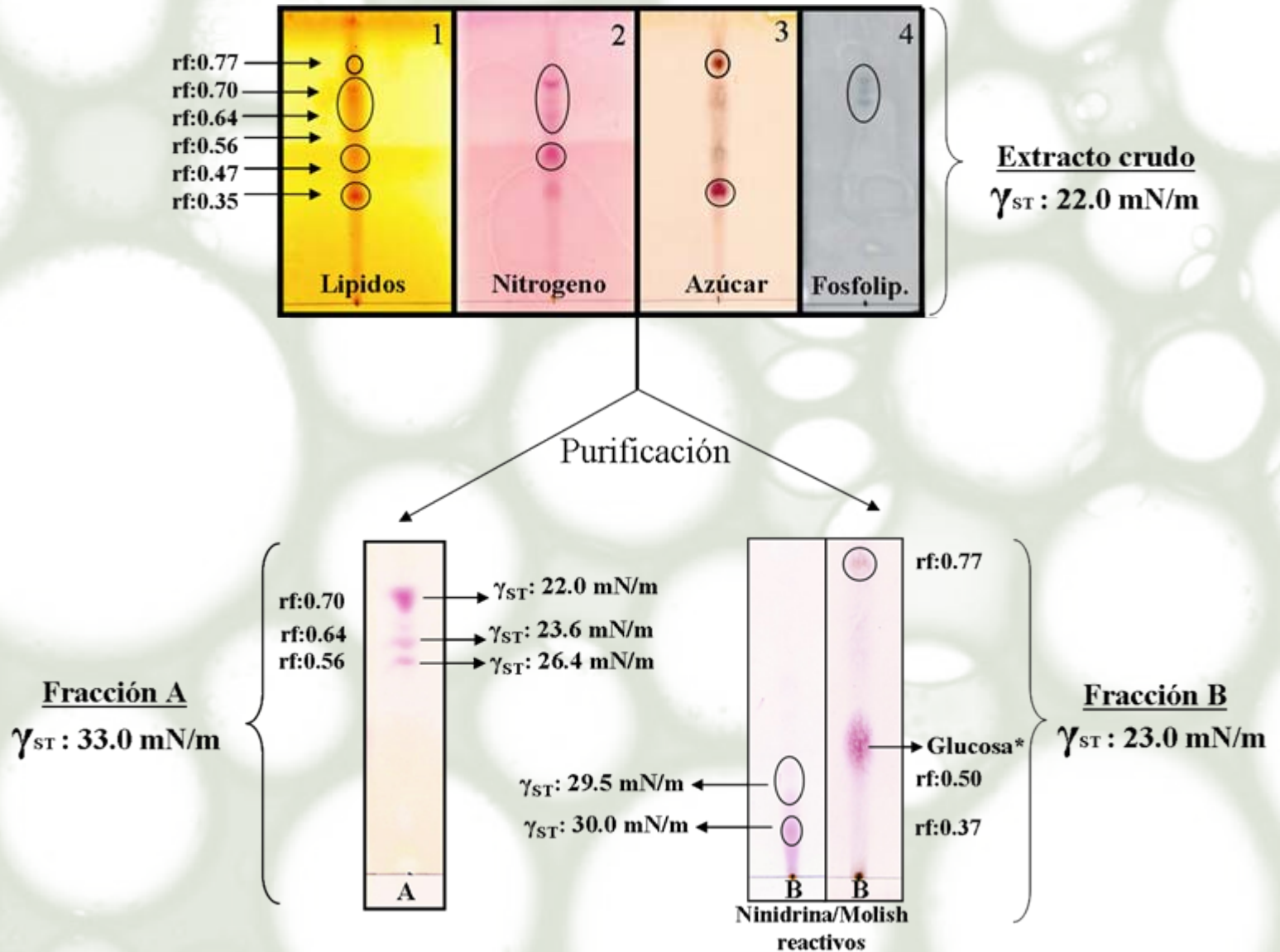
Purificación en columna en fase reversa:

Separación de lípidos apolares de los lípidos polares y contaminantes del extracto

Purificación



## Resultados de la extracción de los productos biotransformados y Cromatografía en capa fina (TLC).



# Purificación en columna en fase reversa

## Purificación en columna del extracto crudo

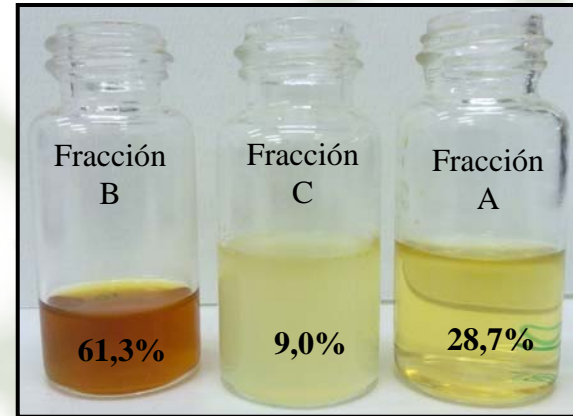


**(Metodo: Sphingolipid Extraction and Analysis by Thin-layer Chromatography. By Gerhild Van Echten-Deckert)**

1 2 3



B Lípidos polares  
C impurezas  
A Fosfolípidos



B C A  
Ninhydrina



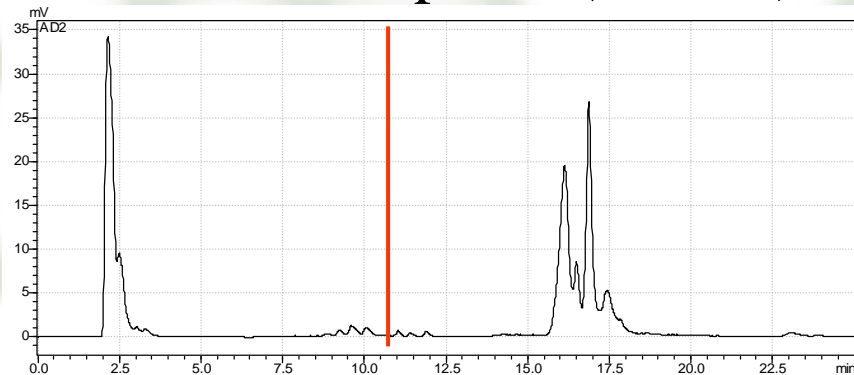
B C A  
Molibdenum  
Blue

fosfolípidos

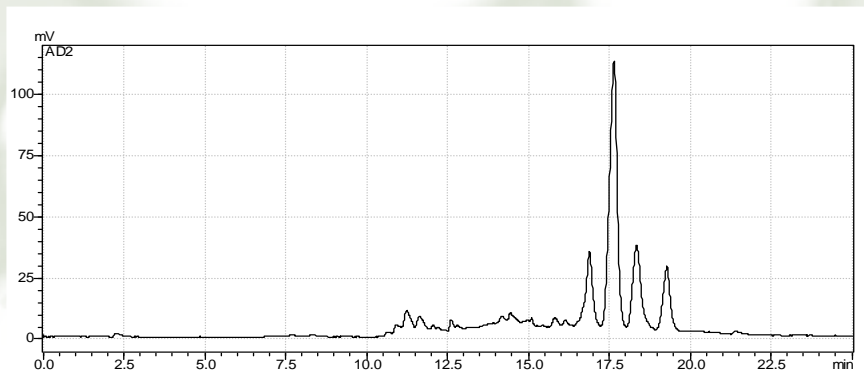
# Cromatografía Líquida con detector de luz dispersa

## Extracto completo (mezcla)

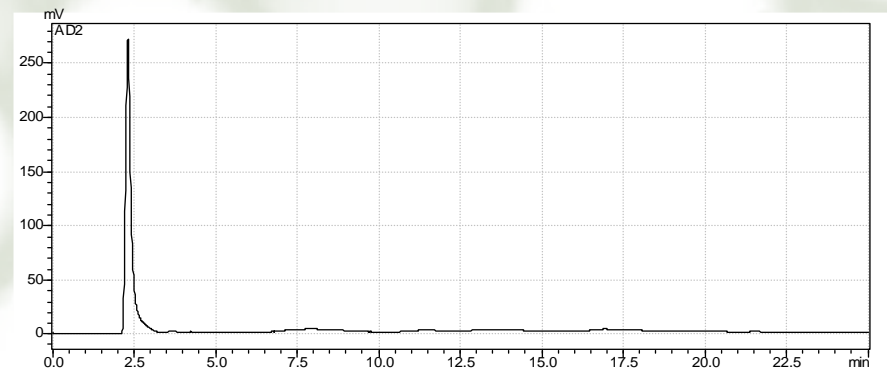
A: 1% CH<sub>3</sub>COOH / H<sub>2</sub>O  
 B: 1% CH<sub>3</sub>COOH / ACN  
 30% B:70% A por 25 min



