



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

**Selección de morfotipos bacterianos en muestras de suelo  
para identificar bacterias productoras de metabolitos con  
actividad antibacteriana; estrategia alineada con Tiny Earth  
Project**

Tesis Colectiva

Licenciado en Biología

**Presentan:**

Alba Edith Jiménez López

Fernando Juárez Vallejo

**Dirigido por:**

Dr. José Antonio Cervantes Chávez

Dr. José Antonio Cervantes Chávez

Presidente

\_\_\_\_\_  
Firma

M. en C. Kruskaia K. Caltzontzin Fernández

Secretario

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Fidel Landeros Jaime

Vocal

\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. Bertha Carbajal Gamez

Vocal

\_\_\_\_\_  
Firma

La presente obra está bajo la licencia:  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

### Usted es libre de:

**Compartir** — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

### Bajo los siguientes términos:



**Atribución** — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



**NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



**SinDerivadas** — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

**No hay restricciones adicionales** — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

### Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.

## **Resumen**

Los ceparios preservan la diversidad biológica de muestras de interés para realizar actividades de investigación y docencia. Por ello, proponemos la creación de un cepario basado en morfotipos bacterianos; provenientes de muestras de suelo en ecosistemas distintos como: vegetación preservada, y perturbada (tierras de cultivo), empleando la técnica de muestreo compuesto al azar.

En este cepario se analizó la capacidad de producir compuestos antibacterianos (metabolitos secundarios con capacidad bacteriostática o bactericida) bajo la premisa de investigación “Tiny Earth Project” que a partir de bacterias aisladas de muestras de suelo pretende combatir la crisis mundial de resistencia bacteriana ante antibióticos actuales. Esta iniciativa fue desarrollada en la Universidad de Wisconsin y se expande a nivel mundial, en México colabora el Dr. José Antonio Cervantes Chávez-Facultad de Ciencias Naturales y el Dr. Francisco Barona Gómez del Langebio. La creación del cepario es vital, puesto que, a partir de éste, procederemos a evaluar la capacidad de producción de antibióticos en contra de las bacterias denominadas ESKAPE; acrónimo de *E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *Enterobacter* spp., estas bacterias han sido clasificadas como críticamente prioritarias por la OMS. Para ello se trabajó con bacterias denominadas como parientes seguros, los cuales son bacterias genéticamente cercanas pero carecen de factores de patogenicidad facilitando así su manejo; los resultados obtenidos serán extrapolables a las bacterias ESKAPE. Se aislaron 148 bacterias de cuatro muestras de suelo. Las bacterias que presentaron mayor inhibición del crecimiento de los parientes seguros se identificaron inicialmente por su perfil metabólico, posteriormente a nivel molecular lo cual arrojó corresponder a: *Priestia megaterium*, *Enterobacter asburiae*, *Klebsiella variicola* y *Serratia nematodiphila*, todas ellas reportadas en la literatura por sus capacidades antimicrobianas y biotecnológicas.

## **Palabras clave**

Antibiótico, resistencia a antibióticos, biodiversidad, microbiota, bacterias ESKAPE, parientes seguros, crioconservación.

## Summary

Cepariums preserve the biological diversity of samples of interest for research and teaching activities. For this reason, we propose the creation of a strains collection based on bacterial morphotypes; From soil samples in different ecosystems such as: preserved and disturbed vegetation (cropland), using the random composite sampling technique.

In this strain collection, the ability to produce antibacterial compounds (secondary metabolites with bacteriostatic or bactericidal capacity) was analyzed under the premise of the "Tiny Earth Project" research that, from bacteria isolated from soil samples, aims to combat the global crisis of bacterial resistance to current antibiotics. This initiative was developed at the University of Wisconsin and expands worldwide, in Mexico Dr. José Antonio Cervantes Chávez-Faculty of Natural Sciences and Dr. Francisco Barona Gómez del Langebio collaborates. The creation of the strain collection is vital, since, from it, we will proceed to evaluate the capacity to produce antibiotics against the bacteria called ESKAPE; An acronym for *E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *Enterobacter* spp., these bacteria have been classified as critically priority by the WHO. To this end, we worked with bacteria called safe relatives, which are genetically close bacteria but lack pathogenicity factors, thus facilitating their management; the results obtained can be extrapolated to ESKAPE bacteria. A total of 148 bacteria were isolated from 4 soil samples. The bacteria that showed greater inhibition of the growth of the safe relatives were initially identified by their metabolic profile, later at the molecular level, which corresponded to: *Priestia megaterium*, *Enterobacter asburiae*, *Klebsiella variicola* and *Serratia nematodiphila*, all of them reported in the literature for their antimicrobial and biotechnological capabilities.

## Keywords

Antibiotic, antibiotic resistance, biodiversity, microbiota, ESKAPE bacteria, safe relatives, cryopreservation.

## **Dedicatorias**

### **Alba**

“Primeramente me gustaría felicitar y agradecer a mi "sweetheart", con quien compartí mis años universitarios y por supuesto, el proceso de la tesis (¡se logró!, mi amor). No cabe duda que aunque presentemos desacuerdos al trabajar, no hay dupla más fuerte y hermosa que la nuestra. Gracias por acompañarme incondicionalmente durante la luz y oscuridad.

De igual forma, llevo en el fondo de mi corazón a todas mis amistades quienes me impulsaron con su: cariño, consejos y comprensión. Sin importar en que momento llegaron a mi vida, cada uno de ustedes ha dejado su huellita en mí, son lo máximo.

Y como cereza del pastel, dedico este logro académico y personal a mi familia; especialmente a mi mamá (mi Shuwita a quien tanto amo), mi papá, mis tías Olivia y Crisanta y por supuesto a mi abuelita Amalia quien me cuida desde el cielo. Gracias a todos por animarme y brindarme la oportunidad de disfrutar las ciencias naturales -mi área predilecta desde la infancia cuando soñaba con ser científica-. Todo su apoyo y cobijo me ha permitido llegar a donde estoy pues, cada palabra y acción me ha alentado a crecer.

Finalmente, a la familia Juárez Vallejo muchísimas gracias por regalarme recuerdos maravillosos, gracias por considerarme y hacerme parte de fechas importantes como un integrante más de su hogar. Aprecio cada abrazo, risa y alimento que me compartieron, los quiero y considero como mi segunda familia.”

### **Fernando**

“Le quiero dedicar esta tesis a mi familia que siempre me ha apoyado. A mi papá por siempre estar ahí, por trabajar todos los días para que yo pueda dedicarme a estudiar y por apoyarme siempre, siempre has sido mi modelo a seguir y espero poder algún día ser tan trabajador, responsable y cariñoso como tú. A mi mamá por brindarme tu apoyo incondicional, aunque estes cansada siempre me recibías con amor y con lo que necesite para seguir adelante, por escucharme todas las tardes regresando de la universidad, por emocionarte con mi progreso y por siempre estar ahí. A mis hermanos que también son mi modelo a seguir,

siempre me inspiran a más, me regañan para ser una mejor persona y por darse cuenta de mi potencial y apoyarme cuando me equivocaba o necesitaba de su ayuda.

A mi novia, compañera de clase, de laboratorio, de equipo y de tesis a Alba Edith Jiménez López, muchas gracias por acompañarme todos los días a lo largo de toda la carrera, gracias por estar siempre a mi lado en las clases y proyectos. Gracias por ayudarme siempre a estudiar juntos para los exámenes, por siempre sacar lo mejor de mí, por impulsarme a mejorar todos los días. Sin ti nada de esto era posible. Eres mi piedra angular y mi mayor soporte. Gracias por acompañarme en esta etapa y en las siguientes”

## **Agradecimientos**

Queremos hacer mención al Laboratorio de Microbiología Molecular Campus Aeropuerto de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro quien nos abrió sus puertas para realizar las investigaciones pertinentes junto con el LANGEBIO, especialmente dirigido a las doctoras Laura y Clara Gutiérrez por su ayuda en la secuenciación de nuestras muestras así como a nuestros sinodales Kruskaia Karenia Caltzontzin Fernández, Fidel Landeros Jaime y a Bertha Isabel Carvajal Gamez. También, queremos enfatizar toda la dedicación y atención que nos brindó nuestro tutor académico Moisés Pérez Mendoza quien con vocación nos orientó y apoyó genuinamente en nuestro paso por la licenciatura.

Agradecemos infinitamente el apoyo y enseñanza que nos brindaron el doctor José Antonio Cervantes Chávez y el Ingeniero Daniel Mendoza Jiménez, quienes desde el servicio social nos brindaron la oportunidad de encaminarnos en la realización de nuestra tesis en los tiempos más difíciles de pandemia. Estamos en deuda por el constante apoyo y enseñanza que nos brindaron (fuera y dentro del laboratorio), además de mentores los consideramos como grandes seres humanos y amigos, esperamos de corazón que todos pudieran encontrar grandes personas como ustedes dos.

Finalmente apreciamos el financiamiento otorgado por el programa FONDEC FNB202207.

# Índice

<b>1.- Introducción</b> .....	1
1.1.- Biodiversidad microbiana presente en suelo. ....	1
1.2.- Características del suelo.....	1
1.3.- Tipos de microorganismos presentes en suelo.....	2
1.4.- Beneficios que aportan los microorganismos al suelo .....	2
1.5.- Resguardo del acervo microbiano .....	3
1.6.- ¿Qué son los antibióticos? Y su descubrimiento .....	3
1.7.- Tipos de antibióticos y mecanismo de acción.....	4
1.8.- Genética de la resistencia a antibióticos.....	4
1.9.- Modificación del antibiótico para aumentar su espectro .....	6
1.10.- La resistencia a antibióticos, un problema de salud pública. ....	6
1.11.- Iniciativas actuales para combatir la resistencia a antibióticos .....	8
1.12.- Importancia de la búsqueda de nuevos antibióticos. ....	8
1.13.- Microorganismos, biofábricas productoras de antibióticos.....	9
<b>2.- Hipótesis</b> .....	10
- Objetivo general.....	10
- Objetivos específicos .....	10
<b>3.- Materiales y métodos</b> .....	11
3.1.- Muestreo .....	11
3.2.- Procesamiento y siembra de muestras.....	11
3.3.- Formación del cepario; crioconservación.....	12
3.4.- Prueba de inhibición de crecimiento de bacterias ESKAPE parientes seguros .....	13
a) Estriado cruzado .....	13
b) Prueba Patch - Patch .....	13
3.5.- Cepas sobresalientes en la inhibición de ESKAPE.....	14
3.6.- Tinción de Gram .....	15
3.7.- Identificación de las bacterias por pruebas bioquímicas.....	15
a) Prueba api® 20 E™ .....	15
b) Prueba de movilidad y gelatinasa .....	15
c) Prueba de lipasa .....	16
3.8.- Prueba de compatibilidad .....	16
3.9.- Extracción en crudo de metabolitos secundarios bacterianos (MS).....	16
a) Antibiogramas .....	17



3.10.- Identificación molecular .....	18
a) Extracción de DNA en bacterias .....	18
b) Reacción en cadena de la polimerasa “PCR” .....	19
c) Análisis filogenético.....	19
<b>4.- Resultados.....</b>	<b>20</b>
4.1.- Toma de muestra.....	20
4.2.- Procesamiento y siembra de muestras.....	21
4.3.- Formación del cepario; crioconservación.....	22
4.4.- Prueba de inhibición de crecimiento de bacterias ESKAPE parientes seguros .....	32
a) Estriado cruzado .....	32
b) Prueba Patch – Patch .....	34
4.5.- Cepas sobresalientes en la inhibición de ESKAPE.....	35
4.6.- Identificación por tinción de Gram.....	37
4.7.- Identificación de las bacterias por pruebas bioquímicas .....	37
a) Prueba api® 20 E™ .....	37
b) Prueba de movilidad y gelatinasa .....	38
c) Prueba de lipasa .....	38
4.8.- Prueba de compatibilidad .....	40
4.9.- Extracción en crudo de metabolitos secundarios bacterianos .....	40
a) Extracción .....	40
b) Antibiograma.....	40
4.10.- Identificación molecular de las bacterias seleccionadas del cepario. .	46
<b>5.- Discusión.....</b>	<b>50</b>
5.1.- Toma y procesamiento de muestra.....	50
5.2.- Prueba de inhibición de crecimiento de bacterias ESKAPE parientes seguros .....	50
5.3.- Efecto antibiótico de los metabolitos secundarios.....	52
5.4.- Identificación molecular .....	52
5.4.1.- <i>Priestia megaterium</i> .....	53
5.4.2.- <i>Enterobacter asburiae</i> .....	54
5.4.3.- <i>Klebsiella variicola</i> .....	56
5.4.4.- <i>Serratia nematodiphila</i> .....	57
5.5.- Análisis filogenéticos.....	58
<b>6.- Conclusiones.....</b>	<b>60</b>
<b>7.- Perspectivas .....</b>	<b>61</b>

<b>8.- Referencias.....</b>	<b>62</b>
<b>9.- Apéndice.....</b>	<b>70</b>

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Desglose del significado en la nomenclatura del cepario.....	12
<b>Tabla 2.</b> Código de clasificación para el cepario .....	22
<b>Tabla 3.</b> Base de datos del cepario .....	23
<b>Tabla 4.</b> Desempeño de las bacterias del cepario con mayor capacidad de inhibición de crecimiento contra bacterias EPS .....	36
<b>Tabla 5.</b> Resultados de pruebas bioquímicas .....	39
<b>Tabla 6.</b> Resultados de morfología bacteriana e identificación por pruebas API .....	39
<b>Tabla 7.</b> Prueba de compatibilidad .....	40
<b>Tabla 8.</b> Prueba de inhibición con MS a bacterias EPS .....	45
<b>Tabla 9.</b> Prueba de inhibición con MS a bacterias EPS .....	45
<b>Tabla 10.</b> Identificación molecular de las bacterias productoras de MS con actividad antibiótica .....	56

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Mecanismos de resistencia bacteriana y blancos de acción .....	4
<b>Figura 2.</b> Representación de la genética de resistencia a antibióticos .....	6
<b>Figura 3.</b> Proyección de cantidad de muertes atribuidas a RAM en el mundo..	8
<b>Figura 4.</b> Esquematación del estriado cruzado .....	13
<b>Figura 5.</b> Esquematación de la prueba Patch – Patch .....	14
<b>Figura 6.</b> Muestras de suelo y tipo al que corresponden; a) Campus Aeropuerto (arcilloso), b) La Calera (arcilloso), c) Panindícuaro (franco arcilloso) y d) Los Naranjos (franco) .....	21
<b>Figura 7.</b> Ejemplos de morfologías obtenidas en distintos medios. a) Agar nutritivo b) Agar cerebro corazón c) Agar actinomicetos .....	23
<b>Figura 8.</b> Imágenes representativas de la prueba estriado cruzado .....	34
<b>Figura 9.</b> Prueba Patch – Patch en medio BHI. Bacteria ESKAPE 830 en la base de la caja Bacterias MRB#3 (posición 2), MRB#5 (posición 3), MRB#22 (posición 5), MAB#1 (posición 7), MMN#9 (posición 8) y MRN#3 (posición 10). La placa se incubó a 28 °C por 24 horas .....	35
<b>Figura 10.</b> a) MRB#3 diplococos Gram negativos (muestra de suelo de raíz de maíz) objetivo 100X. b) MAA#2 bacilos Gram negativos (muestra suelo de campus aeropuerto) objetivo 100X .....	37
<b>Figura 11.</b> MRB#5 prueba API 20-E .....	38
<b>Figura 12.</b> MAN#7 prueba API-20E .....	38
<b>Figura 13.</b> a) Ejemplo de prueba gelatinasa positiva (bacteria 7) y negativa (bacteria 5). b) Resultado de la prueba de lipasa mostrando reacciones positivas al mostrar un halo blanco alrededor de las colonias (bacterias 4, 7 y 8) .....	39
<b>Figura 14.</b> Pruebas de inhibición contra ESKAPE usando los metabolitos secundarios extraídos. Antibiótico 1: MS de la bacteria MRB#3. Antibiótico 2: MS de la bacteria MPA#6. Antibiótico 3: MS de la bacteria MRB#5. Antibiótico 4: MS de la bacteria MRB#22 ... ..	44
<b>Figura 15.</b> Electroforesis de la PCR mostrando la amplificación del gen 16S ADNr.....	46
<b>Figura 16.</b> A) Árbol Filogenético de la bacteria MFB#3. B) Árbol Filogenético de la bacteria MPA#6. C) Árbol Filogenético de la bacteria MRB#22. D) Árbol Filogenético de la bacteria MAN#7.....	47

## **1.- Introducción**

### **1.1.- Biodiversidad microbiana presente en suelo.**

El estudio de los suelos con respecto al conocimiento de su microbiota ha representado un recurso importante dentro de la agricultura; debido a la relación que se atribuye de un suelo “sano” dependiendo de la presencia y concentración de diferentes componentes ya sea químicos, físicos y biológicos con respecto a la presencia de comunidades de microorganismos, lo cual indica que el sustrato es fértil para un cultivo en específico. Sin embargo, desde una perspectiva integral observamos que el aislamiento y estudio de los miembros de esta microbiota nos permite ampliar su uso en aplicaciones ambientales, industriales y farmacéuticos (Rodríguez et al., 2018).

En un suelo sano se estima que por un gramo de suelo seco se encuentran entre  $10^6$  -  $10^8$  de bacterias y  $10^4$  –  $10^5$  de hongos, estos valores son mayores en la rizosfera debido a las sustancias orgánicas que liberan las raíces (Osorio-Vega, N. W., 2009). A su vez, la cantidad de estos microorganismos dependen de la profundidad a la cual se haga el muestreo (a mayor profundidad, menor diversidad), observando una curva decreciente debido al cambio de factores como pH, humedad, minerales, oxígeno (Carrillo, 2013).

### **1.2.- Características del suelo**

El suelo es la capa más superficial de la corteza terrestre donde ocurren interacciones biológicas, está constituido de 4 componentes: materia mineral, agua, aire y material orgánico. Existen 12 órdenes de suelo en los que hay hasta 19,000 series de suelo pero, una regla general para clasificarlos depende de la proporción de las siguientes características:

- Textura
  - Arena: partículas gruesas, una gran proporción de esto ocasiona un suelo suelto, bajas reservas de nutrientes y se satura con poca agua mientras que seca rápidamente.
  - Limo: gránulos de tamaño medio, se conglomeran y se disgregan fácilmente al generar presión.

- Arcilla: partículas finas con gran retención de agua, no se drenan ni se secan fácilmente y contienen buenas reservas de nutrientes.
- Color (depende de los minerales por los que se compone):
  - Rojos: óxido de hierro
  - Negros: altos contenidos de materia orgánica y óxido de hierro
  - Grises: exceso de sales alcalinas y deficiencia de hierro
  - Amarillos: óxidos de hierro con mucha agua
- pH
  - Alcalino
  - Neutro
  - Ácido

(Tarbuck & Lutgens. 2005; Sanchoyarto, 2020; FAO. 2010)

### **1.3.- Tipos de microorganismos presentes en suelo**

En el suelo es posible encontrar una amplia gama de microorganismos de los que destacan bacterias, hongos, actinomicetos, cianobacterias, algas, virus y protozoarios. Los que presentan una mayor diversidad son las bacterias, sin embargo, hay géneros que predominan en el ambiente como lo son: *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Rhizobium* y *Arthrobacter*. En el caso de los actinomicetos se pueden encontrar: *Nocardia* y *Streptomyces* (Benintende y Sánchez, 2009; y Osorio-Vega, 2009).

### **1.4.- Beneficios que aportan los microorganismos al suelo**

Su rol principalmente está enlazado a procesos biogeoquímicos (como los ciclos de: C, O, N, P y S), degradación de materia orgánica, asociación simbiótica (con raíces de plantas para protección y obtención de nutrientes) y de manera artificial son utilizados como agentes biorremediadores al ser capaces de detoxificar moléculas de diferentes metales pesados, la degradación de moléculas estables y por ello se ocupan como biofertilizantes en cultivos agrícolas especialmente en leguminosas por su capacidad de crear micorrizas, la cual es un tipo de simbiosis en la que producen sustancias inhibitorias de fitopatógenos e incluso pueden sintetizar fitohormonas para beneficiar al

huésped que a cambio les proporciona un hábitat donde establecerse (Osorio-Vega, 2009; Pavone, 2022).

### **1.5.- Resguardo del acervo microbiano**

Los ceparios bacterianos actúan como un recurso genético desde su desarrollo en el siglo XIX, en el cual se preserva diversidad biológica y disponemos de ella para actividades diversas, por ejemplo, usos comerciales (Universidad Pedagógica Nacional, s.f.). Cabe destacar que los ceparios se rigen bajo las características de microbiostasis; manteniendo inactivo al agente (no crece y tampoco se reproduce) y homogéneo con la finalidad de preservar la integridad del mismo en las características “microscópica, macroscópica, bioquímica, fisiológica y genética” puesto que es esencial para evitar variaciones fenotípicas o mutaciones (Gutiérrez et al., 2015). Conforme nuestras necesidades económicas y metas de uso, preservación a corto o largo plazo (Piazza, s. f.). Aunque existe una tendencia en la que los laboratorios disponen de una colección propia de ceparios, lo más común es que su conformación incluya géneros bacterianos exclusivamente; lo cual aporta información puntual, pero tienden a componerse con integrantes limitados, contrastante con colecciones microbiológicas dedicadas a morfotipos bacterianos que han empezado a figurar como una opción.

### **1.6.- ¿Qué son los antibióticos? Y su descubrimiento**

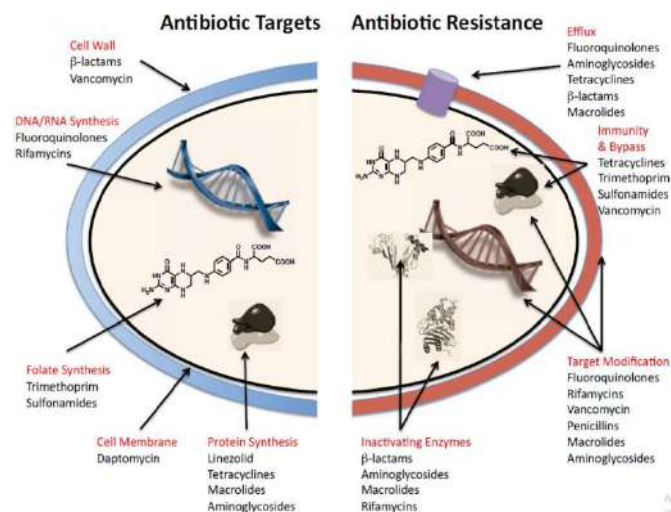
Desde el punto de vista antropocéntrico, los antibióticos son moléculas con capacidades bactericidas y se usan como tratamiento para enfermedades infecciosas. Altamente usadas en el área de la medicina dado que nos permiten eliminar bacterias patógenas de un organismo. Claro ejemplo es la penicilina, el primer antibiótico aplicado a humanos con fines terapéuticos, producto del hongo del género *Penicillium*. Cualidad que descubrió Alexander Fleming. Esto provocó un gran cambio en la segunda guerra mundial, controlando y contrarrestando las infecciones bacterianas que podrían ocurrir en los heridos de la guerra (Giraldo, 2021., Del Arco, 2014).

Sin embargo, Fleming advirtió los riesgos de la resistencia a antibióticos, pero no fue tomado en cuenta. Años más tarde se reportaron los primeros casos de

resistencia a antibióticos en bacterias. La causa fue su uso excesivo en hospitales, ganaderías e incluso su empleo en la vida diaria, con la automedicación, se contribuye a que las bacterias desarrollen resistencia contra estos antibióticos. Aunado a ello, la falta de desarrollo de nuevos antibióticos por parte de la industria farmacéutica incrementa la problemática, en la que actualmente hay bacterias resistentes a casi todos los antibióticos comerciales. Estas bacterias son denominadas pandrogoresistentes, multidrogoresistentes, o coloquialmente y de manera general, resistentes a antibióticos (González et al., 2019).

### 1.7.- Tipos de antibióticos y mecanismo de acción

Los antibióticos se dividen en grupos los cuales son: betalactámicos, aminociclitolos, lincosamidas, rifamisinias, glucopéptidos, estreptograminas, fenicoles, tetraciclinas, sulfonamidas, diaminopirimidinas, fluoroquinolonas, ionóforos, nitrofuranos y nitroimidazoles. Los mecanismos de acción de éstos se dividen en las siguientes regiones de ataque (**Figura 1**): pared bacteriana, membrana bacteriana síntesis de proteínas y síntesis de ácidos nucleicos (FAO, 2023).



**Figura 1.** Mecanismos de resistencia bacteriana y blancos de acción. Lozano, 2019.

### 1.8.- Genética de la resistencia a antibióticos

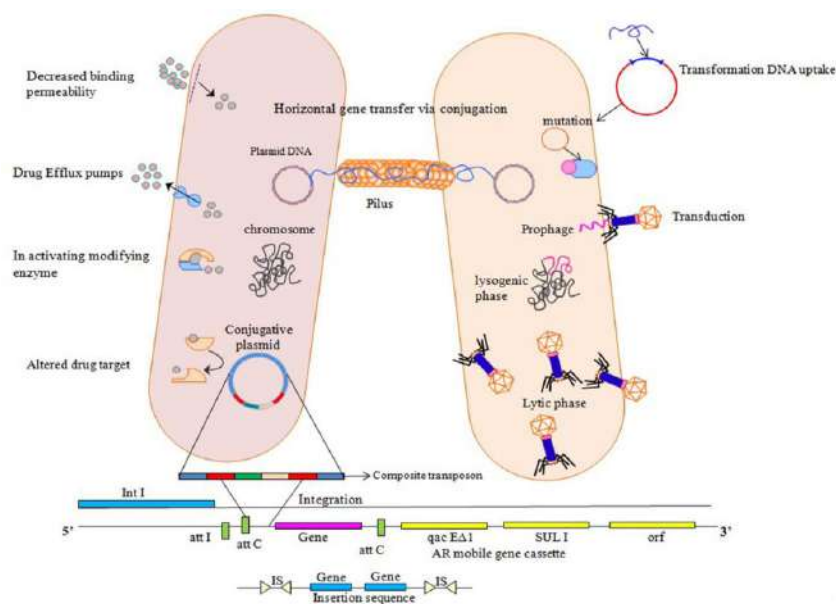
Para que una bacteria desarrolle resistencia a antibióticos existen diferentes mecanismos genéticos (**Figura 2**) como son:

- Transformación: fragmentos de ADN externo entran al interior de las bacterias y se acopla al ADN propio tomando y sintetizando las



particularidades del ADN externo. En este caso, no existe contacto físico entre dos microorganismos ya que el ADN externo puede tomarse de una célula muerta o de un plásmido.

- Transducción: el ADN obtenido proviene de un virus. En este caso se da una interacción física entre el virus y el hospedero. Debido a la necesidad de replicación del virus (bacteriófago) este infecta a la célula en la cual hará el proceso y a veces parte del ADN de la bacteria se mezcla con el ADN viral provocando que, al volver a infectar otra célula, este ADN del primer hospedero llegue y se acople al ADN del segundo hospedero.
- Transposición: un gen ya existente en el ADN principal se copia y “salta”, conocido como transposón el cual actúa por la acción de la enzima transposasa, esta reconoce regiones de secuencias repetidas e invertidas, cortando la sección y liberándola para su re inserción entre ellos puede ser un plásmido que puede intercambiarse fácilmente por medio de otros mecanismos genéticos.
- Conjugación: existe un donante y un receptor para la transferencia de material genético por medio de un pili, formándose el tubo de conjugación en el que el gen se transfiere (generalmente se transfieren plásmidos), a veces estos plásmidos contienen un ADN llamado factor de fertilidad el cual codifica para la formación del pili sexual dando la capacidad a quien lo tenga de transferir su ADN a otra célula (Bruslind, 2020).



**Figura 2.** Representación de la genética de resistencia a antibióticos. Sultan, 2018.

A partir de estos procesos se pueden compartir diferentes mecanismos de resistencia, de los cuales destacan 6 y se dividen en 3 grupos: a) Inactivación del antibiótico; destrucción o modificación de la estructura química del antibiótico por enzimas. b) Alteración del sitio blanco del antibiótico; altera el sitio donde actúa el antibiótico gracias a modificaciones en la permeabilidad de la pared y membrana celular, así como subunidades ribosomales 50S o 30S, además, pueden inducir la sobreexpresión del sitio blanco para disminuir el efecto. c) Alteración de barreras de permeabilidad; a partir de cambios en los receptores bacterianos específicos para antibióticos o debido a alteraciones estructurales en la permeabilidad de la membrana celular, además de la expresión de bombas de eflujo las cuales expulsan el antibiótico de la célula y finalmente la creación de biofilm la cual actúa como barrera aislando a la bacteria del ambiente (Calderón et al., 2016; Khan Academy, 2017).

### **1.9.- Modificación del antibiótico para aumentar su espectro**

Se han buscado diferentes maneras para eliminar a las bacterias resistentes a antibióticos, dando como resultado las siguientes opciones: modificar las moléculas con actividad antibiótica ya existentes, desarrollar compuestos que inhiban los mecanismos de resistencia, desarrollo de compuestos que actúen como adyuvantes, implementar el uso de bacteriófagos y descubrimiento de nuevos antibióticos. Esta última, es una situación compleja ya que es un área poco desarrollada en el mundo y abandonada por la industria farmacéutica desde hace algunos años (Cárdenas et al., 2018).

### **1.10.- La resistencia a antibióticos, un problema de salud pública.**

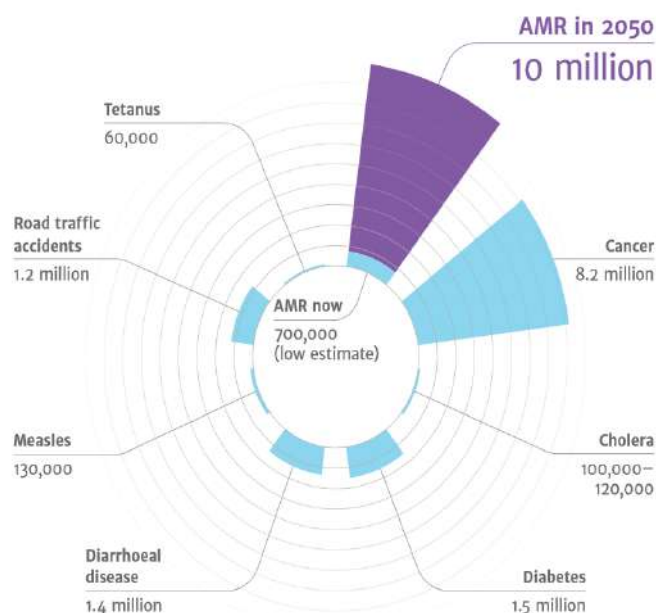
Actualmente, la OMS ha descrito a un grupo de 6 bacterias como aquellas que es urgente la atención para el desarrollo de nuevos antibióticos, debido a la crisis política, económica y de salud pública. Dicho grupo recibe el nombre de ESKAPE, cabe mencionar que estos 6 patógenos son resistentes a múltiples fármacos; el acrónimo ESKAPE represente a: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp. (Pérez, 2020; Guevara et al., 2021).