## Fracción A del extracto

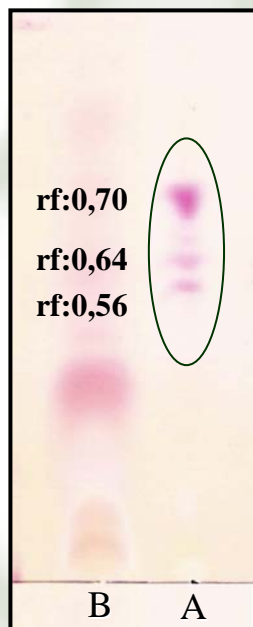


## Fracción B del extracto



# Resultados de la purificación de los productos mediante TLC Preparativas

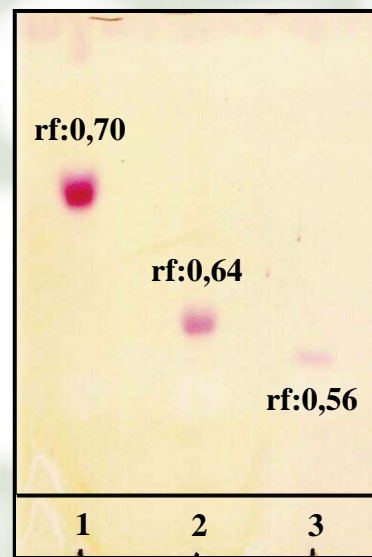
Muestra Sin Purificar



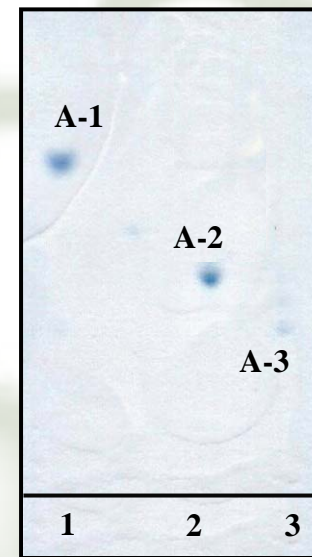
Purificación por  
TLC preparativas



Muestras purificadas

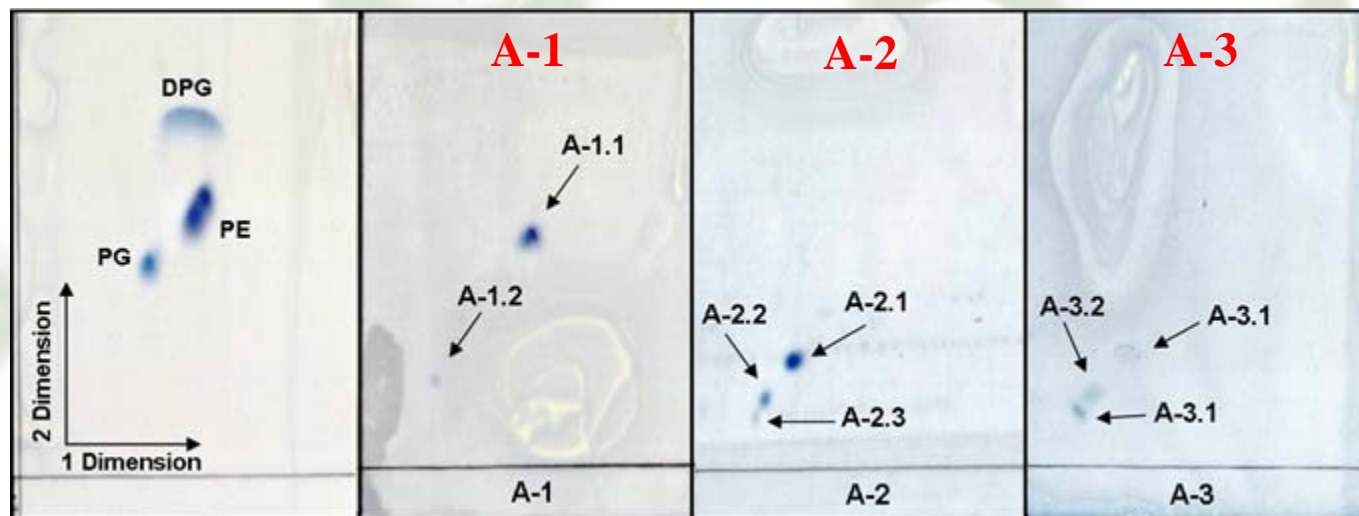
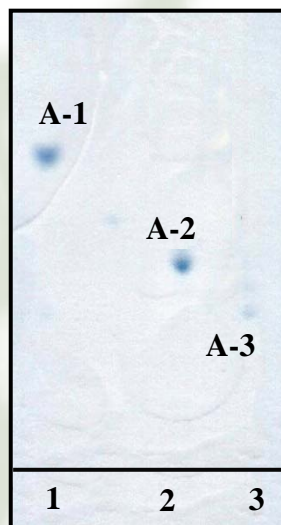


Presencia de N



Fosfolípidos

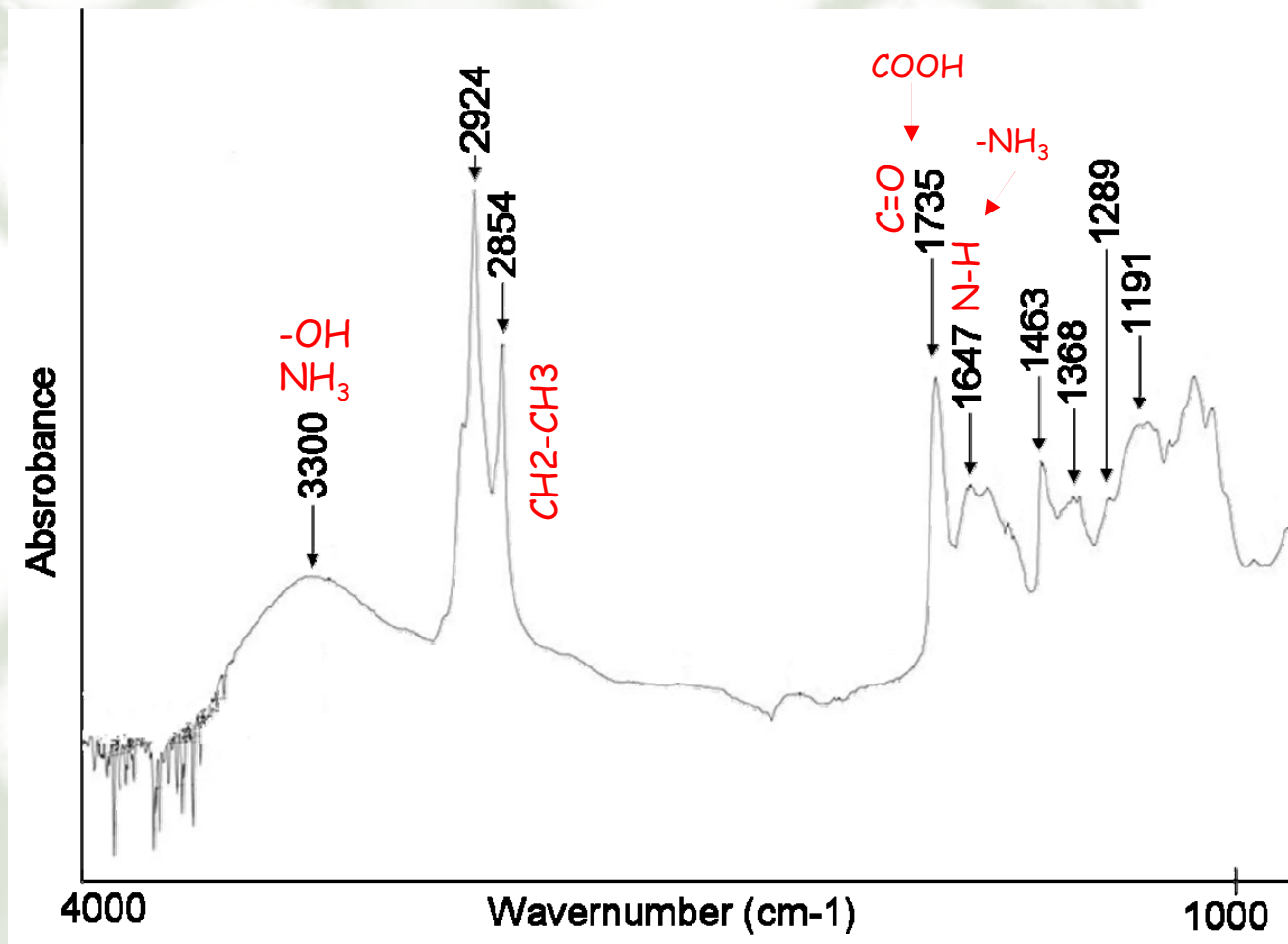
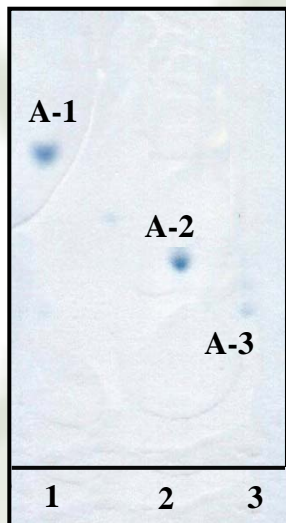
## TLC bidimensional de los compuestos (Fracción A)