La creación de un nuevo antibiótico *de novo* implica un gasto económico fuerte con un costo aproximado de 2,500 millones de dólares por fármaco, así como una gran inversión de tiempo, aproximadamente de 10 a 15 años (Weber, 2021), su fase de desarrollo consiste en diversas etapas iniciando por el descubrimiento del fármaco que engloba la selección de la diana, la búsqueda y optimización de la molécula y la evaluación de sus características. Posteriormente se hace el desarrollo preclínico en el cual se determina la farmacocinética, análisis de toxicidad y formulación en seres no humanos. Una vez realizado lo anterior se empieza el desarrollo clínico que posee pruebas en humanos para conocer la tolerabilidad del antibiótico, los efectos secundarios, su eficacia y dosis observando los efectos a largo plazo y su efecto en una población. Al final si se pasan todos los estándares se aprueba su producción y su posicionamiento en el comercio (Ritter et al., 2020).

Debido a que el tiempo de desarrollo y prueba es muy largo, se opta por la modificación estructural de antibióticos ya existentes en el mercado, denominándoles como “generaciones”. Sin embargo, la reserva de antibióticos no es suficiente pues la resistencia a estas se lleva a cabo con una rapidez de tan solo 11 días aproximadamente por parte de las bacterias (Srakocic, 2022).

La creciente tasa de resistencia bacteriana ha impactado mundialmente causando millones de muertes como se refleja en diversos estudios que a pesar de diferir en las cifras, han generado preocupación por la gran cantidad de muertes que presentan (**Figura 3**). Conforme el Diario Oficial de la Federación (DOF, 2022), en la estrategia nacional de acción contra la resistencia a los antimicrobianos se analizó que en el proyecto GRAM (Global Research on Antimicrobial Resistance) del 2019 en 204 países las muertes asociadas a infecciones bacterianas resistentes a antimicrobianos son 4.95 millones de las cuales 1.27 fueron relacionadas directamente con la RAM: 100,000 por *S. aureus* y 50,000 a *E. coli*, *A. baumannii* y *K. pneumoniae* cada uno (DOF, 2022). Mientras que en el estudio realizado por “GBD Antimicrobial Resistance Collaborators” en el mismo año, se cuantificó que de 13.7 millones de muertes relacionadas a infecciones bacterianas, 7.7 millones estuvieron asociadas a bacterias resistentes a antibióticos, lo cual ejemplifica la magnitud de este

problema de salud pública (GBD 2019 Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022).



**Figura 3.** Proyección de cantidad de muertes atribuidas a RAM en el mundo. O’Neil, 2016.

### 1.11.- Iniciativas actuales para combatir la resistencia a antibióticos

Debido a la problemática actual la Organización Mundial de la Salud ha liderado varias iniciativas a nivel mundial, entre ellas se destacan la “Semana Mundial de Concienciación sobre el Uso de los Antibióticos”, el “Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos”, la “Alianza Mundial para la Investigación y el Desarrollo de Antibióticos” y el “Grupo de coordinación interinstitucional sobre la resistencia a los antimicrobianos” (OMS, 2023).

### 1.12.- Importancia de la búsqueda de nuevos antibióticos.

A nivel mundial se han implementado iniciativas para encontrar nuevos antibióticos. En el caso del gobierno de USA, se planteó la iniciativa “Tiny Earth” creada en la Universidad de Wisconsin por la Dra. Jo Handelsman, ésta promueve la investigación colectiva de jóvenes e instituciones a nivel mundial sobre la diversidad de bacterias en suelo (dónde la presencia de bacterias con capacidad de producir metabolitos secundarios con efectos antimicrobianos es abundante). La información obtenida se colecta y organiza en una base de datos

única de la misma organización para obtener información de manera global que pueden utilizarse para estos fines. De esta manera se busca contribuir a mitigar la problemática de la resistencia a antibióticos, cuyo combate por la industria farmacéutica ha ido en declive (Hernández, 2018).

Por otro lado, en México se han diseñado y propuesto diferentes planes de trabajo. En el caso de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) desarrolló el Plan Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana (PUCRA) el cual es una organización que recopila información de instituciones de salud, la analiza con ayuda de profesionistas y divulga los datos obtenidos referentes a los casos de resistencia antimicrobiana en México. Mientras que el gobierno mexicano publicó la Estrategia Nacional de Acción Contra la Resistencia a los Antimicrobianos la cual tiene en sus objetivos mejorar la concientización y comprensión de la problemática, reforzar los conocimientos de la misma, reducir la incidencia de las infecciones con medidas preventivas, utilizar de forma óptima los agentes antimicrobianos así como el desarrollo de nuevos medicamentos y su inversión sostenible (DOF, 2022; UNAM, 2019).

### **1.13.- Microorganismos, biofábricas productoras de antibióticos**

Como anteriormente se mencionó, la búsqueda de nuevos antibióticos ha tenido una mayor relevancia partiendo de bacterias principalmente aisladas en suelo. En el caso del suelo asociado a plantas, encontramos la zona de la rizosfera. En esta región se han reportado la presencia de organismos que secretan antibióticos de manera natural como método de defensa contra otros microorganismos; ya sea por competencia de espacio, nutrientes, por ejemplo: *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Pantoea agglomerans* y el género *Streptomyces*. Este último es conocido por ser organismos ampliamente distribuidos en el suelo y originan más del 70 % de los antibióticos conocidos (Carrillo, 2013; Parada, 2017).

## **2.- Hipótesis**

Las características intrínsecas del suelo y su entorno impactan en la diversidad bacteriana. Algunas de las bacterias allí presentes producen antibióticos que inhiben el crecimiento de bacterias ESKAPE parientes seguros.

### **- Objetivo general**

- Aislar, identificar y conservar morfotipos bacterianos provenientes de muestras de suelo para analizar su capacidad de producir metabolitos secundarios con capacidad antimicrobiana.

### **- Objetivos específicos**

- Establecer un cepario a partir de bacterias aisladas de muestras de suelo con características contrastantes.
- Seleccionar e identificar bacterias capaces de producir antimicrobianos que antagonicen bacterias ESKAPE parientes seguros.
- Preparar extractos crudos de metabolitos secundarios de las bacterias de interés para probarlos contra los parientes seguros.
- Caracterizar e identificar a nivel bioquímico las bacterias seleccionadas.
- Realizar la identificación molecular de las bacterias que presentaron mayor capacidad para inhibir las bacterias ESKAPE parientes seguros.

### **3.- Materiales y métodos**

#### **3.1.- Muestreo**

Durante la estación de verano 2022 en los Estados de Guanajuato, Michoacán y Querétaro se delimitaron dos puntos de muestreo predominantes en vegetación del tipo “selva baja caducifolia” y “matorral templado”; para la obtención de suelo en una zona preservada y otra perturbada (en ambos casos se realizó un reporte de la ubicación en coordenadas y condición del terreno: tipo de vegetación, tipo - textura de suelo y valor de pH). Así mismo se obtuvo material de tierras de cultivos conocidas por su manejo orgánico.

Partiendo de un diseño de muestreo cuadrulado (con límite externo de 5 m x 5 m en el área de trabajo) se llevó a cabo la extracción del suelo con “muestreo compuesto” al azar para cada sitio de investigación (lo cual resultó en dos muestras de análisis); a partir de 15 submuestras obtenidas por parcela, donde cada una tuvo el peso de 200 gramos y se extrajo a 10 cm de profundidad con un muestreador cilíndrico. Finalizada la toma se homogeneizaron las submuestras en una sola bolsa plástica rotulada y fue resguardada dentro de una hielera (para prevenir el cambio abrupto en las condiciones de humedad y temperatura de la muestra) (Facultad de Ciencias Agropecuarias, 2015). Las muestras que no se utilizaron inmediatamente se almacenaron en refrigeración a condiciones de 5 – 10 °C por no más de 24 horas (Vargas, 2015).

#### **3.2.- Procesamiento y siembra de muestras**

Se secaron ambas muestras de análisis (formando una capa fina) de manera independiente sobre una superficie estéril de papel y/o plástico a humedad y temperatura ambiente por mínimo 24 horas para minimizar la actividad biológica. Posteriormente se tamizó el suelo en malla de 2 mm y el almacenamiento de éste se resguardó en recipientes de plástico con su respectiva identificación: número de muestra, fecha y tamaño del tamizaje (Facultad de Ciencias Agropecuarias, 2015).

Para el procesamiento de muestras se realizaron diluciones seriadas decimales con agua destilada estéril, de las cuales se sembraron 100 µl de cada dilución (el uso de éstas varió conforme la carga bacteriana presente en cada

suelo, empleando desde la dilución 1:100 hasta 1:10,000) en tres agares distintos: nutritivo (AN), infusión cerebro corazón (BHI) y actinomicetos, las placas se incubaron a 28 °C por 24 a 48 horas. Posteriormente, aquellas placas que presentaron crecimiento bacteriano fueron marcadas y seleccionadas para aislar colonias cuya morfología no se repita en la misma caja, de manera que obtuvimos cultivos puros de los que se realizó la respectiva descripción de morfología colonial, éstas fueron clasificadas en código con el cual se creó la base de datos para la siguiente fase experimental **Tabla 1** (Mau et al., 2011).

<b>Tabla 1.</b> desglose del significado en la nomenclatura del cepario. Cada columna hace alusión a una letra/simbología que mantiene cada cepa bacteriana almacenada en el laboratorio de microbiología molecular.				
Muestra	Origen	Medio de cultivo	#	Cifra
M	A(Aeropuerto)	N (Agar nutritivo)	#	Número de morfotipo
	F(Frijol)			
	R(Raíz de maíz)			
	M(Maíz)	B (Agar BHI)		
	1(R.P.;mix mancha oscura y anaranjada)			
	2(R.P.;agua y sedimento)	A (Actinomicetos)		
	3(R.P.;estromatolito, planta y zona semi-seca)			
	4(R.P.;zona seca, profundidad 30 cm)			

Ejemplo: Muestra + Origen + Medio + # + Número.

El mismo proceso fue repetido con todas las muestras y se cuantificó en ambos casos la cantidad de morfotipos bacterianos para cada tipo de suelo.

### 3.3.- Formación del cepario; crioconservación

Las colonias de interés se recuperaron en el medio correspondiente al cual crecieron. Posteriormente se preparó un cultivo líquido utilizando 5 ml de caldo nutritivo (CN) en un tubo cónico de 50 ml. Las colonias de interés se inocularon de manera independiente y se incubaron a 28 °C por 24 horas a 150 rpm. Posteriormente, en campana de flujo laminar, en tubos de plástico estériles con capacidad 1.5 ml previamente rotulados con su respectivo código; se vertieron 400 µl de glicerol estéril a cada tubo y se agregaron 900 µl del cultivo homogeneizado en vortex por 1 minuto y cada tubo se guardó en orden sucesivo en un compartimento de una caja de cartón para crioconservación (se repitió el proceso para cada morfotipo) (Gutiérrez et al., 2015; Piazza, s. f.). Finalmente se almacenaron en el ultracongelador a -75 °C.

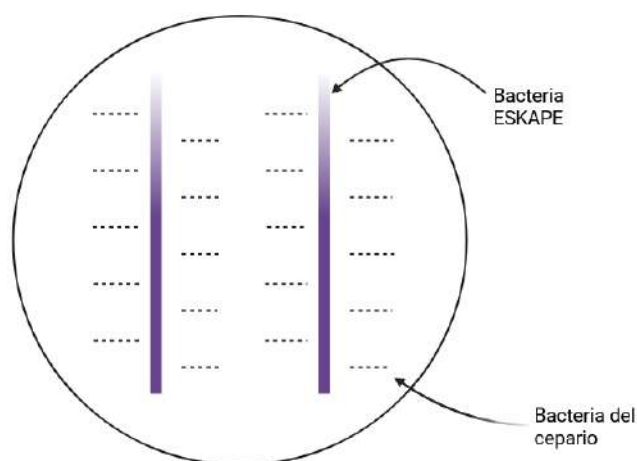


### 3.4.- Prueba de inhibición de crecimiento de bacterias ESKAPE parientes seguros

#### a) Estriado cruzado

Para seleccionar las bacterias del cepario con potencial inhibitorio contra las bacterias ESKAPE parientes seguros (EPS) se usó la técnica de inhibición por estriado cruzado, que consiste en sembrar las EPS en estriado primario (para ello se tomó la bacteria EPS ajustada a DO de 1.0 esparciendo con ayuda de un hisopo estéril al centro de la caja usando los medios AN y BHI, mientras que perpendicularmente se realizan pequeñas estrías (con una distancia entre estas de aproximadamente 5 a 6 mm) a la cual corresponde cada bacteria que conforma el cepario, (**Figura 4**). La placa se incubó por un lapso de 24 horas a 28 °C, esto con el objetivo de observar la capacidad de la bacteria para inhibir el crecimiento de la bacteria EPS.

Una vez que se determinó cuáles bacterias del cepario son capaces de inhibir en mayor medida a las bacterias EPS y a mayor número de éstas, se seleccionaron para su posterior identificación bioquímica y molecular (Egas-Rosero, 2016).



**Figura 4.** Esquematización del estriado cruzado

#### b) Prueba Patch - Patch

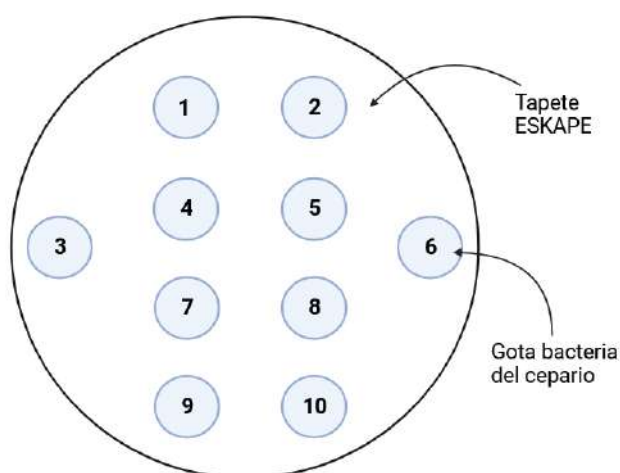
Para confirmar la actividad inhibitoria por parte de las bacterias del cepario creado se usó la prueba Patch – Patch, en la que se hizo lo siguiente: se inocularon en CN las EPS y bacterias con resultados positivos de inhibición, se incubaron por 24 horas a 28 °C con 150 rpm. Pasado el tiempo de incubación se

ajustó la densidad óptica a 0.2 (DO<sub>600</sub>) para las EPS y 1 para las bacterias productoras de antimicrobianos para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{(cantidad\ en\ \mu l\ deseada * densidad\ óptica\ deseada)}{valor\ de\ la\ cepa} =$$

**cantidad de cepa a añadir + completar con medio líquido**

Para las EPS se distribuyeron 200  $\mu$ l a manera de tapete con ayuda de un hisopo estéril previamente humedecido por 5 segundos con agua destilada estéril. Posteriormente, se inocularon gotas de 10  $\mu$ l de las bacterias productoras de antimicrobianos en disposición circular en dirección de las manecillas del reloj (máximo 10 por caja) (**Figura 5**). Una vez secas, las placas se incubaron a 28 °C por 24 horas. La presencia de un halo de inhibición alrededor de la bacteria probada, indica un resultado positivo.



**Figura 5.** Esquematización de la prueba Patch - Patch

### 3.5.- Cepas sobresalientes en la inhibición de ESKAPE

Todos los resultados se recopilaron usando el programa Excel para crear un resumen de las bacterias sobresalientes del cepario, así como el efecto inhibitorio observado en cada una de las EPS.

### **3.6.- Tinción de Gram**

Las bacterias seleccionadas en el apartado anterior se identificaron como Gram + o – utilizando la tinción de Gram con el siguiente proceso: tomar una muestra de la colonia y realizamos un frotis sobre un portaobjetos con una gota de agua destilada y fijar la muestra al calor, cuando ésta esté seca iniciar el tren de tinción. Utilizar cristal violeta por 60 segundos, seguir con lugol por 60 segundos, después enjuagar con alcohol al 70 % en un lapso de 10 a 15 segundos, por último, verter safranina por 60 segundos (enjuagar con agua destilada entre cada colorante). Observar al microscopio e identificar la morfología celular (González, et al., 2015)

### **3.7.- Identificación de las bacterias por pruebas bioquímicas**

#### **a) Prueba api® 20 E™**

Se siguió la metodología indicada en el manual de la prueba comercial api® 20 E™ y se usó su software para obtener los porcentajes de similitud con los géneros arrojados del resultado visto en las tiras reactivas.