1ª Dimensión: Cloroformo/metanol/agua  
65:25:4 mL

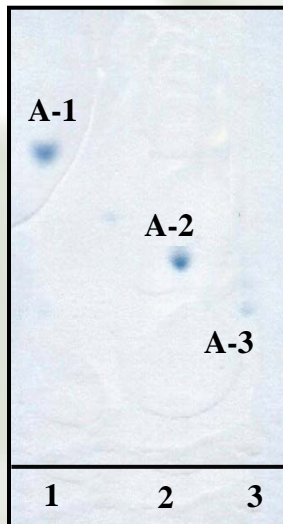
2ª Dimensión: Cloroformo/metanol/acido acético /agua  
80:12:15:4 mL

## FT-IR de los compuestos purificados de la fracción A)



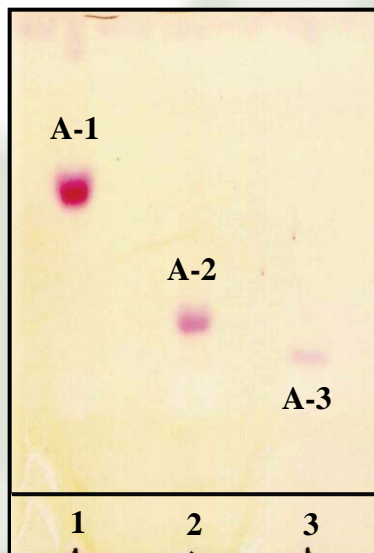
## Determinación de los ácidos grasos por la técnica CG/MS

- Hidrólisis de los compuestos A-1; A-2; A-3(metanólisis)
- Análisis por CG/MS

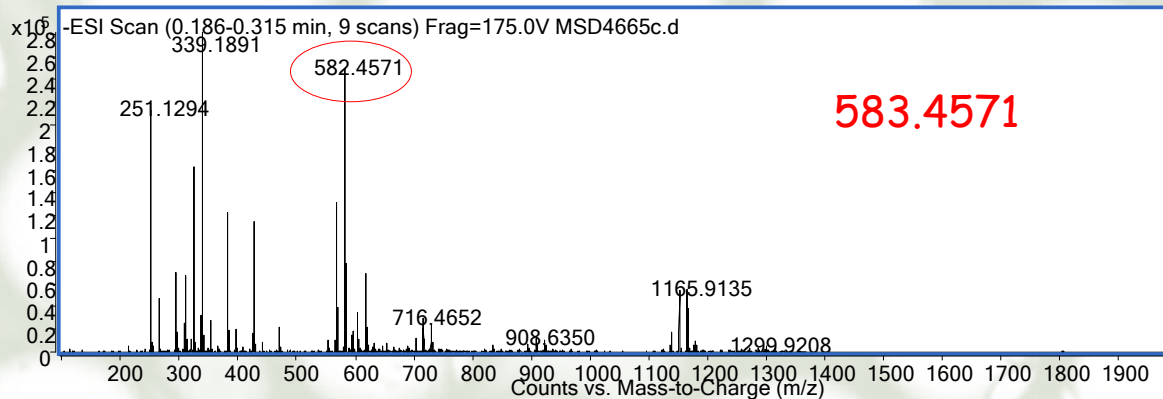


Acidos grasos	A-1	A-2	A-3
Acido palmitoleico (C <sub>16:1</sub> )	54.5 %	76.0 %	6.7 %
Acido palmitico (C <sub>16:0</sub> )	25.8 %	13.4 %	31.1 %
Ac. Pentadecanoico (C <sub>15:1</sub> )	19.7 %	10.6 %	59.1 %

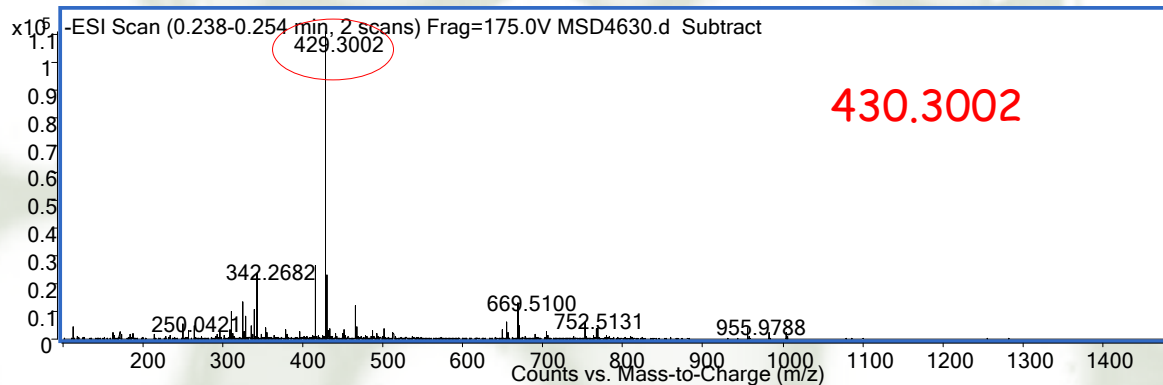
## Determinación del peso molecular por la técnica ESI-MS



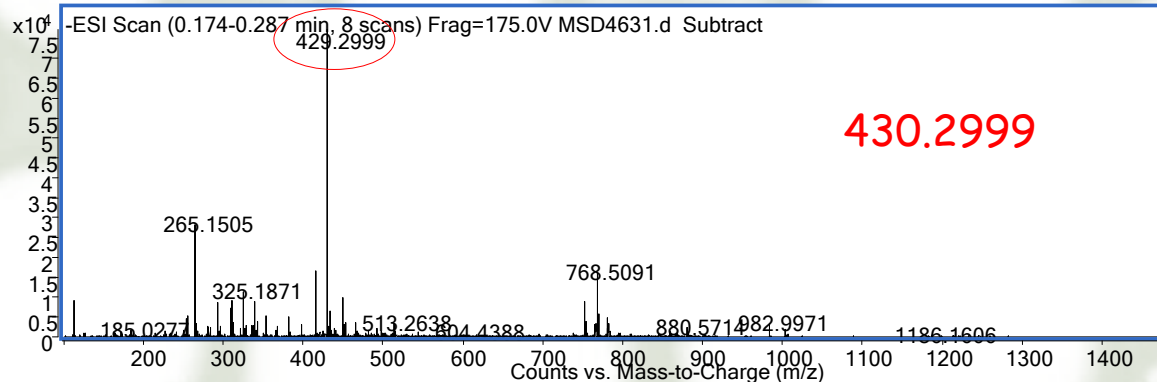
A-1



A-2

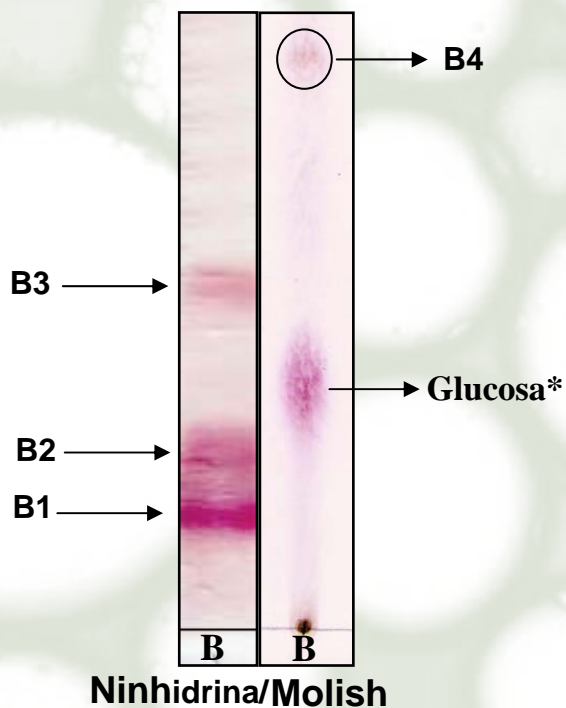


A-3

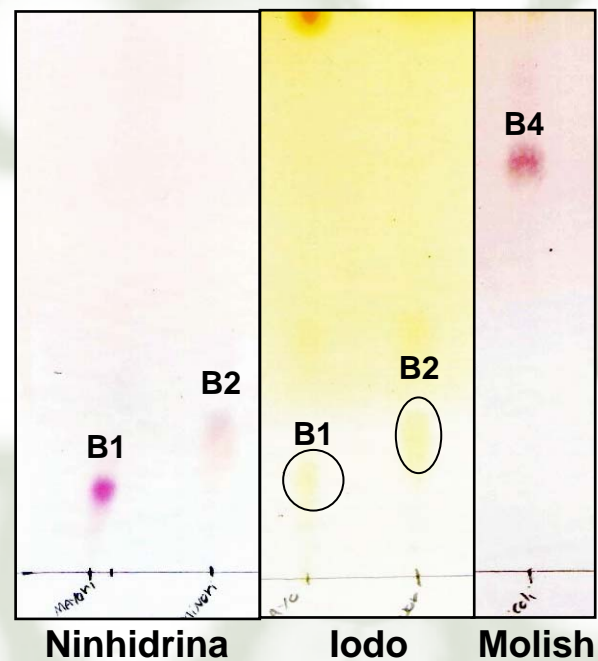


# Resultados de la purificación de los productos mediante TLC Preparativas

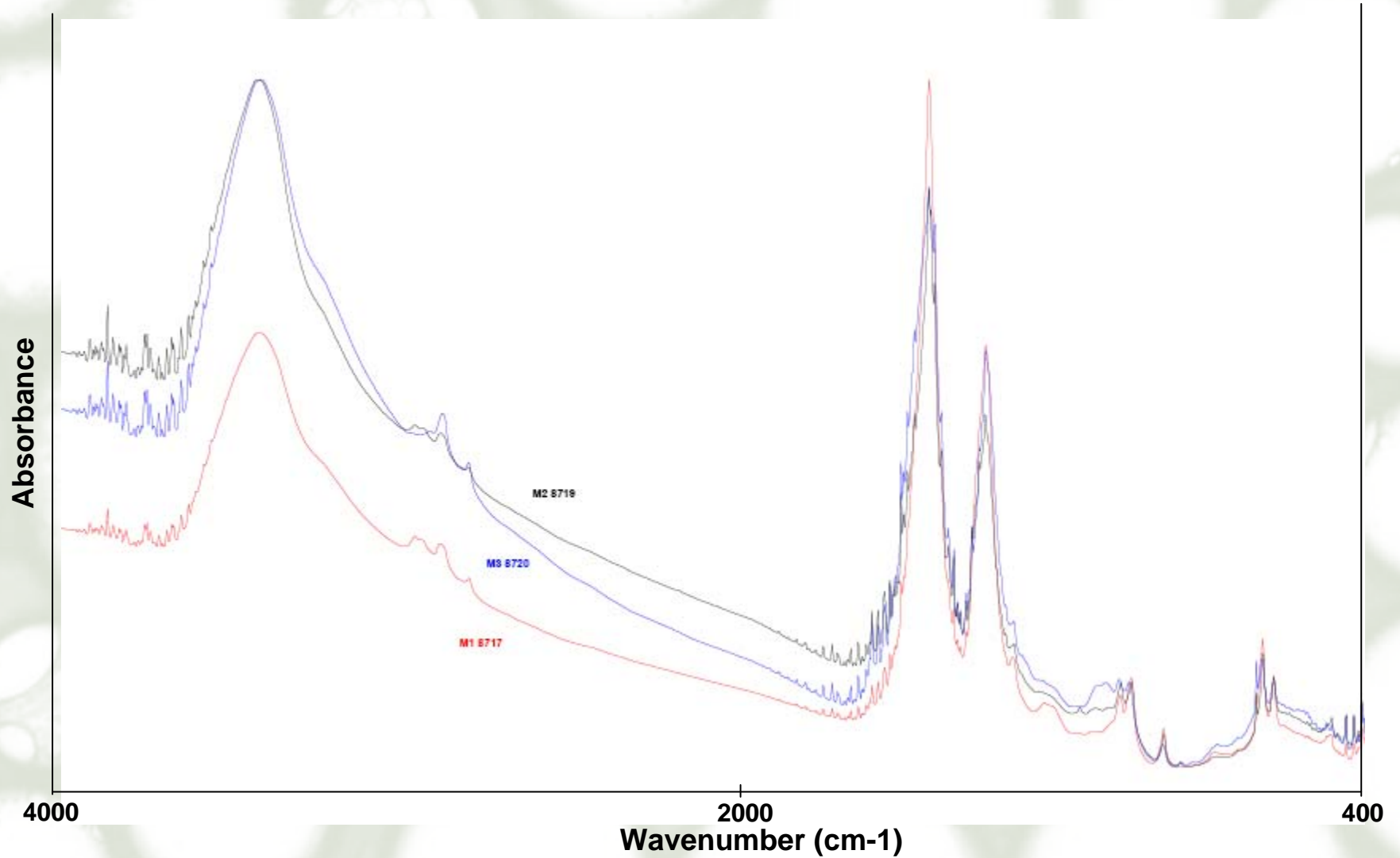
Fracción B completa



Compuestos purificados



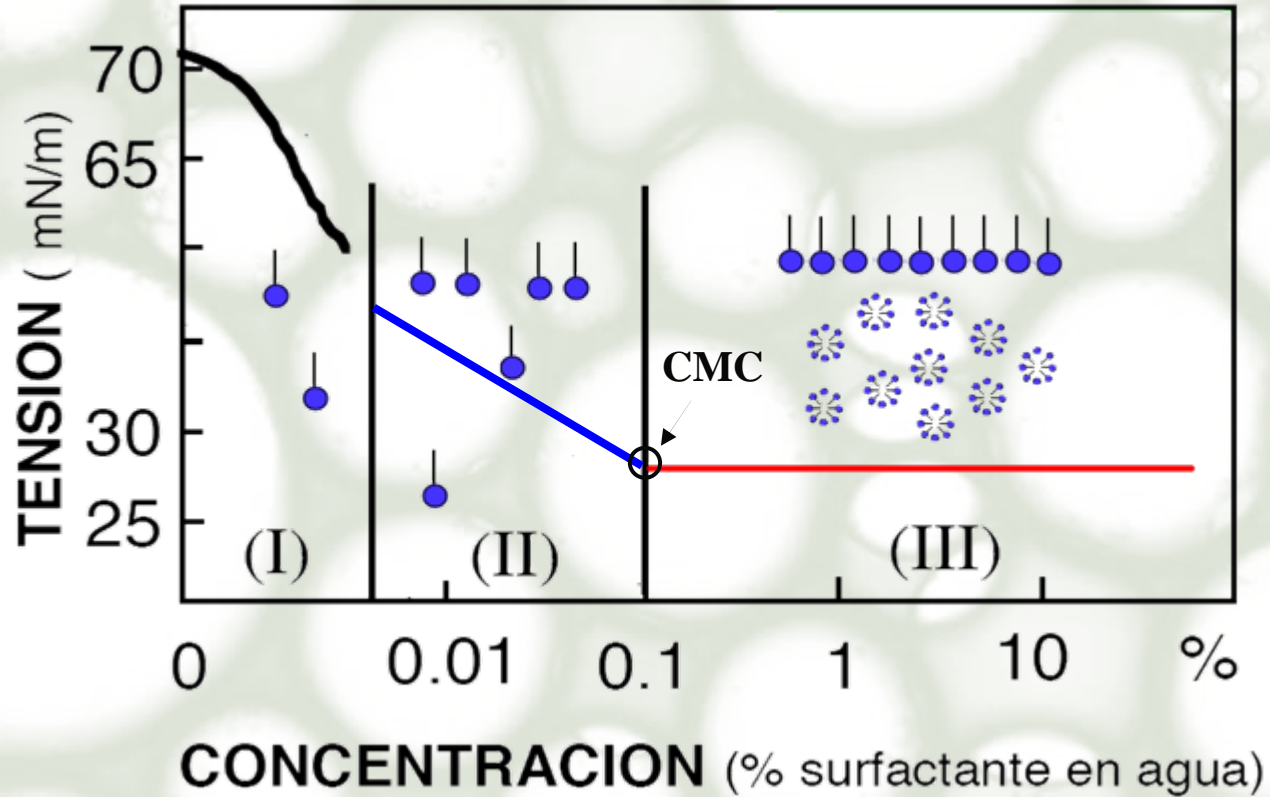
# FT-IR de los compuestos purificados correspondiente a la fracción B



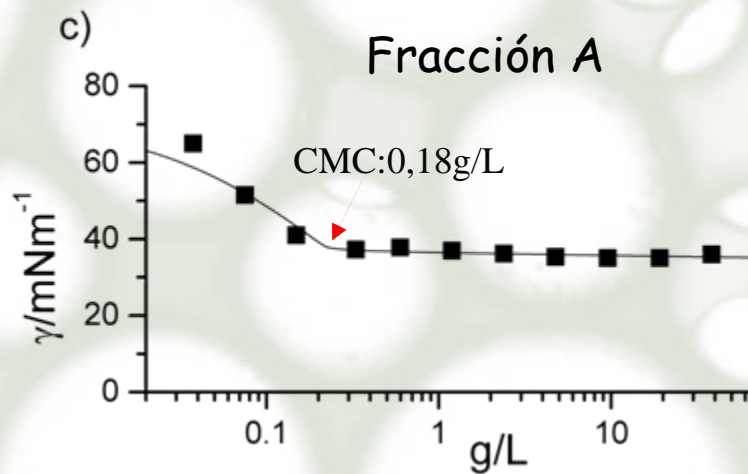
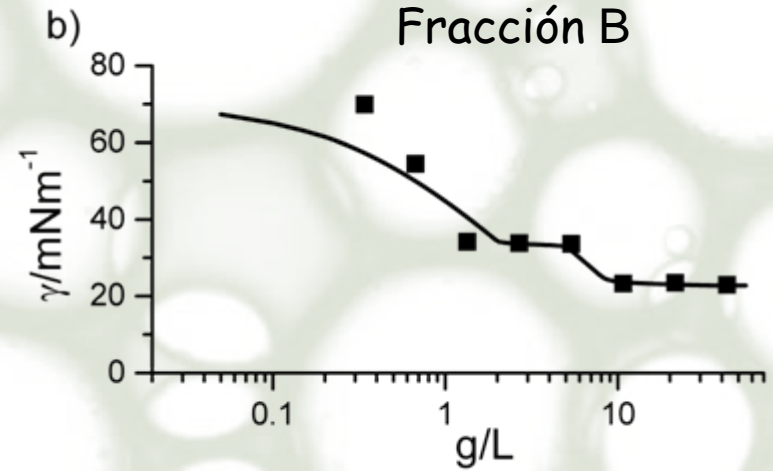
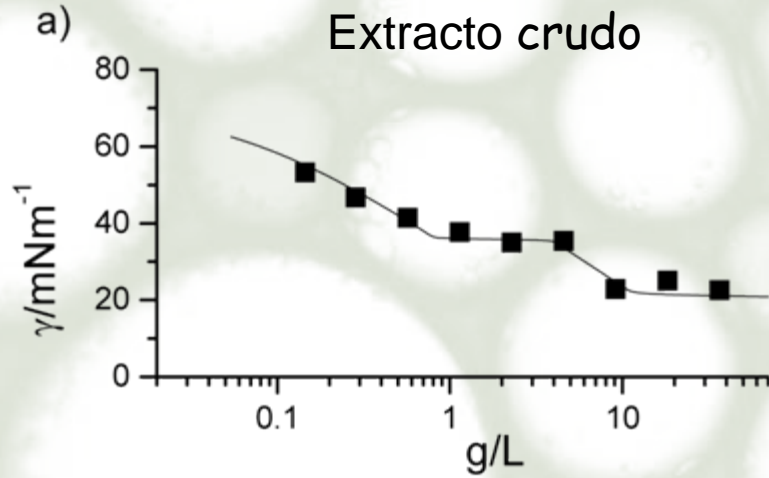
## Capítulo IV