#### **b) Prueba de movilidad y gelatinasa**

Se prepararon tubos de ensayo de vidrio con medio SIM para movilidad (por cada 1000 ml, 3.5 g agar, 20 g peptona de caseína, 6.1 g peptona de carne, 0.2 g sulfato de hierro y amonio, 0.2 g tiosulfato de sodio. pH final  $7.3 \pm 0.2$ ) y gelatina bacteriológica (gelatinasa) aproximadamente 5 ml en cada uno. Para la prueba gelatinasa (BDBioxon®); por cada 1000 ml, 5 g peptona de gelatina, 3 g extracto de carne, 120 g gelatina. pH final  $6.8 \pm 0.2$ ). Posteriormente se inocularon con ayuda de un asa bacteriológica por punción en ambos casos. Se incubaron a 28 °C por 72 a 96 horas. Pasado este lapso los tubos en la prueba de gelatinasa se refrigeraron por 24 horas y se observó la licuefacción del medio en una prueba positiva y en el caso de la negativa, presenta consistencia sólida, se incluyó como control un tubo de medio fresco sin inocular. Para la prueba de movilidad se analizó que el crecimiento de la bacteria se presente fuera de la punción en la que se realizó la inoculación (Fernández, 2010).

### **c) Prueba de lipasa**

Se inocularon las bacterias seleccionadas en una cuadrícula en una caja de medio producción de lipasas (peptona 10 g/L, agar 20 g/L, NaCl 5 g/L, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.1 g/L y Tween 80 10 ml/L) por estría simple, se incubaron a temperatura ambiente por una semana, cuando la prueba de lipasa es positiva, se forma un halo blanco alrededor de la colonia debido a la capacidad de degradar lípidos (Fernández, 2010).

### **3.8.- Prueba de compatibilidad**

Se seleccionaron aquellas bacterias capaces de inhibir el crecimiento del mayor número de EPS. Cada una de ellas se sembraron 200 µl a manera de tapete en cajas de agar Müller Hinton a partir de un cultivo líquido (DO<sub>600</sub> 0.2, 1x10<sup>7</sup> UFC/mL). Una vez seco el tapete, se dispensó una gota de 15 µl (DO<sub>600</sub> 1) por cada bacteria a probar a manera circular. Las placas se incubaron a 28 °C por 24 horas. Posteriormente se determinó el crecimiento de cada una de las bacterias sobre el tapete, o bien la presencia de un halo de inhibición. Las bacterias que presentaron compatibilidad se usaron para formar consorcios (Batra et al., 2020).

### **3.9.- Extracción en crudo de metabolitos secundarios bacterianos (MS)**

Se seleccionaron aquellas bacterias de interés, a partir de una colonia con crecimiento de 24 horas en AN, se tomó una muestra con palillo de madera estéril y se inoculó en 5 ml de CN en un tubo estéril tipo Falcon de 50 ml y se incubó a 28 °C por 24 horas a 150 rpm. Posteriormente se vertió un volumen de 200 µl de inóculo a forma de tapete en una caja de agar BHI y se repitió el proceso hasta tener 8 cajas, se incubaron a 28 °C por 72 horas. Una vez pasado el tiempo se recortó el agar en cuadrados de aproximadamente 5 mm y se depositó en un frasco Schott de 500 ml con tapa con el contenido de 4 cajas cada uno (2 frascos en total por cada cepa), los frascos se cubrieron con papel aluminio. Se congelaron las muestras a -75 °C por 48 horas. Después se atemperó y se agregó un volumen 120 ml de solvente (acetato de etilo para un frasco y hexano para otro) más 60 ml de agua destilada estéril en cada frasco, se agitó por 24 horas a 100 rpm.

Al finalizar el tiempo de agitación se filtró el contenido en un embudo con magitel para recuperar la parte líquida. Con un embudo de separación se recuperó la fase orgánica (aprox. 110 ml) en un matraz Erlenmeyer (en la que se encuentran los metabolitos extraídos por el solvente), dependiendo de la densidad del solvente ubicamos en qué zona está situada la fase orgánica. Se resguardó a -20 °C envuelto en aluminio hasta su uso.

Con ayuda de un rotaevaporador se eliminó el solvente excedente hasta tener aproximadamente 3 ml del concentrado, éste se recuperó a un matraz de 25 ml previamente pesado con su respectivo etiquetado y torunda para conocer el contenido total en mg de metabolitos recuperados, para ello se colocaron los matraces a baño maría para evaporar todo el solvente y se pesó, el proceso se repitió para cada frasco. Con la siguiente fórmula se determinó la cantidad de MS obtenida, preparándola a una concentración 5,000 µg/µl, usando como solvente metanol 70 %:

$$\frac{\text{peso en seco en } \mu\text{g}}{50 \mu\text{l}} = \text{cantidad de solvente a añadir en } \mu\text{l}$$

Los MS obtenidos se conservaron a -20 °C para realizar los antibiogramas.

#### **a) Antibiogramas**

Se realizaron pruebas de inhibición de crecimiento (efecto antimicrobiano) para determinar la efectividad de los MS obtenidos. Para ello se sembraron las bacterias EPS en medio líquido (CN) a 28 °C por 24 horas a 150 rpm. Posteriormente se inocularon cajas de agar Müller Hinton (medio diseñado para observar sensibilidad frente antimicrobianos debido a que no contiene sustancias inhibitorias como lo es el ácido p-amino benzoico conocido por anular la reproductibilidad bacteriana) con 200 µl de la bacteria EPS (una por caja), el cultivo se ajustó a una densidad óptica de 0.2 a 600 nm, éste volumen se distribuyó a manera de obtener un tapete bacteriano con ayuda de un hisopo estéril previamente sumergido en agua destilada estéril y se dejó secar en la campana de flujo laminar. Una vez seco se colocaron 5 discos de papel filtro estéril de 6 mm de diámetro en los que se colocaron los respectivos MS en diferentes cantidades, como control se incluyó metanol al 70 %. Las placas se incubaron a 28 °C por 24 horas, se observó la presencia de halos de inhibición

formados alrededor de los discos, éste se midió con ayuda de un Vernier (Ramírez, 2016; Caycedo, 2021).

### **3.10.- Identificación molecular**

#### **a) Extracción de DNA en bacterias**

A partir del cultivo puro de cada una de las bacterias de interés en 50 ml de CN obtenido de un día anterior (incubado con 150 rpm de agitación a 28 °C por 24 horas), se centrifugó la muestra a 6,500 rpm a 23 °C por 6 minutos para obtener la pastilla al fondo del tubo cónico (se descartó la fase líquida). La muestra se resguardó en ultracongelador a -75 °C.

Se retiró el material del ultracongelador al igual que la muestra. Se congeló el mortero y pistilo con suficiente nitrógeno líquido. Se colocó la pastilla de células en el mortero, se trituró hasta crear un polvo fino y uniforme agregando tanto nitrógeno líquido como fuese necesario. Posteriormente se traspasó el material molido a un tubo de 1.5 ml (previamente congelado con nitrógeno líquido).

A cada muestra se agregaron 200 µl de TSNTE (Tritón x-100 2 %, SDS 1 %, NaCl 100mM, Tris pH=8 10 mM, EDTA 1mM) al igual que perlas de vidrio (45 µM), así como 300 µl de fenol-cloroformo, se llevó a vortex por 3 a 4 minutos pasado este tiempo se añadieron 200 µl de TE (Tris pH=8 10 mM, EDTA 1mM). Se centrifugó a 13 krpm por 8 minutos, se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo, esta fase se enjuagó con 500 µl de cloroformo y se centrifugó a 13 krpm por pulsos, al terminar se tomó el sobrenadante. A esta fase se le agregó 1 ml de etanol al 100 % frío, se mezcló invirtiendo el tubo. Se incubó por una hora a -20 °C, al finalizar se centrifugó a 13 krpm por 8 minutos, se descartó el sobrenadante y se re-suspendió la pastilla en 400 µl de TE con 30 µl RNAsa (2 mg/ml) y se incubó a 37 °C por 20 minutos. Después se añadieron 10 µl de acetato de sodio 4M y 1 ml de etanol al 100% frío, se mezcló e incubó una vez más a -20 °C por 5 minutos, posteriormente se centrifugó a 12 krpm por 8 minutos. Se descartó el sobrenadante, luego se añadieron 400 µl de etanol al 70% para desprender la pastilla y se centrifugó a 13 krpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante. Se colocó el tubo boca abajo sobre una sanita para

secar el DNA, para su disolución se agregó agua grado biología molecular entre 50-100  $\mu$ l, 30 segundos a vortex, y se incubó a 70 °C por 5 minutos. Una vez disuelto el DNA se cuantificó en Nanodrop (utilizando 2  $\mu$ l) y se realizó una muestra de 5  $\mu$ l en gel de agarosa. La electroforesis se corrió a 100 voltios por 40 minutos y se observó en un fotodocumentador. Finalmente se prepararon 100  $\mu$ l de solución de DNA a 25 ng/ $\mu$ l (Hoffman & Winston, 1987; Universidad de Puerto Rico, 2013).

### **b) Reacción en cadena de la polimerasa “PCR”**

Se mezcló 7.5  $\mu$ l de mix de reacción con 5  $\mu$ l de solución DNA (25 ng/ $\mu$ l) en tubos para PCR para tener un volumen final de 12.5 ml. El contenido del mix es: 4.925  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O, 1.25  $\mu$ l de buffer, 0.375 de MgCl<sub>2</sub>, 0.30  $\mu$ l de dNTPs, 0.15  $\mu$ l de Taq DNA polimerasa recombinante y 0.5  $\mu$ l (100 ng/ $\mu$ l) de oligonucleótidos para el fragmento del gen ribosomal 16S: 27F. AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG y 1492 RTAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T.

Se centrifugó y se colocó en el termociclador bajo las siguientes condiciones de amplificación: 94 °C - 3 minutos, 94 °C - 30 segundos, 62 °C - 30 segundos, 72 °C - 1:50 minutos (35 x), 72 °C - 5 minutos. Posteriormente se corrió en electroforesis (5  $\mu$ l de producto de PCR), una vez observada la banda del tamaño esperado, se preparó la muestra para secuenciación (Hernández, 2018). Los productos de PCR amplificados se limpiaron con el Kit “Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit” según lo indicado por la casa comercial.

### **c) Análisis filogenético**

Las secuencias obtenidas del LANGEBIO, se analizaron usando el programa BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), posteriormente se alinearon las secuencias a probar usando el programa MUSCLE, las secuencias se depuraron usando los programas Mesquite 3.81 y MEGA 11.0.13 al finalizar se hizo el análisis heurístico, Bootstrap/Jackknife y Neighbor-Joining test usando los programas Mr. Bayes y MEGA 11.0.13.

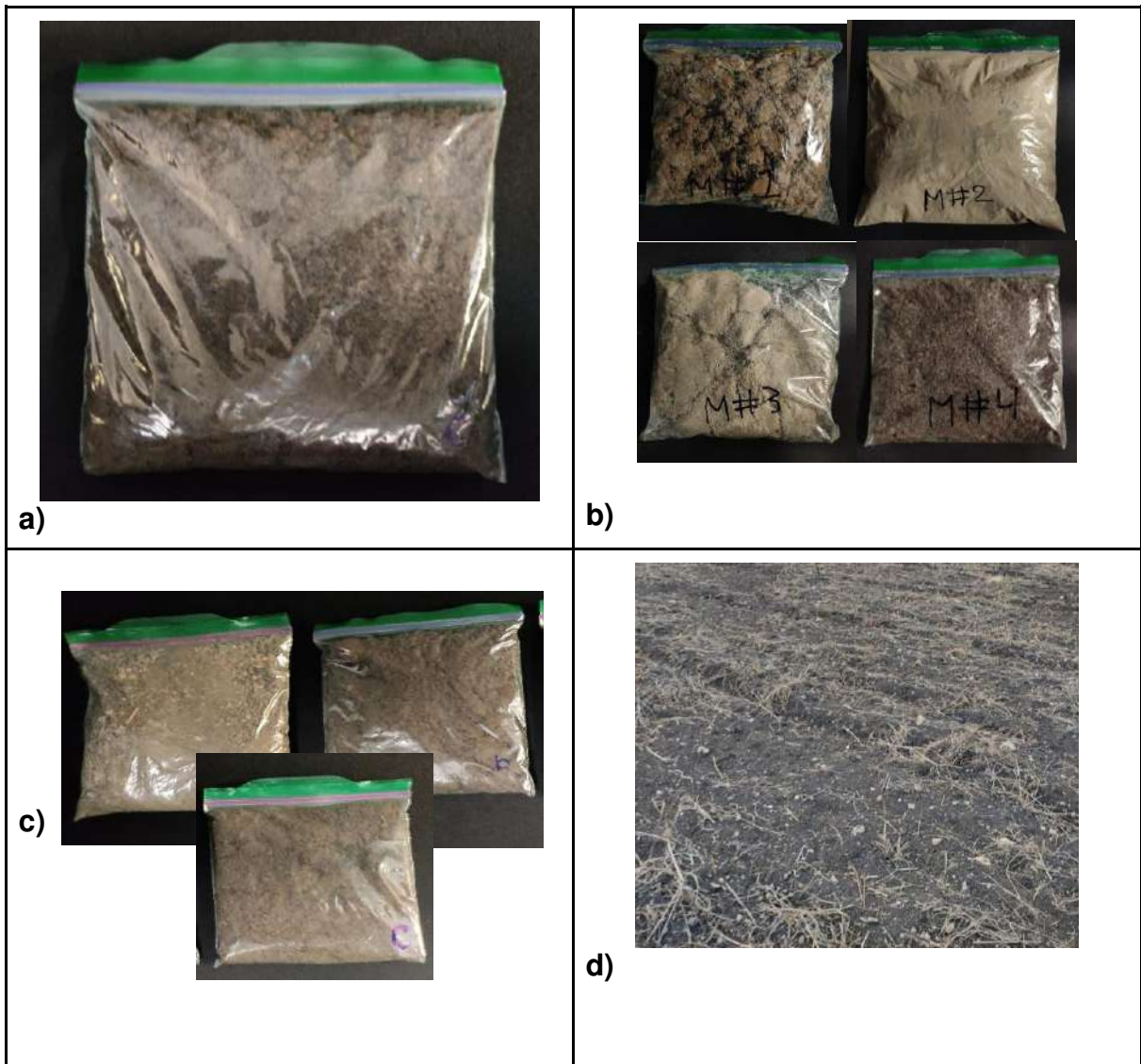
## 4.- Resultados

### 4.1.- Toma de muestra

Las muestras se colectaron en cuatro puntos de interés, correspondientes a:

- Ejido Bolaños, Santiago de Querétaro, Qro. - Campus Aeropuerto (Universidad Autónoma de Querétaro): tierra conservada. Coordenadas: 20°37'25.5" N 100°21'58.2" O, tipo de suelo: arcilloso, pH: 6, tipo de vegetación: selva baja caducifolia, altitud: 1977 msnm y características: muestra por debajo de un mezquite, sin cuerpos de agua cercanos (recolectado en junio de 2022).
- La Calera, Irapuato, Gto.: tierra conservada. Coordenadas: 20°25'45.1" N 101°14'53.4" O, tipo de suelo: arcilloso, pH: 9, tipo de vegetación: selva baja caducifolia, altitud: 1680 msnm y características: cuerpo de agua presente (por temporada) y cercanía a plantas halófilas (recolectado en julio de 2022).
- Panindícuaro, Michoacán: tierra perturbada por cultivo. Coordenadas: tipo de suelo: franco arcilloso, pH: 4, tipo de vegetación: matorral templado, altitud: 1800 msnm y características: obtenido de una zona de cultivo, aún con restos de vegetación correspondiente a maíz y frijol (muestras diferentes entre sí) (recolectado en julio de 2022).
- Rancho el Naranjo, Conzá, Qro.: tierra perturbada por cultivo. Coordenadas: 21°26'57.3" N 99°38'00.6" O, tipo de suelo: franco, pH: 6, tipo de vegetación: selva baja caducifolia, altitud: 564 msnm y características: obtenido de una zona de cultivo en rotación (tierra en reposo) (recolectado en agosto de 2022) (**Figura 6**).