# Propiedades Físico Químicas BT

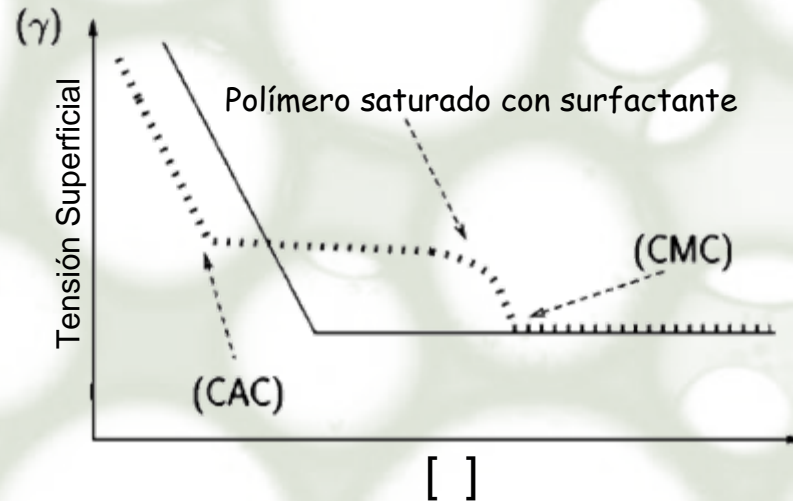
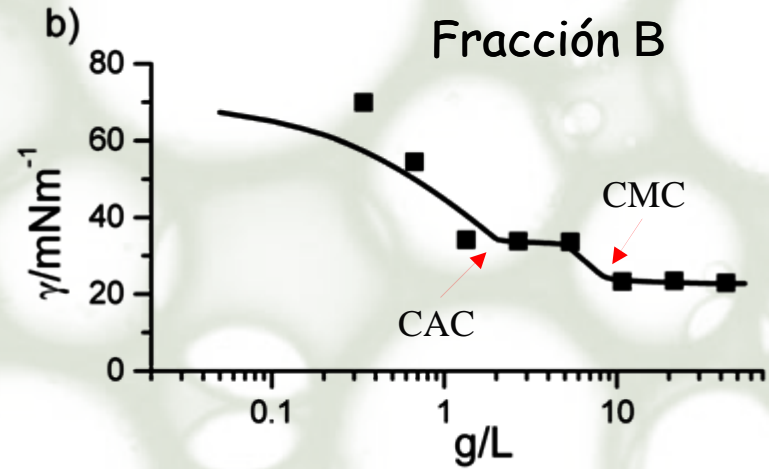
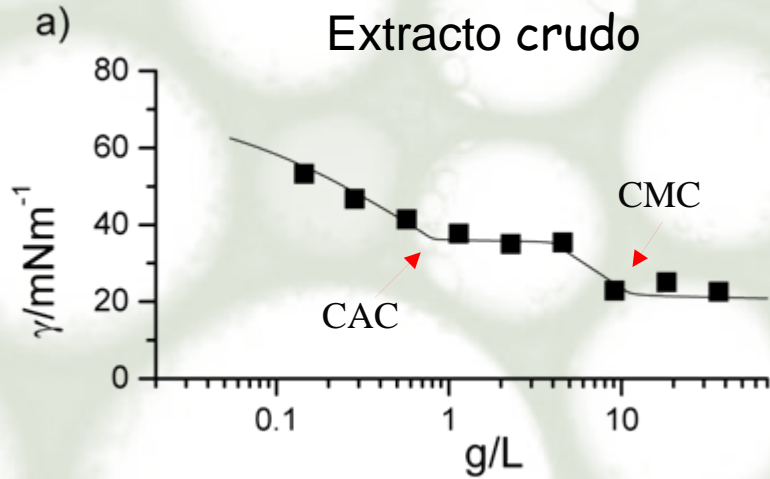
### Concentración Micelar Crítica (CMC)



## Concentración Micelar Crítica (CMC) del BT

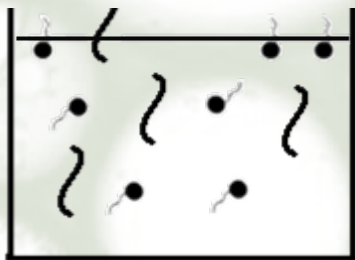
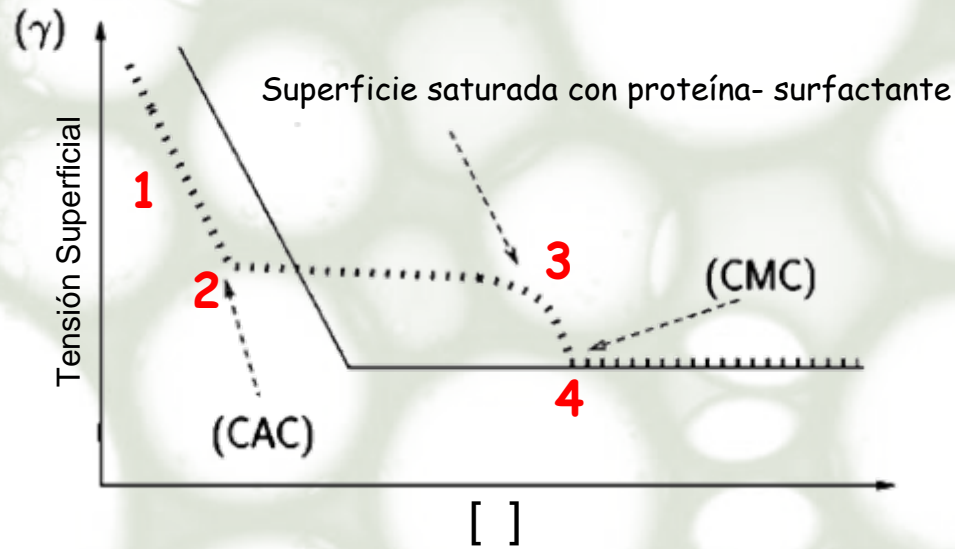


# Interacción entre Proteína-Surfactante

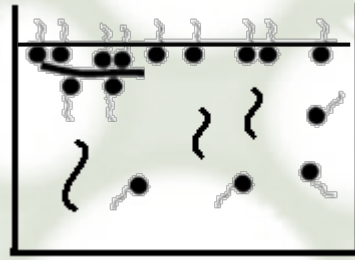


- Macroscopic Modeling of the Surface Tension of Polymer-Surfactant Systems. (Bell *et al*, 2007)
- A theoretical analysis of the surface tension profiles of strongly interacting polymer-surfactant system ( Bell *et al*, 2010)

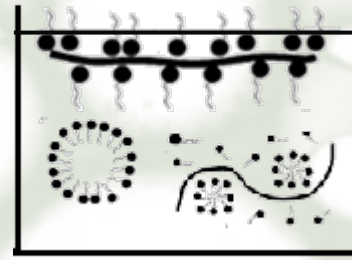
# Interacción entre Proteína-Surfactante



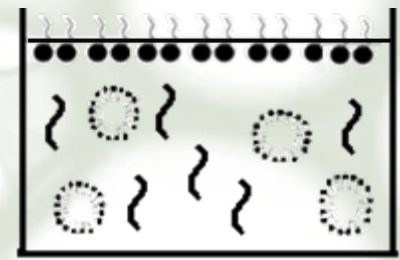
1



2

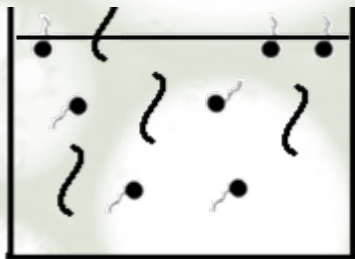
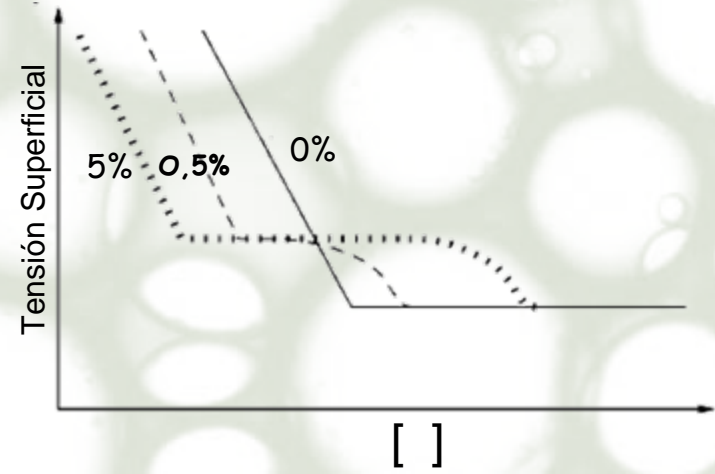
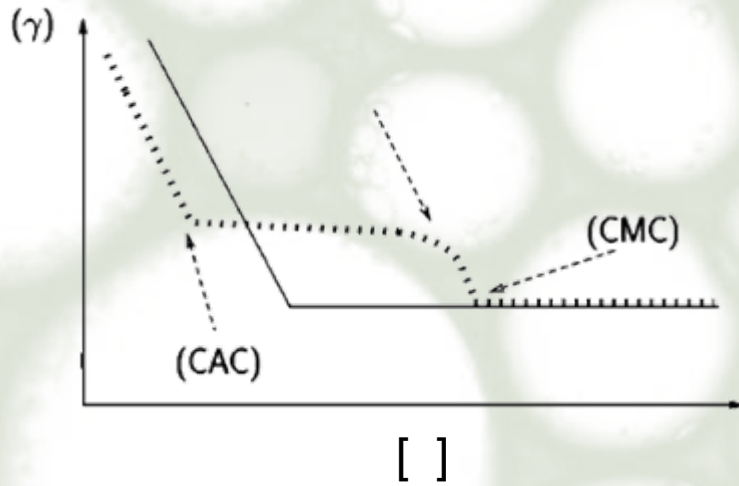


3

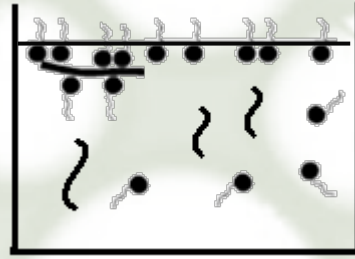


4

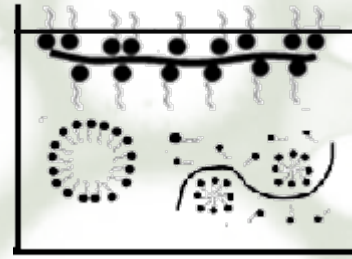
# Interacción entre Proteína-Surfactante