**Figura 6.** Muestras de suelo y tipo al que corresponden; a) Campus Aeropuerto (arcilloso), b) La Calera (arcilloso), c) Panindícuaro (franco arcilloso) y d) Los Naranjos (franco).

#### 4.2.- Procesamiento y siembra de muestras

Se prepararon diluciones decimales hasta 1:10,000 partiendo de 1 g de suelo diluyendo con agua destilada estéril. Para la siembra, se utilizó agar nutritivo (AN), actinomicetos y BHI (Brain Heart Infusion), las placas se incubaron a 28 °C por 24 h. Se seleccionó aquella dilución que contuviera aproximadamente 30 a 300 unidades formadoras de colonia (UFC). La mejor distribución de las UFC se obtuvo en la dilución de 1:10,000 en la mayoría de los casos. Sin embargo, para

las muestras de “La Calera” fue necesario usar la dilución 1:100 debido a la baja cantidad de UFC obtenidas en muestras más diluciones.

#### 4.3.- Formación del cepario; crioconservación

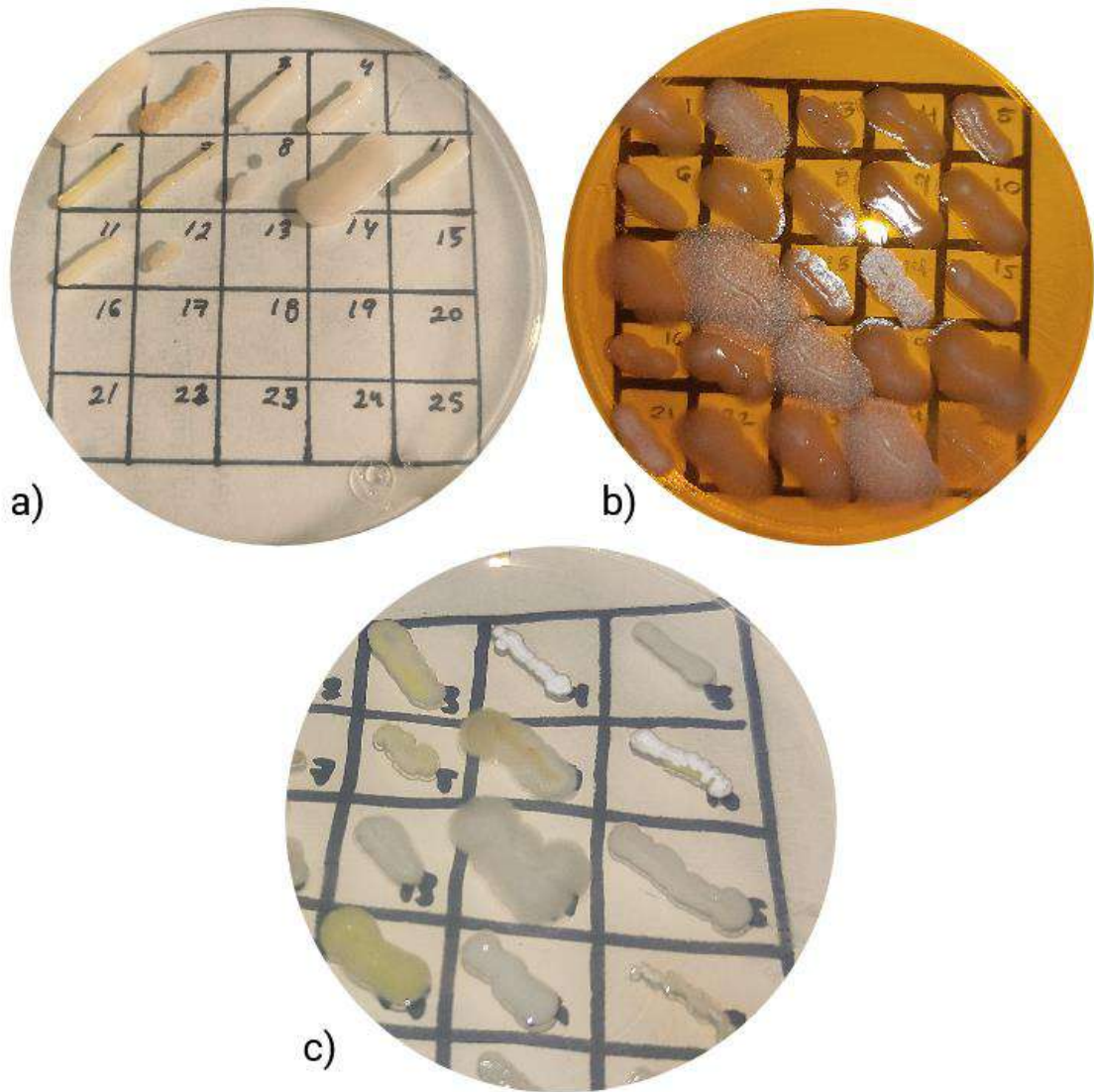
Una vez que se obtuvo el crecimiento de las diferentes muestras y en los diferentes medios de cultivo, se obtuvo un total de 148 morfotipos bacterianos en los tres medios utilizados.

Para su almacenamiento y organización, se creó el siguiente código (**Tabla 2**):

<b>Tabla 2. Código de clasificación para el cepario.</b>				
Muestra + lugar de muestreo + medio de cultivo + # + número de celda de crecimiento				
M	(A) Campus aeropuerto	(N) Agar nutritivo	#	1 - 25
	(F) Muestra de cultivo de frijol			
	(M) Muestra de cultivo de maíz			
	(R) Muestra de raíz de maíz			
	(1) Muestra 1	(B) Agar BHI		
	(2) Muestra 2			
	(3) Muestra 3			
	(4) Muestra 4	(A) Agar actinomicetos		
	(N) Muestra de cultivo de naranjal			
	(P) Muestra de cultivo en pausa			

De los morfotipos encontrados, se seleccionaron aquellos que presentaron una diferencia morfológica marcada entre cada colonia y se criopreservaron. Para

ello se utilizaron los criterios de selección: forma, borde, tamaño, pigmentación, transparencia, brillo, textura, elevación y consistencia. (**Figura 7, Tabla 3**).



**Figura 7.** Ejemplos de morfologías obtenidas en distintos medios. a) Agar nutritivo b) Agar cerebro corazón c) Agar actinomicetos

<b>Tabla 3.</b> Base de datos del cepario.				
<b>Grupo</b>	<b>Medio</b>	<b>Muestra</b>	<b>Colonia</b>	<b>Descripción de colonia</b>
Primeras muestras	BHI	Maíz	3	Circular, borde entero, opaca, brillante, lechoso, liso, convexo, suave
			9	Circular, borde entero, opaca, brillante, lechoso/grisáceo, liso, convexo, suave
			10	Mediana, circular, borde entero, opaca, brillante, lechoso, liso, elevada, suave

		Raíz de maíz	3	Pequeña, circular, entero, opaca, brillante, lechosa/grisácea, lisa, convexa, suave	
			5	Circular, entero, opaca, brillante, lechosa, lisa, elevada, suave	
			11	Grande, irregular, ondulado, transparente, no pigmentada (ligeramente lechoso), lisa, elevada, suave	
			22	Circular, entero, opaca, brillante, lechoso/grisáceo, lisa, convexa, suave	
		Frijol		1	Pequeña, circular, entero, opaca, brillante, cafésosa, lisa, elevada, suave
				3	Circular, entero, opaca, brillante, cafésosa/lechosa, lisa, convexa, suave
				5	Circular, entera, opaca, brillante, blanca, lisa, convexa, suave
				14	Circular, entera, opaca, brillante, cafésosa, lisa, elevada, suave
				18	Circular, entera, opaca, brillante, blanca con bordes cafés, lisa, convexa, suave
		Aeropuerto		1	Forma irregular, borde ondulado, brillante, medio lechosa transparente, lisa, convexa, mucóide
				2	Forma irregular, borde rizado, sin brillo, color blanquecino, textura rugosa, elevada, dura
				3	Forma circular, borde entero, brillante, color cafésoso, textura lisa, convexa, mucóide
				9	Forma irregular, borde rizado, brillante, color cafésoso, textura lisa, convexa, mucóide
				25	Forma irregular, borde ondulado, brillante, blanquecino, liso, convexa, suave
		Agar Nutritivo	Maíz	1	Irregular, borde rizado, opaca, ligeramente brillante, lechoso, rugosa, elevada, dura

			4	Irregular, borde rizado, transparente, brillante, amarillo/naranjosa, rugosa, plana, dura
			5	Circular, borde entero, opaca, sin brillo, lechoso, rugosa, elevada, dura
			6	Circular, borde entero, opaca, brillante, lechoso, lisa, elevada, suave
			9	Irregular, borde ondulado, transparente, brillante, lechosa, rugosa, elevada, dura
			12	Circular, borde entero, transparente, brillante, no pigmentada, lisa, convexa, mucosidad
			16	Circular, entera, opaca, sin brillo, lechosa/grisácea, rugosa, elevada, dura
	Raíz de maíz		1	Irregular, rizado, transparente, no pigmentada, rugosa, plana, suave
			2	Circular, entero, transparente, brillante, no pigmentada, lisa, elevada, suave
			3	Irregular, rizado, transparente, no pigmentada, rugosa, elevada, suave
			5	Circular, entero, transparente, brillante, ligeramente lechosa, lisa, elevada, suave
			6	Irregular, rizado, opaca, brillante, anaranjada, lisa, elevada, suave
			8	Circular, entero, transparente, brillante, ligeramente lechosa, lisa, elevada, suave
			9	Irregular, rizada, transparente, brillante, amarilla, rugosa, elevada, dura
			13	Circular, entero, transparente, brillante, lechosa, lisa, elevada, suave
			16	Irregular, rizada, opaca, sin brillo, ligeramente lechosa, rugosa, convexa, suave
			18	Irregular, rizada, opaca, brillante, lechosa, lisa, convexa, suave
			24	Circular, entero, opaca, lechoso/grisáceo, rugosa, convexa, suave

			25	Irregular, ondulado, transparente, brillante, no pigmentada, rugosa, elevada, suave
		Frijol	1	Circular, entera, opaca, brillante, lechosa, lisa, convexa, suave
			2	Circular, entera, opaca, brillante, lechosa/cafesoso, lisa, convexa, suave
			3	Circular, entera, opaca, brillante, lechosa/grisáceo, lisa, convexa, suave
			5	Irregular, ondulado, opaca, brillante, lechosa, lisa, elevada, suave
			8	Irregular, ondulado, opaca, brillante, lechosa/grisácea, lisa, elevada, suave
			12	Irregular, rizado, opaca, brillante, lechosa/anaranjada, lisa, elevada, suave
			22	Irregular, ondulada, opaca, brillante, lechosa, rugosa, elevada, suave
		Aeropuerto	1	Forma irregular, borde rizado, opaca, sin brillo, blanquecino, rugosa, elevada, dura
			2	Forma circular, borde entero, brillante, color lechoso, textura lisa, elevada, mucosidad
			3	Forma irregular, borde rizado, transparente, sin brillo, medio lechoso/grisáceo, convexa, suave
			4	Forma circular, borde entero, transparente, brillante, medio lechoso/grisáceo, elevada, suave
			5	Forma irregular, borde rizado, transparente, sin brillo, medio lechoso/grisáceo, plana, dura
			7	Forma irregular, borde rizado, transparente, medio opaco, medio lechoso/grisáceo, convexa, suave
			10	Forma circular, borde entero, opaca, brillante, lechosa, convexa, suave
			11	Forma irregular, borde ondulado, opaca, brillante, lechoso/grisáceo, rugosa, elevada, dura

			14	Grande, forma circular, borde entero, opaco, sin brillo, blanquecino/grisáceo, convexa, dura	
			20	Forma irregular, borde rizado, transparente, sin brillo, lechosa/grisácea, rugosa, convexa, dura	
			21	Forma circular, borde entero, opaca, sin brillo, lechosa/grisácea, lisa, convexa, suave	
			23	Forma circular, borde entero, opaca, brillante, lechosa, convexa, mucoide	
			25	Forma irregular, borde ondulado, opaca, brillante, blanca, lisa, convexa, suave	
	Agar Actinomicetos	Maíz		1	Circular, entera, opaca, brillante, lechosa, lisa, elevada, suave
				2	Grande, forma irregular, borde ondulado, opaca, sin brillo, lechosa/grisácea, lisa, elevada, suave
				10	Circular, entera, opaca, brillante, lechosa, lisa, convexa, suave
		Raíz de maíz		1	Irregular, rizado, opaca, brillante, lechosa, lisa, elevada, suave
				6	Irregular, ondulado, transparente, brillante, no pigmentada, lisa, convexa, suave
				8	Irregular, ondulado, opaco, brillante, lechosa, lisa, convexa, suave
				9	Circular, entera, transparente, brillante, amarilla, rugosa, elevada, suave
		Frijol		1	Circular, entero, opaca, brillante, lechoso, lisa, convexa, suave
				2	Puntiforme, circular, entero, transparente, brillante, no pigmentada, lisa, plana, suave
3	Circular, entera, opaca, brillante, lechosa/anaranjada, lisa, elevada, suave				
14	Circular, entera, opaca, brillante, lechosa/grisácea, lisa, convexa, suave				

		Aeropuerto	1	Forma irregular, borde ondulado, opaca. Brillante, amarilla, lisa, elevada, suave
			2	Forma irregular, borde rizado, opaca, brillante, blanca, rugosa, convexa, suave
			3	Circular, borde entero, opaca, brillante, amarilla, lisa, convexa, suave
			4	Circular, borde entero, opaca, sin brillo, blanco, polvoso, elevada, dura
			5	Circular, borde entero, opaca, sin brillo, lechoso/grisáceo, lisa, elevada, suave
			6	Circular, entero, opaca, brillante, lechosa/grisácea, lisa, convexa, suave
			9	Irregular, borde rizado, opaca, brillante, color lechoso/amarillento, lisa, convexa, suave
			14	Circular, borde entero, opaca, brillante, lechosa/grisácea, lisa, convexa, suave
			17	Circular, borde entero, transparente, brillante, amarilla, lisa, elevada, suave
			18	Circular, borde entero, opaca, brillante, amarilla, lisa, convexa, suave
			19	Circular, borde entero, opaca, brillante, lechosa, lisa, convexa, suave
Ronda 2	Agar Nutritivo	Aeropuerto	2	Irregular, rizada, opaca, brillante, anaranjada/rojiza, rugosa, convexa, suave
			6	Circular, entera, opaca, brillante, lechosa/amarillenta, lisa, elevada, suave
			12	Circular, entera, opaca, brillante, lechosa/cafesosa, lisa, elevada, suave
	Agar Actinomicetos	Maíz	1	Irregular, ondulada, opaca, brillante, lechosa, lisa, elevada, suave
		Frijol	3	Circular, entera, opaca, brillante, lechosa, lisa, plana, suave
La Calera	BHI	Muestra 1	-	-
		Muestra 2	2	Circular, entero, transparente, brillante, ligeramente cafésoso, lisa, elevada, suave