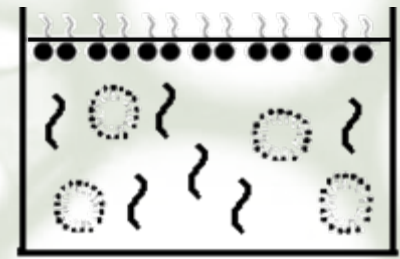
1



2

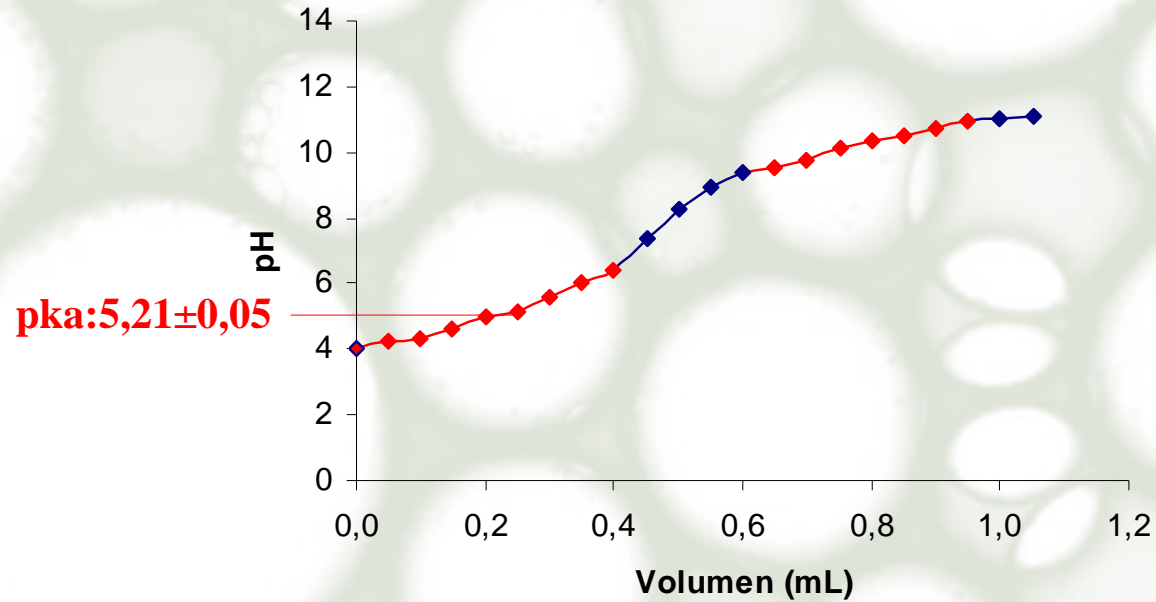


3



4

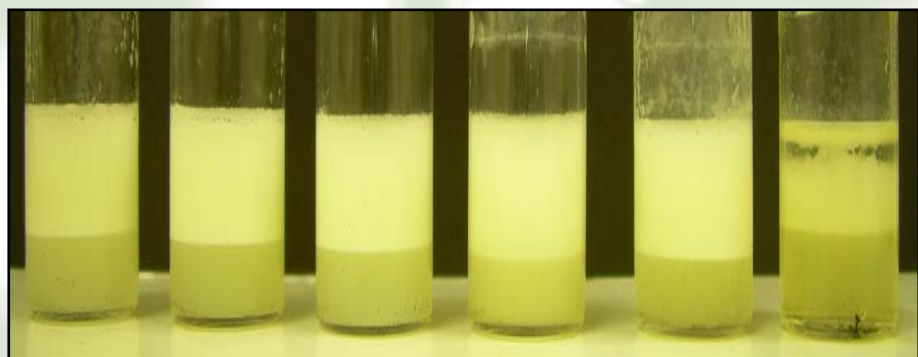
# Determinación del $pK_a$ del BT



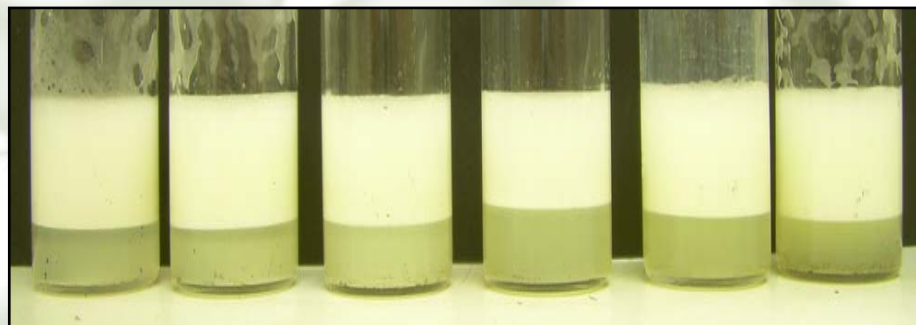
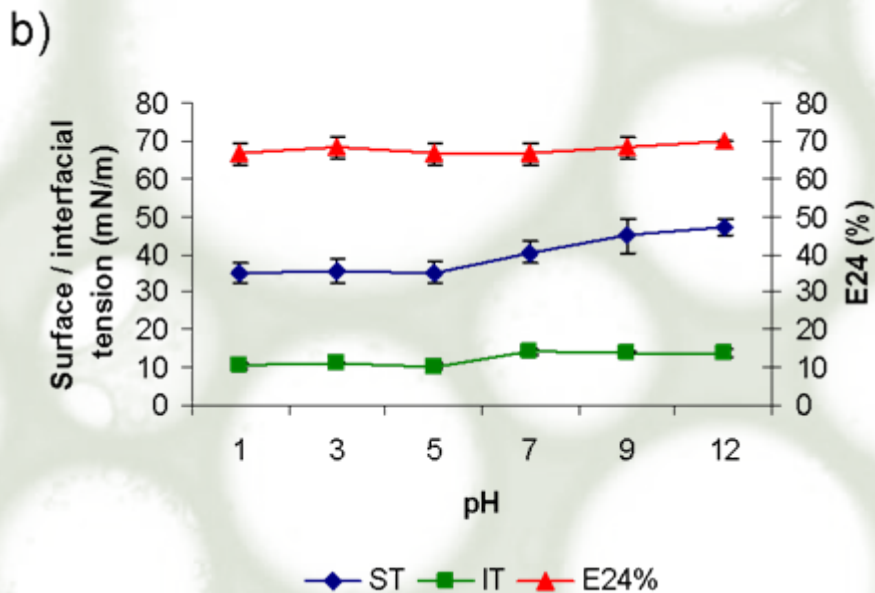
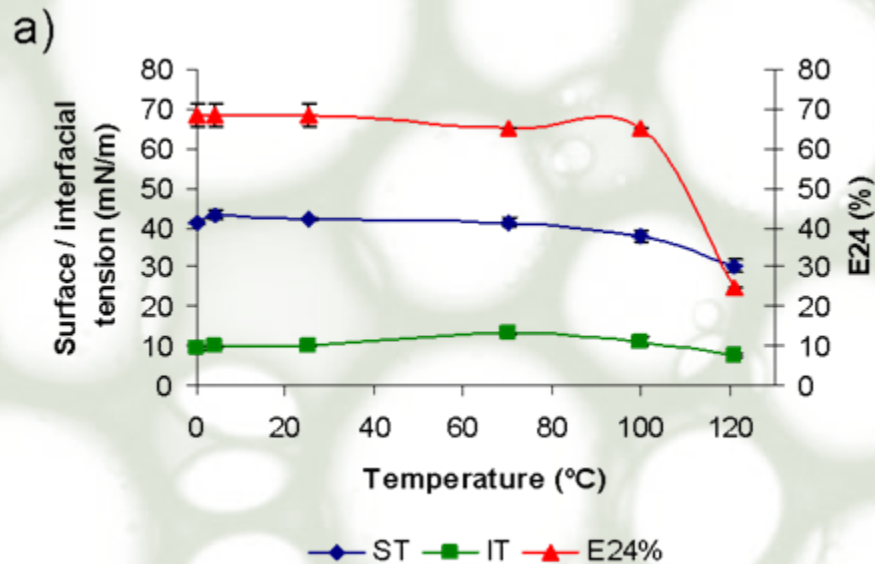
## Capítulo IV

# Capacidad Emulsionante del Bitensioactivo

## Propiedades fisicoquímicas del sobrenadante del cultivo

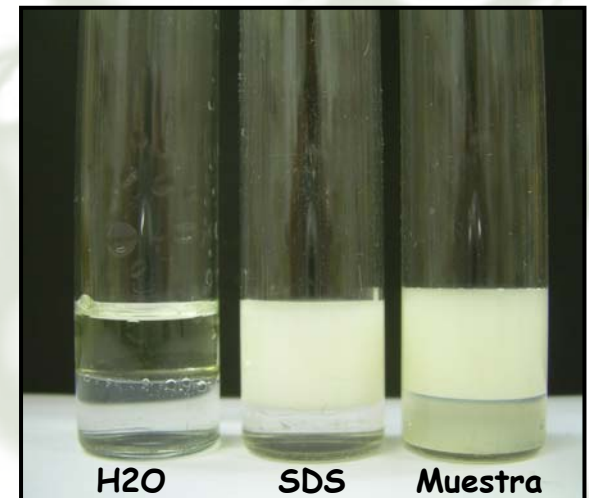
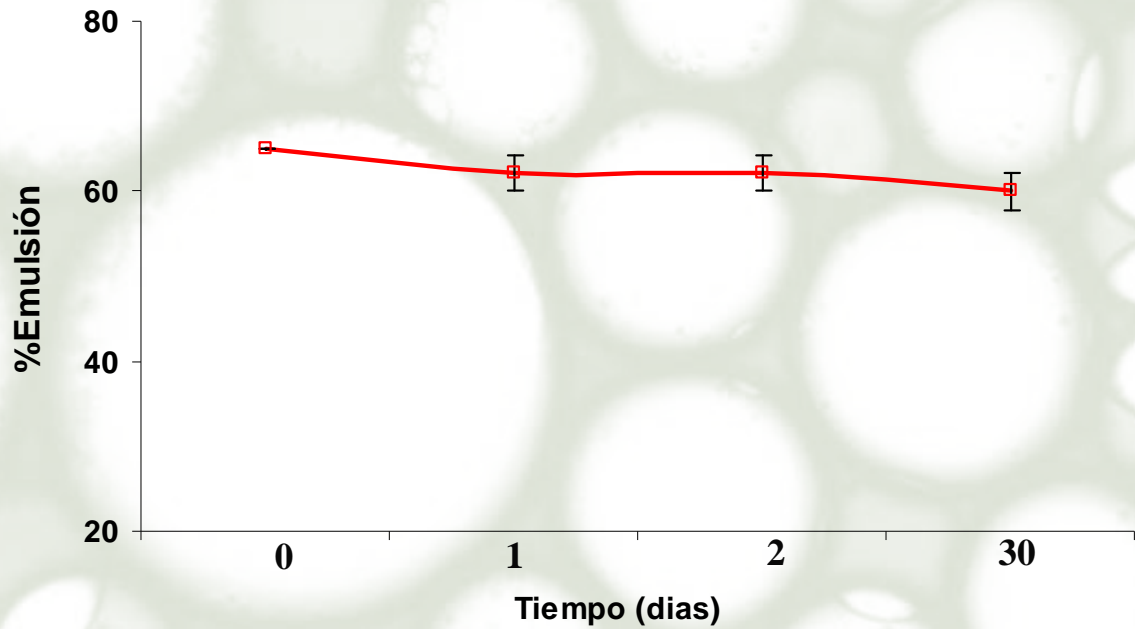


0°C    4°C    25°C    70°C    100°C    120°C



1    3    5    7    9    12

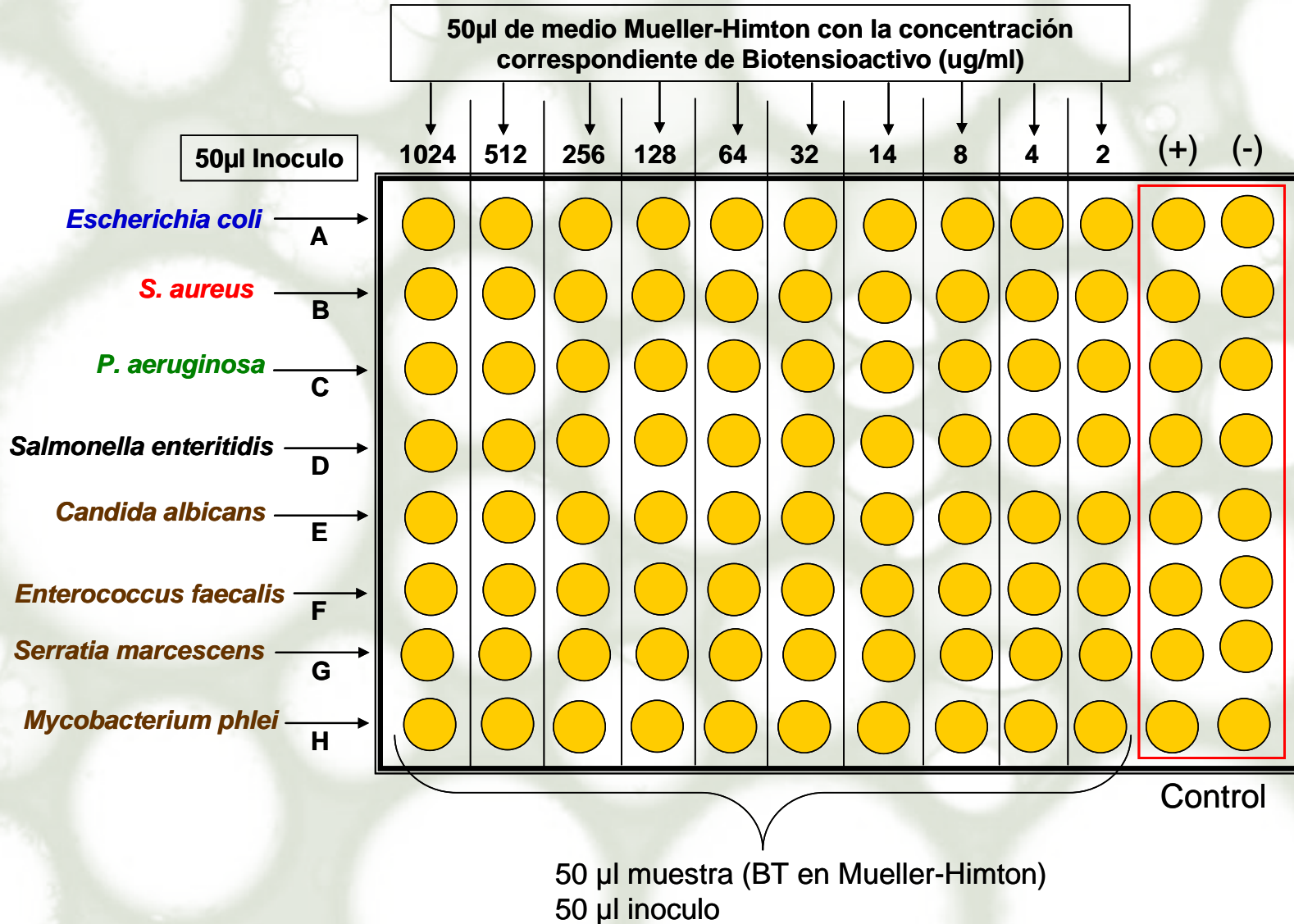
# Propiedades fisicoquímicas del sobrenadante del cultivo