			3	Irregular, ondulado, transparente, no pigmentada, lisa, plana, suave	
			4	Circular, entera, opaca, brillante, amarilla, lisa, elevada, suave	
			5	Circular, entera, transparente, brillante, ligeramente lechosa, lisa, elevada, suave	
			6	Irregular, lobulado, transparente, no pigmentada, lisa, plana, suave	
			7	Irregular, ondulada, opaca, sin brillo, lechosa, lisa, crateniforme, suave	
		Muestra 3	-	-	
		Muestra 4	1	Grande, irregular, ondulado, opaco, brillante, lechoso, liso, elevado, suave	
			2	Mediana, circular, entero, opaco, brillante, lechoso, liso, convexo, suave	
			3	Circular, entero, opaco, brillante, lechoso/cafesoso, liso, convexo, suave	
			8	Grande, irregular, ondulado, opaco, brillante, lechoso/cafesoso, liso, convexo, suave	
		Agar Nutritivo	Muestra 1	1	Grande, irregular, ondulado, transparente, no pigmentado, rugosa, plana, dura
				3	Irregular, ondulado, transparente, no pigmentado, rugosa, plana, dura
			Muestra 2	-	-
			Muestra 3	1	Pequeño, circular, entero, transparente, brillante, no pigmentado, liso, convexo, suave
				2	Circular, entero, opaco, brillante, lechoso, liso, convexo, suave
7	Circular, entero, opaco, brillante, lechoso/grisáceo, liso, convexo, suave				
Muestra 4	1		Circular, entero, opaco, brillante, anaranjado/lechoso, liso, convexo, suave		
	2		Circular, entero, opaco, brillante, lechoso, liso, convexo, suave		

			3	Puntiforme, Circular, entero, transparente, brillante, no pigmentada, lisa, plana, suave		
			7	Irregular, ondulado, opaca, brillante, lechoso, elevada, suave		
	Agar Actinomicetos	Muestra 1	1	Circular, entero, opaco, brillante, lechoso, liso, plana, suave		
			5	Circular, entero, opaco, brillante, lechoso/grisáceo, liso, convexo, suave		
			8	Grande, irregular, ondulado, transparente, amarillo, rugoso, plana, suave		
		Muestra 2	1	Circular, entero, opaco, brillante, lechoso, liso, convexo, suave		
			3	Irregular, ondulado, opaco, brillante, naranjoso/rojizo, liso, convexo, suave		
			9	Circular, entero, opaco, brillante, naranjoso/rojizo, liso, convexo, suave		
		Muestra 3	1	Circular, entero, opaco, brillante, lechoso/amarillo, liso, elevado, suave		
			2	Circular, entero, opaco, brillante, amarillo, liso, convexa, suave		
			4	Puntiforme, circular, entero, opaco, brillante, blanco, liso, convexo, suave		
			6	Circular, entero, opaco, brillante, lechoso, liso, elevado, suave		
			12	Puntiforme, circular, entero, opaco, brillante, lechoso, liso, convexo, suave		
			17	Circular, entero, opaco, brillante, lechoso/amarillo, liso, convexo, suave		
		Muestra 4	2	Circular, entera, opaca, brillante, lechosa, lisa, elevada, suave		
			3	Circular, entera, opaca, brillante, grisácea, lisa, elevada, suave		
			5	Irregular, ondulada, opaca, brillante, amarilla, lisa, convexa, suave		
			25	Irregular, ondulada, opaca, brillante, grisácea, lisa, elevada, suave		
		Concá	Agar Nutritivo	Naranja	1	Irregular, rizado, opaca, sin brillo, sin pigmento, lisa, plana, suave

			2	Irregular, entera, opaca, sin brillo, sin pigmento, lisa, convexa, suave	
			3	Circular, entera, opaca, brillante, sin pigmento, lisa, convexa, mucoide	
			5	Irregular, rizado, opaca, brillante, blanca, lisa, convexa, suave	
			6	Circular, entera, opaca, brillante, blanca, lisa, convexa, mucoide	
			8	Irregular, rizado, opaca, brillante, blanca, lisa, convexa, mucoide	
			9	Circular, entera, opaca, brillante, blanca, lisa, convexa, suave	
		Pausado	1	Circular, rizado, opaca, brillante, blanca, lisa, convexa, mucoide	
			2	Circular, entera, opaca, brillante, blanca, lisa, convexa, mucoide	
			4	Circular, rizado, opaca, brillante, blanca, lisa, convexa, suave	
			5	Circular, entera, opaca, sin brillo, lechosa, lisa, elevada, suave	
			8	Circular, entera, opaca, sin brillo, lechosa, lisa, convexa, mucoide	
			10	Pequeña, circular, entera, opaca, sin brillo, blanca, lisa, plana, suave	
		BHI	Naranja	2	Mediana, irregular, ondulada, opaca, sin brillo, blanca, rugosa, convexa, dura
				4	Circular, entera, opaca, sin brillo, blanca, lisa, convexa, mucoide
8	Circular, entera, opaca, sin brillo, lechosa, lisa, elevada, suave				
9	Circular, entera, opaca, sin brillo, blanca, lisa, convexa, mucoide				
Pausado	2		Circular, entera, opaca, sin brillo, blanca/grisácea, lisa, convexa, suave		





			3	Circular, entera, opaca, sin brillo, lechosa, lisa, convexa, suave
			4	Circular, entera, opaca, sin brillo, blanca, lisa, convexa, mucoide
			7	Circular, entera, transparente, sin brillo, lechosa, lisa, plana, suave
	Agar Actinomicetos	Naranja	5	Circular, entera, opaca, sin brillo, lechosa, convexa, dura
			7	Circular, entera, opaca, brillante, blanca, lisa, convexa, mucoide
			9	Pequeña, circular, entera, opaca, sin brillo, amarilla/naranja, lisa, convexa, suave
			10	Pequeña, circular, entera, opaca, sin brillo, blanca, lisa, convexa, suave
			11	Irregular, rizada, opaca, sin brillo, lisa, lechosa, plana, suave
		Pausado	1	Irregular, entera, opaca, brillante, lechosa, lisa, convexa, suave
			6	Irregular, rizado, opaca, brillante, blanca, rugosa, plana, suave
			9	Irregular, rizado, transparente, sin brillo, no pigmentada, plana, suave
11	Circular, entera, opaca, sin brillo, blanca, elevada, suave			


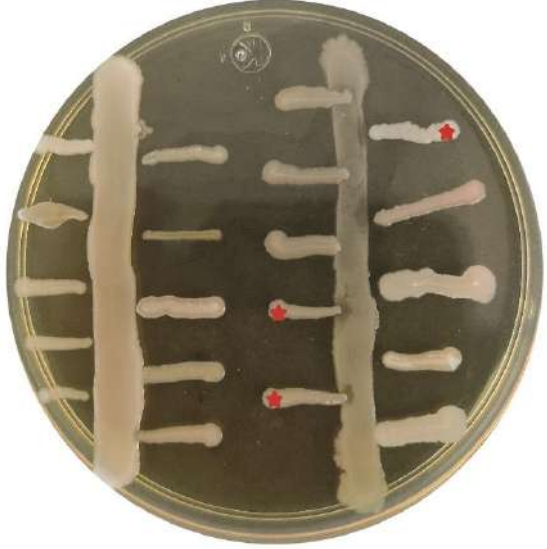
#### 4.4.- Prueba de inhibición de crecimiento de bacterias ESKAPE parientes seguros

##### a) Estriado cruzado

Para determinar la capacidad de las bacterias que conforman el cepario de inhibir el crecimiento de los ESKAPE parientes seguros (EPS), procedimos a realizar la

prueba de estriado cruzado. Con este análisis determinamos que algunas bacterias son capaces de inhibir a varios EPS, puesto que se observó la inhibición del crecimiento de la línea que corresponde a la bacteria EPS, ya que se alteró el óptimo crecimiento (**Figura 8**) para conocer más detalles ver **apéndice 1**.

	
<p><i>E. aerogenes</i> Agar Nutritivo: inhibición por cepa MAB#1 (tercer fila posición 3). Incubado a 27 °C</p>	<p><i>E. aerogenes</i> Agar Nutritivo: inhibición por la cepa MRN#25 (segunda fila posición 4). Incubado a 27 °C</p>
	
<p><i>S. aureus</i> Agar Cerebro Corazón: inhibición por la cepa MAA#3 (tercer fila posición 3). Incubado a 27 °C</p>	<p><i>S. aureus</i> Agar nutritivo: inhibición por la cepa MPB#2 (primer fila posición 1), MPB#3 (primer fila posición 2), MPB#4 (primer fila posición 3), MPB#7 (primer fila posición 4), MNA#5 (segunda fila posición 1), MNA#7 (segunda fila posición 2),</p>

	MNA#9 (segunda fila posición 3), MNA#10 (segunda fila posición 4), MNA#11 (tercer fila posición 1), MPA#1 (tercer fila posición 2), MPA#6 (tercer fila posición 3), MPA#9 (tercer fila posición 4), MPA#11 (cuarta fila posición 1). Incubado a 27 °C
	
<p><i>L. monocytogenes</i> Agar Nutritivo: inhibición por la cepa MPB#7 (primer fila posición 4), MNA#5 (segunda fila posición 1) y MPA#6 (tercer fila posición 3). Incubado a 27 °C</p>	<p><i>S. aureus</i> (primer línea) y 830 (segunda línea) Agar Cerebro Corazón: inhibición por cepa MRB#3 (tercer fila posición 4), MRB#5 (tercer fila posición 5) y MRB#11 (cuarta fila posición 1). Incubado a 27 °C</p>

**Figura 8.** Imágenes representativas de la prueba estriado cruzado.

### b) Prueba Patch – Patch

Otra prueba utilizada para determinar la capacidad de inhibir el crecimiento por parte de las bacterias del cepario fue la prueba de Patch-Patch. Para ello, de las 148 bacterias analizadas por la prueba de estriado cruzado, se seleccionaron 45 morfotipos aislados que mostraron un efecto inhibitorio en las bacterias EPS por estría cruzada. En este caso, se sembró un tapete de la bacteria EPS y sobre ella se colocaron gotas de las bacterias a probar, en aquellas en la que se desarrolla un halo de inhibición, es indicativo de la actividad antimicrobiana de la cepa de interés contra el EPS (**Figura 9**), para conocer más detalles ver **apéndice 2**.



**Figura 9.** Prueba Patch – Patch en medio BHI. Bacteria ESKAPE 830 en la base de la caja Bacterias MRB#3 (posición 2), MRB#5 (posición 3), MRB#22 (posición 5), MAB#1 (posición 7), MMN#9 (posición 8) y MRN#3 (posición 10). La placa se incubó a 28 °C por 24 horas.

#### 4.5.- Cepas sobresalientes en la inhibición de ESKAPE

Posterior a realizar los dos escrutinios, del total de 148 bacterias analizadas, seleccionamos 9 bacterias con morfotipos distintos que demostraron poseer la mejor capacidad de inhibición de crecimiento contra los EPS retados, como criterio de selección se consideró que inhibieran a la mitad o más de las bacterias EPS utilizadas (cinco de los ocho analizados) (**Tabla 4**) Con la información así generada se procedió a realizar los siguientes experimentos con los EPS: *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas putida*, además se incluyeron las siguientes bacterias patógenas de humanos *Listeria monocitogenes*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*. Bacterias de gran importancia en el área clínica y de inocuidad de alimentos.

**Tabla 4.** Desempeño de las bacterias del cepario con mayor capacidad de inhibición de crecimiento contra bacterias EPS.

Muestra	ESKAPE parientes seguros*							
	<i>S. a</i>	<i>E. c</i>	<i>S. e</i>	<i>E. a</i>	<i>B. s</i>	<i>K. p</i>	<i>L. m</i>	<i>P. p</i>
MRB#3	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Red
MRB#5	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Red
MRB#22	Blue	Yellow	Red	Yellow	Yellow	Red	Blue	Red
MFB#3	Yellow	Yellow	Red	Yellow	Blue	Red	Yellow	Red
MRN#3	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Red	Yellow	Red
MRN#25	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Red	Green	Red
MAN#7	Blue	Blue	Green	Yellow	Yellow	Red	Red	Red
MAA#2	Yellow	Red	Green	Yellow	Yellow	Green	Red	Red
MPA#6	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue

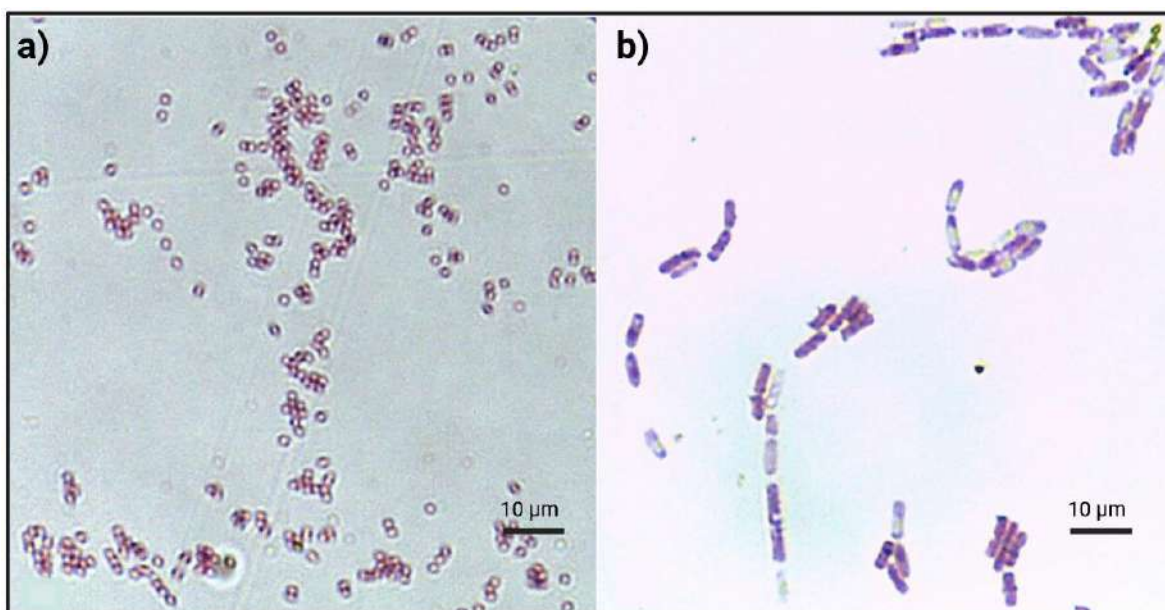
\**S. a* = *S. aureus*, *E. c* = *E. coli*, *S. e* = *S. epidermidis*, *E. a* = *E. aerogenes*, *B. s* = *B. subtilis*, *K. p* = *K. pneumoniae*, *L. m* = *L. monocitogenes* y *P. p* = *P. putida*

Leyenda	
Red	Sin inhibición de crecimiento
Green	Inhibición de crecimiento prueba 1
Yellow	Inhibición de crecimiento prueba 2
Blue	Inhibición de crecimiento prueba 1 y 2



#### 4.6.- Identificación por tinción de Gram

Posterior a analizar los resultados obtenidos de las pruebas de inhibición de crecimiento se determinó que 9 bacterias fueron las más efectivas, para proceder a realizar su identificación, se comenzó con una tinción de Gram. Datos representativos de bacterias MRB#3 y MAA#2 (**Figura 10 y Tabla 4**), para conocer más detalles ver **apéndice 3**.



**Figura 10.** a) MRB#3 diplococos Gram negativos (muestra de suelo de raíz de maíz) objetivo 100X. b) MAA#2 bacilos Gram negativos (muestra suelo de campus aeropuerto) objetivo 100X.

#### 4.7.- Identificación de las bacterias por pruebas bioquímicas

##### a) Prueba api® 20 E™

Para realizar la identificación de las 9 bacterias seleccionadas basado en sus características bioquímicas, se procedió a utilizar las pruebas api®-20E™. Como dato representativo se muestra los resultados obtenidos de las bacterias MRB#5 (**Figura 11**) y MAN#7 (**Figura 12**), para conocer más detalles ver **apéndice 4**. Con esta prueba se obtuvo la identificación preliminar de la bacteria, una vez analizado el bionúmero generado con esta prueba se obtuvo un porcentaje de similitud con otras bacterias (**Tabla 5**).



**Figura 11.** MRB#5 prueba API 20-E.



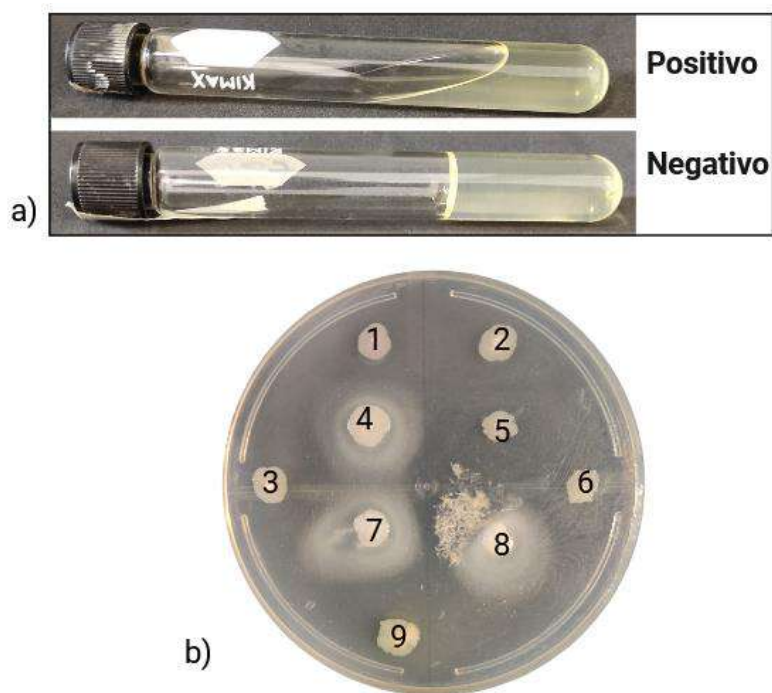
**Figura 12:** MAN#7 prueba API-20E.

### **b) Prueba de movilidad y gelatinasa**

Como complemento a las tiras reactivas de pruebas bioquímicas se realizaron pruebas de movilidad y gelatinasa. Para la prueba de movilidad fue positivo en todos los casos. Para la prueba de gelatinasa, dieron resultados positivos las bacterias 4, 7, 8 y 9 (**Tabla 5, Figura 13**).

### **c) Prueba de lipasa**

Para finalizar las pruebas bioquímicas se determinó la capacidad de degradación de lípidos por medio de la producción de la enzima lipasa. Las bacterias 4, 7 y 8 mostraron resultados positivos ya que desarrollaron un halo blanquecino lo cual indica la producción de lipasa (**Tabla 5. Figura 13**).



**Figura 13.** a) Ejemplo de prueba gelatinasa positiva (bacteria 7) y negativa (bacteria 5). b) Resultado de la prueba de lipasa mostrando reacciones positivas al mostrar un halo blanco alrededor de las colonias (bacterias 4, 7 y 8).

Tabla 5. Resultados de pruebas bioquímicas.									
Bacterias	1	2	3	4	5	6	7	8	9
LIPASA	-	-	-	+	-	-	+	+	-
GELATINASA	-	-	-	+	-	-	+	+	+
MOVILIDAD	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARA	+	+	+	+	+	+	+	-	+
AMY	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MEL	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RHA	+	+	+	+	+	+	-	-	+
SOR	+	+	+	+	+	+	+	+	+
INO	+	+	+	+	+	-	+	+	-
MAN	+	+	+	+	+	+	+	-	+
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GEL	-	-	-	-	-	-	+	+	+
VP	+	+	+	+	+	+	+	-	-
IND	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA	+	+	-	+	-	+	+	+	+
URE	-	-	-	+	-	-	+	-	-
H2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CIT	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ODC	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LDC	-	+	+	+	+	-	+	+	+
ADH	+	+	+	+	+	+	-	+	+
ONPG	+	+	+	+	+	+	+	-	+

Las casillas verdes son pruebas complementarias a las incluidas en las tiras API.

Tabla 6. Resultados de morfología bacteriana e identificación por pruebas API.									
Bacterias	1	2	3	4	5	6	7	8	9
MORFOLOGÍA BACT.	Diplococos	Diplobacilos	Diplobacilos	Bacilos	Estafilococos	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Bacilos
IDENTIFICACIÓN API	<i>E. cloacae</i> 91.4%	<i>E. aerogenes</i> 53.3%	<i>E. aerogenes</i> 53.3%	<i>E. aerogenes</i> 28.4%	<i>E. aerogenes</i> 53.3%	<i>E. cloacae</i> 97.7%	<i>S. marcescens</i> 88.5%	-	<i>E. cloacae</i> 60.6%

#### 4.8.- Prueba de compatibilidad

El crecimiento de 2 bacterias en el mismo espacio estimula la producción de metabolitos secundarios como resultado del estrés por competencia de recursos. Es por esto que se optó por el uso de consorcios bacterianos con el fin de aumentar la síntesis de MS o bien que su composición sea diferente, esto para posteriormente determinar su capacidad inhibitoria de los metabolitos secundarios producidos en el crecimiento de EPS (**Tabla 7**). Posterior a realizar esta prueba, se consolidaron 2 consorcios usando las bacterias MRB#5 y MRB#22 (consorcio 1) y las bacterias MFB#3 y MAN#7 (consorcio 2).

	MRB#3	MRB#5	MRB#22	MFB#3	MRN#3	MRN#25	MAN#7	MAA#2	MPA#6
MRB#3									
MRB#5									
MRB#22									
MFB#3									
MRN#3									
MRN#25									
MAN#7									
MAA#2									
MPA#6									



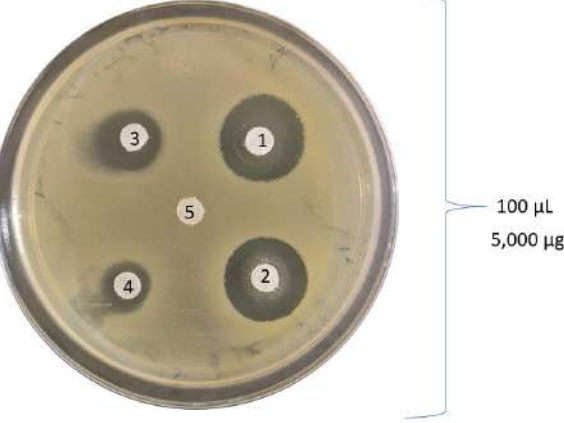

#### 4.9.- Extracción en crudo de metabolitos secundarios bacterianos

##### a) Extracción

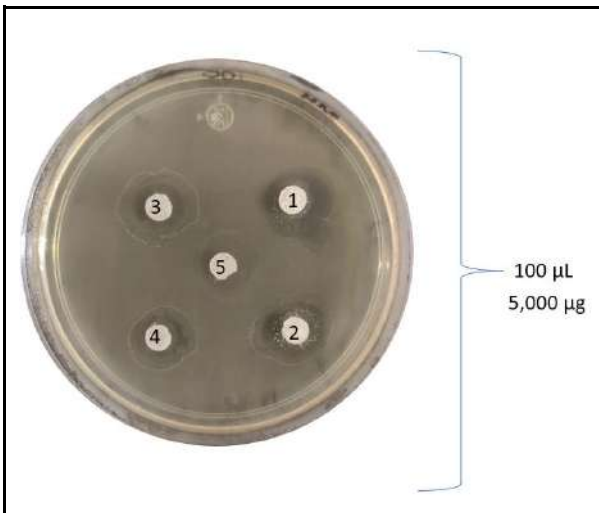
Se extrajeron los metabolitos secundarios de 8 bacterias y 2 consorcios empleando 2 solventes, acetato de etilo y hexano: Los 20 extractos preparados se re-suspendieron en metanol 70 % para su almacenamiento y posterior uso.

##### b) Antibiograma

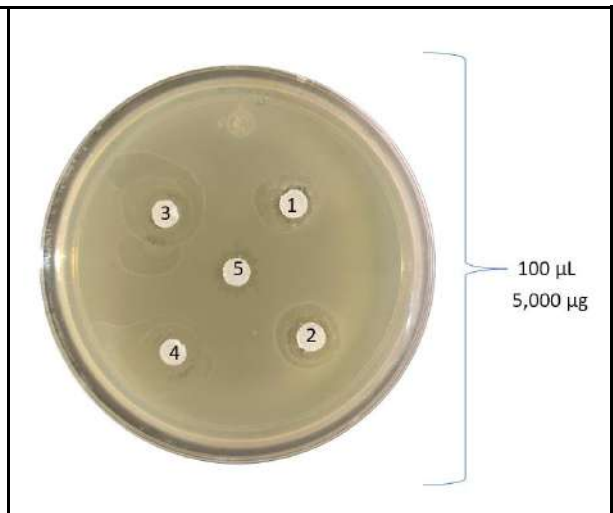
Una vez extraídos los metabolitos secundarios, se procedió a probarlos contra las bacterias EPS para comprobar su efecto inhibitorio de crecimiento usando el método de antibiograma. En la **Figura 14** se muestran los resultados de los MS extraídos de los mejores 9 morfotipos.

	
<p><i>S. aureus</i>: prueba de antibióticos. 1.- MS1 (extraído con acetato de etilo). 2.- MS2 (extraído con acetato de etilo). 3.- MS1 (extraído con hexano). 4.- MS2 (extraído con hexano). 5.- Metanol 70 % (control). Agar Müller Hinton. Se incubaron a 27 °C por 24 horas.</p>	<p><i>S. aureus</i>: prueba de antibióticos a concentración de 100µl. 1.- MS1 (extraído con acetato de etilo). 2.- MS2 (extraído con acetato de etilo). 3.- MS1 (extraído con hexano). 4.- MS2 (extraído con hexano). 5.- Metanol 70% (control). Agar Müller Hinton Se incubaron a 27 °C por 24 horas.</p>
	
<p><i>S. aureus</i>: prueba de antibióticos a concentración de 100µl. 1.- MS3 (extraído con acetato de etilo). 2.- MS4 (extraído con acetato de etilo). 3.- MS3 (extraído con hexano). 4.- MS4 (extraído con hexano). 5.- Metanol 70% (control). Agar Müller Hinton. Se incubaron a 27 °C por 24 horas.</p>	<p><i>E. coli</i>: prueba de antibióticos en 2 concentraciones diferentes. 1.- MS1 (extraído con acetato de etilo). 2.- MS2 (extraído con acetato de etilo). 3.- MS1 (extraído con hexano). 4.- MS2 (extraído con hexano). 5.- Metanol 70% (control). Agar Müller Hinton. Se incubaron a 27 °C por 24 horas.</p>

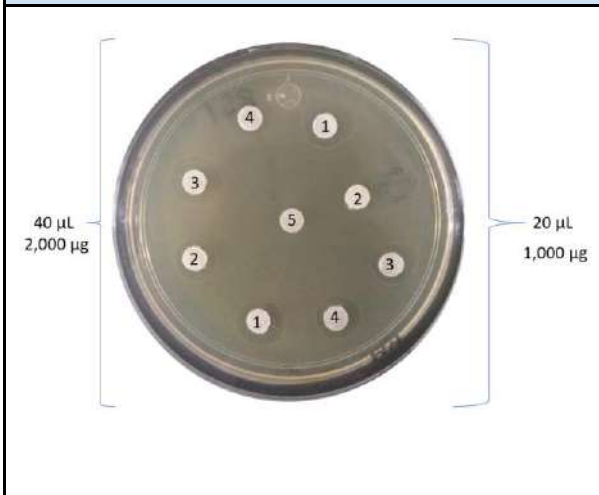




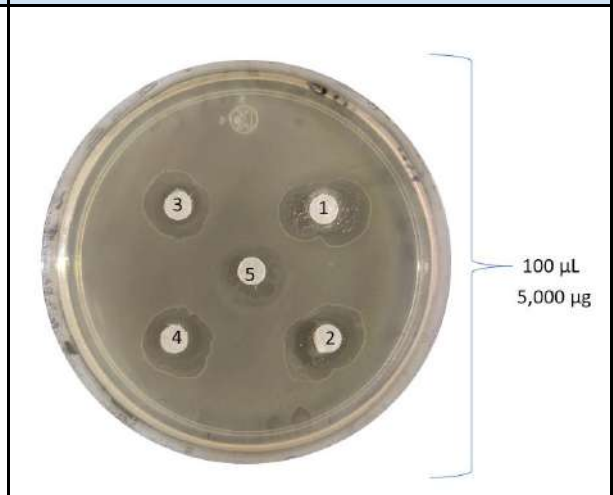
*E. coli*: prueba de antibióticos a concentración de 100µl. 1.- MS1 (extraído con acetato de etilo). 2.- MS2 (extraído con acetato de etilo). 3.- MS1 (extraído con hexano). 4.- MS2 (extraído con hexano). 5.- Metanol 70% (control). Agar Müller Hinton Se incubaron a 27 °C por 24 horas.



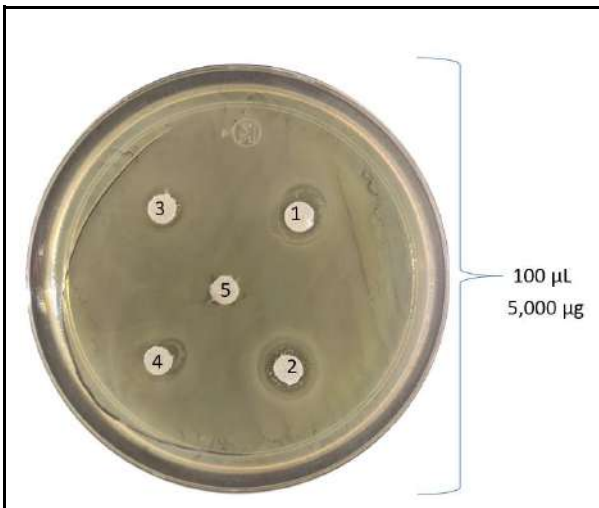
*E. coli*: prueba de antibióticos a concentración de 100µl. 1.- MS3 (extraído con acetato de etilo). 2.- MS4 (extraído con acetato de etilo). 3.- MS3 (extraído con hexano). 4.- MS4 (extraído con hexano). 5.- Metanol 70% (control). Agar Müller Hinton Se incubaron a 27 °C por 24 horas.



*E. aerogenes*: prueba de antibióticos en 2 concentraciones diferentes. 1.- MS1 (extraído con acetato de etilo). 2.- MS2 (extraído con acetato de etilo). 3.- MS1 (extraído con hexano). 4.- MS2 (extraído con hexano). 5.- Metanol 70% (control). Agar Müller Hinton Se incubaron a 27 °C por 24 horas.

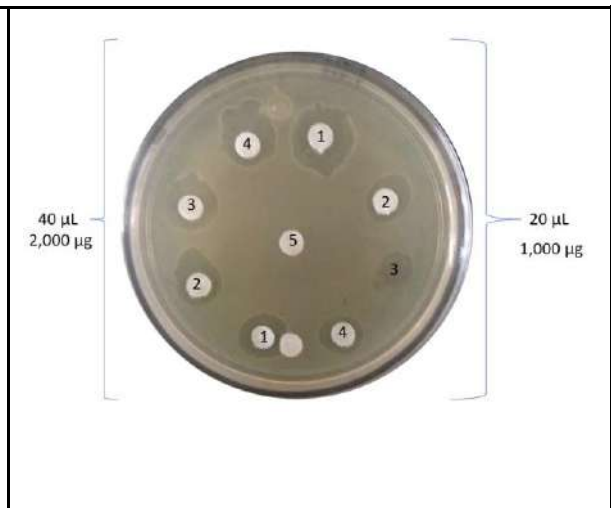


*E. aerogenes*: prueba de antibióticos a concentración de 100µl. 1.- MS1 (extraído con acetato de etilo). 2.- MS2 (extraído con acetato de etilo). 3.- MS1 (extraído con hexano). 4.- MS2 (extraído con hexano). 5.- Metanol 70% (control). Agar Müller Hinton Se incubaron a 27 °C por 24 horas.