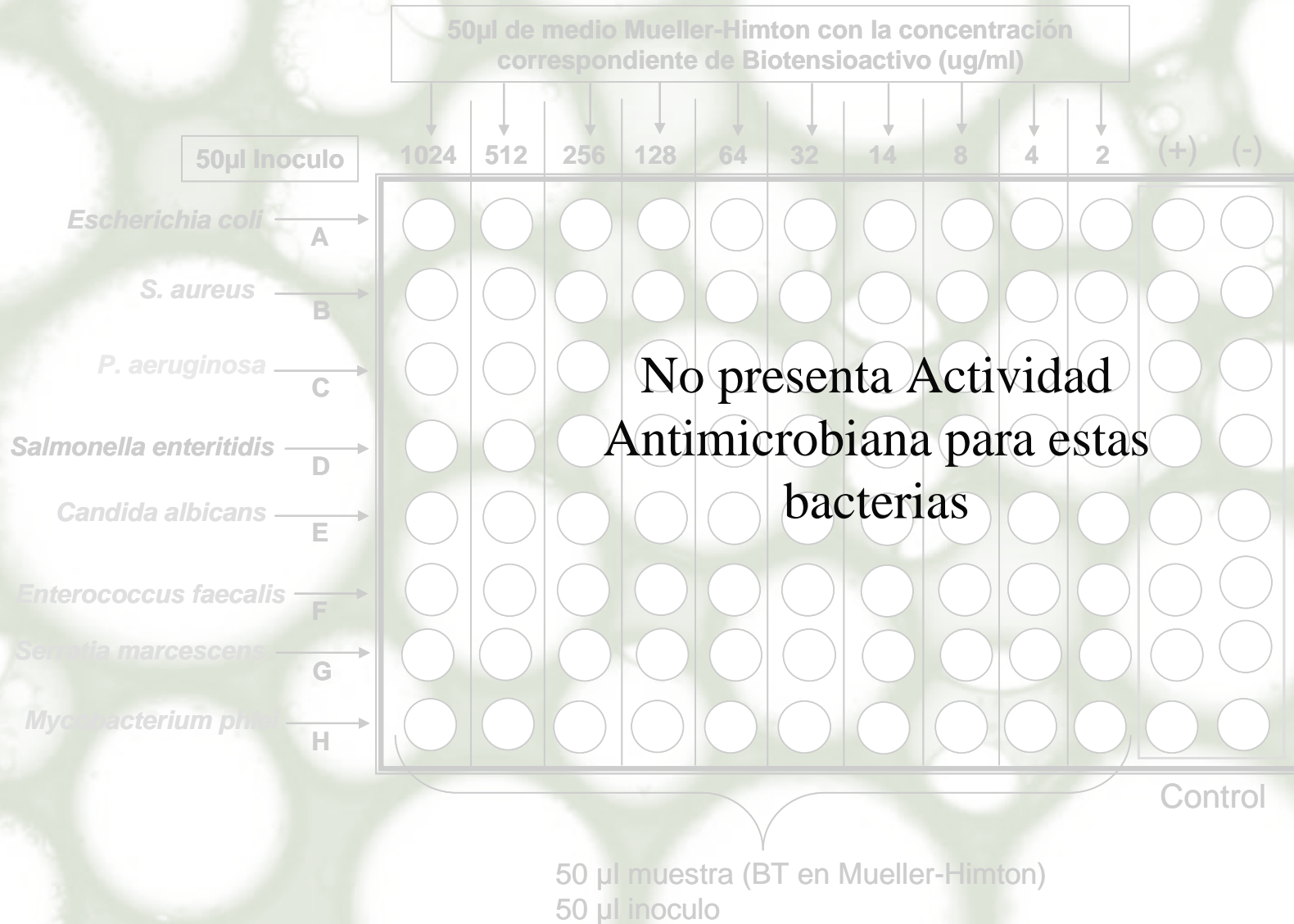
## Capítulo V

# Propiedades antimicrobianas y Toxicidad del BT

## Concentración mínima inhibitoria (CMI) para bacterias

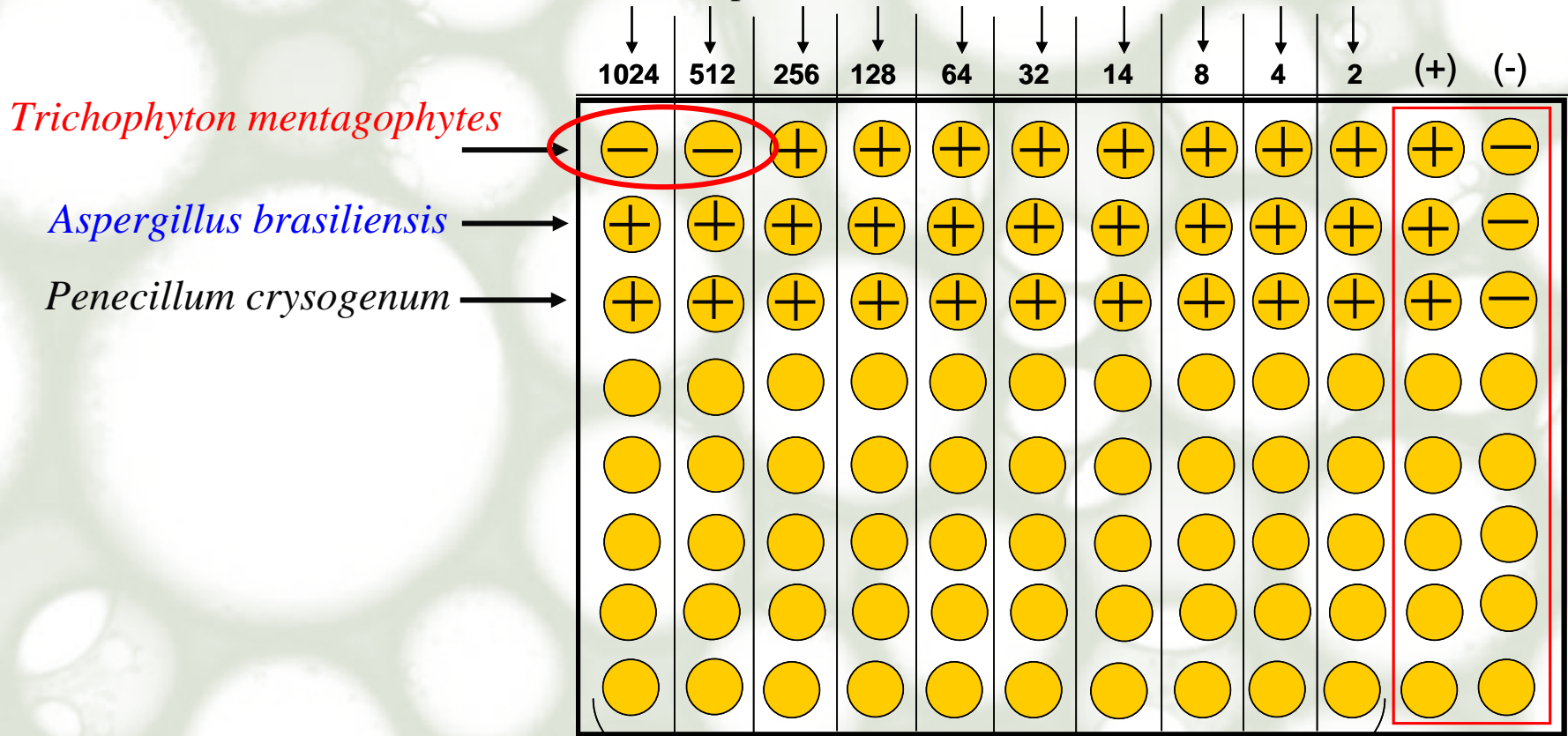


## Concentración mínima inhibitoria (CMI) para bacterias



## Concentración mínima inhibitoria (CMI) para hongos

50 ul de medio Sabouraud con la concentración correspondiente de biotensioactivo



Control

(+): crecimiento

(-) : sin crecimiento

# Hemólisis del BT sobre agar sangre



completo



A



B

Extracto Crudo



Fracción A



Beta-hemolítico

Fracción B



alfa-hemolítico



UNIVERSITAT DE BARCELONA



UNIVERSITAT DE BARCELONA  
FACULTAT DE FARMÀCIA  
Departament de Microbiologia i  
Parasitologia Sanitàries



FACULTAT DE  
FARMÀCIA

# **Búsqueda e Identificación de Nuevos Biotensioactivos de Origen Bacteriano**

---

**CÉSAR BURGOS DÍAZ**  
**OCTUBRE DE 2011**