100  $\mu$ L  
5,000  $\mu$ g

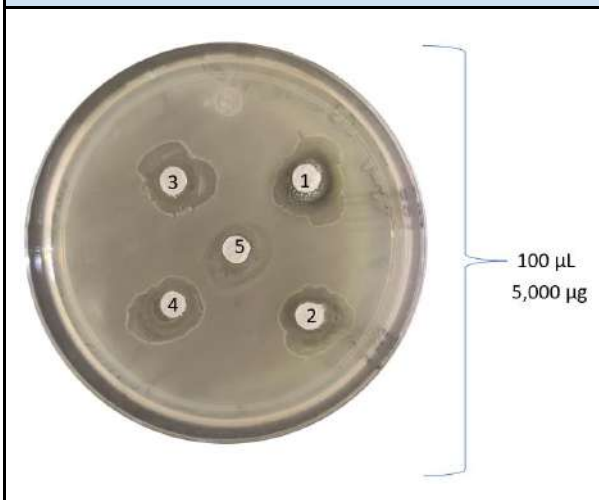
*E. aerogenes*: prueba de antibióticos a concentración de 100 $\mu$ l. 1.- MS3 (extraído con acetato de etilo). 2.- MS4 (extraído con acetato de etilo). 3.- MS3 (extraído con hexano). 4.- MS4 (extraído con hexano). 5.- Metanol 70% (control). Agar Müller Hinton Se incubaron a 27 °C por 24 horas.



40  $\mu$ L  
2,000  $\mu$ g

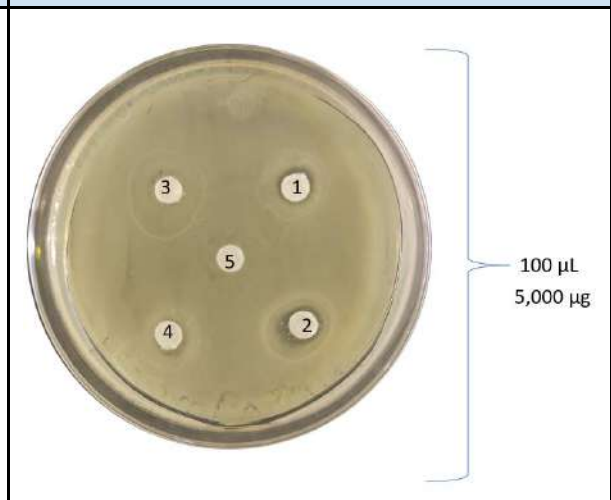
20  $\mu$ L  
1,000  $\mu$ g

*B. subtilis*: prueba de antibióticos en 2 concentraciones diferentes. 1.- MS1 (extraído con acetato de etilo). 2.- MS2 (extraído con acetato de etilo). 3.- MS1 (extraído con hexano). 4.- MS2 (extraído con hexano). 5.- Metanol 70% (control). Agar Müller Hinton Se incubaron a 27 °C por 24 horas.



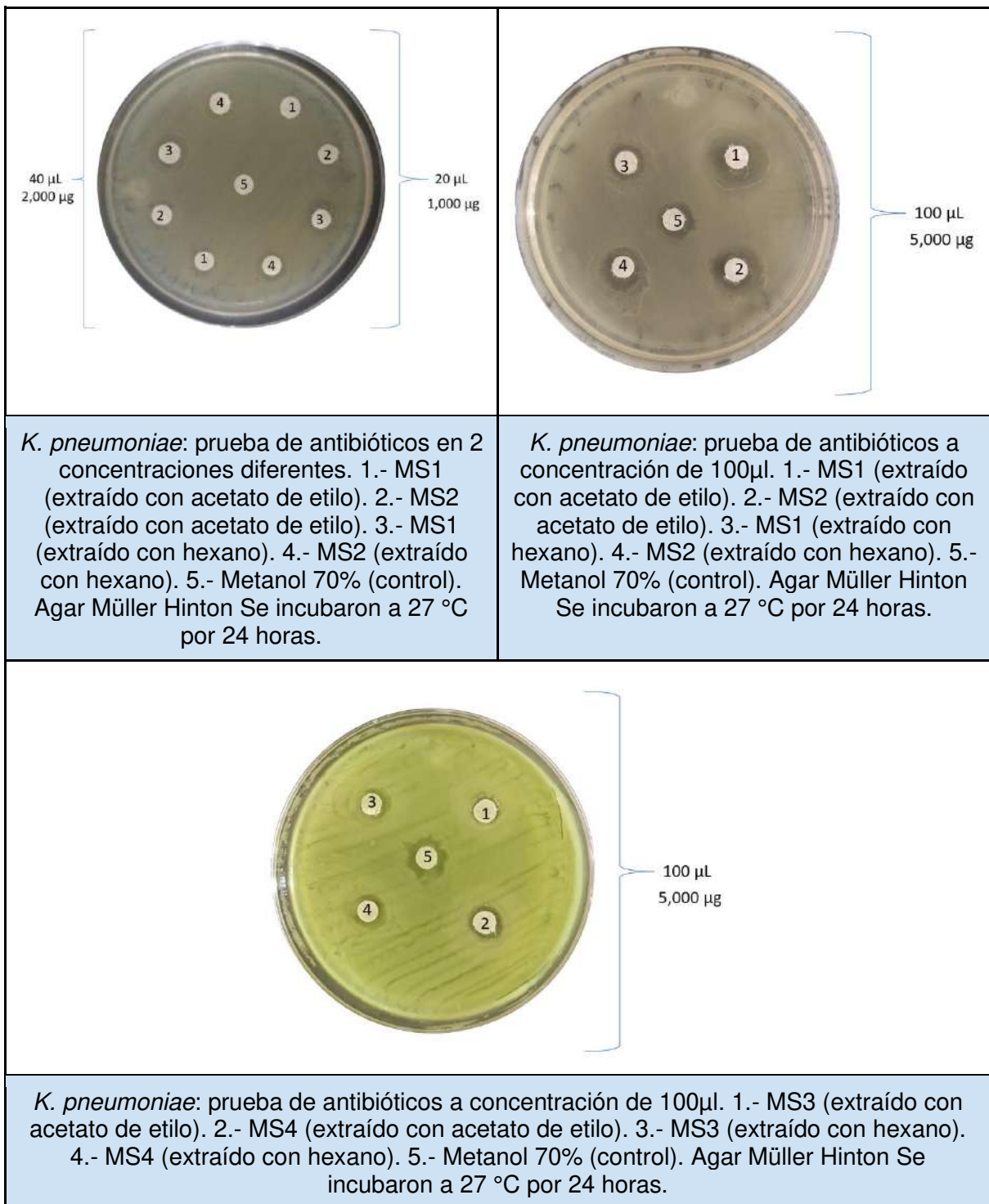
100  $\mu$ L  
5,000  $\mu$ g

*B. subtilis*: prueba de antibióticos a concentración de 100 $\mu$ l. 1.- MS1 (extraído con acetato de etilo). 2.- MS2 (extraído con acetato de etilo). 3.- MS1 (extraído con hexano). 4.- MS2 (extraído con hexano). 5.- Metanol 70% (control). Agar Müller Hinton Se incubaron a 27 °C por 24 horas.



100  $\mu$ L  
5,000  $\mu$ g

*B. subtilis*: prueba de antibióticos a concentración de 100 $\mu$ l. 1.- MS3 (extraído con acetato de etilo). 2.- MS4 (extraído con acetato de etilo). 3.- MS3 (extraído con hexano). 4.- MS4 (extraído con hexano). 5.- Metanol 70% (control). Agar Müller Hinton Se incubaron a 27 °C por 24 horas.



**Figura 14.** Pruebas de inhibición contra ESKAPE usando los metabolitos secundarios extraídos. Antibiótico 1: MS de la bacteria MRB#3. Antibiótico 2: MS de la bacteria MPA#6. Antibiótico 3: MS de la bacteria MRB#5. Antibiótico 4: MS de la bacteria MRB#22.

En la **Tabla 8** podemos observar la interacción de los metabolitos secundarios contra las cepas ESKAPE de manera resumida. *S. aureus* mostró ser susceptible a la mayoría de metabolitos recuperados con ambos solventes, mientras que *E. coli* y *K. pneumoniae* fueron los menos afectados por los MS.



		Tabla 8. Prueba de inhibición con MS a bacterias EPS				
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Extracto con Acetato de Etilo	MRB#3					
	MPA#6					
	MRB#5					
	MRB#22					
	MFB#3					
	MRN#3					
	MRN#25					
	MAN#7					
	Consortio 1					
	Consortio 2					
Extracto con Hexano	MRB#3					
	MPA#6					
	MRB#5					
	MRB#22					
	MFB#3					
	MRN#3					
	MRN#25					
	MAN#7					
	Consortio 1					
	Consortio 2					

Celda verde: Inhibición fuerte. Celda amarilla: Inhibición débil. Celda roja: No hay inhibición.

Por otro lado, también se utilizó el extracto obtenido a partir de los consorcios bacterianos. En este caso, se mostró una potencialización en el efecto inhibitorio por parte del consorcio 2 como se muestra en la **Tabla 9**. Puesto que las bacterias MFB#3 y MAN#7 de manera independiente no fueron tan efectivas en controlar el crecimiento (**Tabla 8**), en comparación a cuando se utilizaron como consorcio.

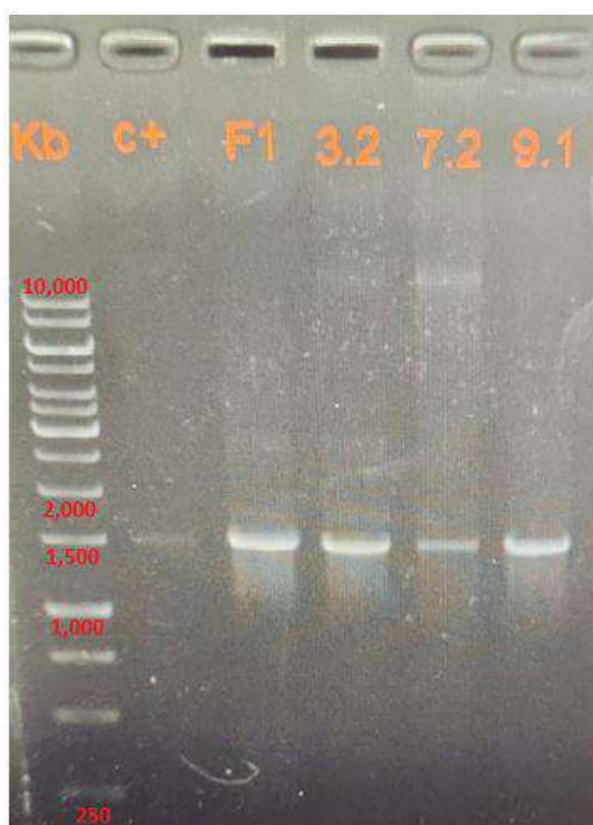
		Tabla 9. Prueba de inhibición con MS a bacterias EPS				
		<i>S. a</i>	<i>E. c</i>	<i>E. a</i>	<i>B. s</i>	<i>K. p</i>
Extracto con Acetato de Etilo	Consortio 1					
	Consortio 2					
Extracto con Hexano	Consortio 1					
	Consortio 2					

Celda verde: Inhibición fuerte. Celda amarilla: Inhibición débil. Celda roja: No hay inhibición.

*S. a* = *S. aureus*, *E. c* = *E. coli*, *E. a* = *E. aerogenes*, *B. s* = *B. subtilis*, *K. p* = *K. pneumoniae*.

#### 4.10.- Identificación molecular de las bacterias seleccionadas del cepario.

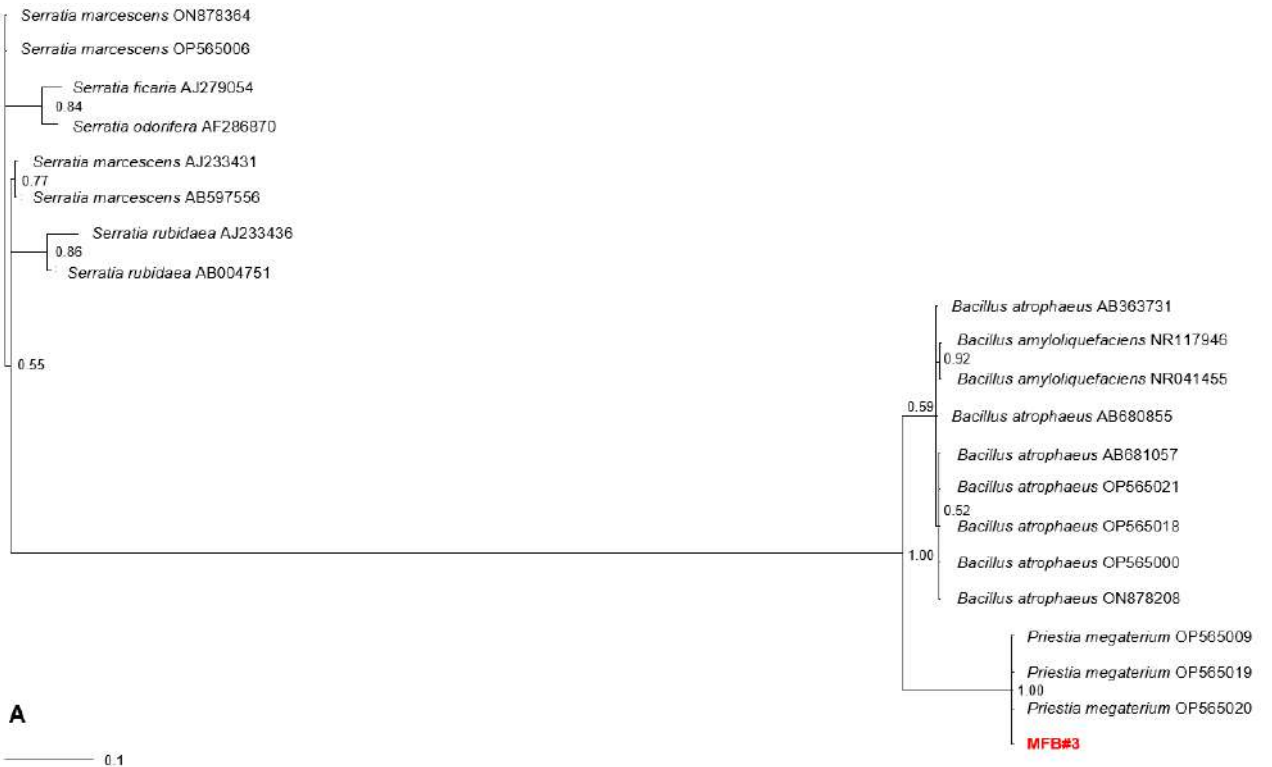
Una vez analizado el resultado obtenido con las pruebas API, se consideró que las pruebas no arrojaron un resultado confiable, esto debido al bajo porcentaje de similitud a otras bacterias conforme la plataforma API. Se optó por identificar a nivel molecular a las 4 bacterias con mejor desempeño mostrado en la inhibición de bacterias EPS por acción de sus MS (**Figura 14**). Entre ellas se encuentran los integrantes del consorcio 2 (MFB#3 y MAN#7) y las bacterias MPA#6 y MRB#22. Para ello se amplificó por PCR la región 16S del ADNr de 1.5 kb (**Figura 15**). Este producto de PCR una vez secuenciado, se analizó usando el programa BLAST, así como la base de datos GenBank determinamos así la identidad de las 4 bacterias como se muestra en la **Tabla 10**.

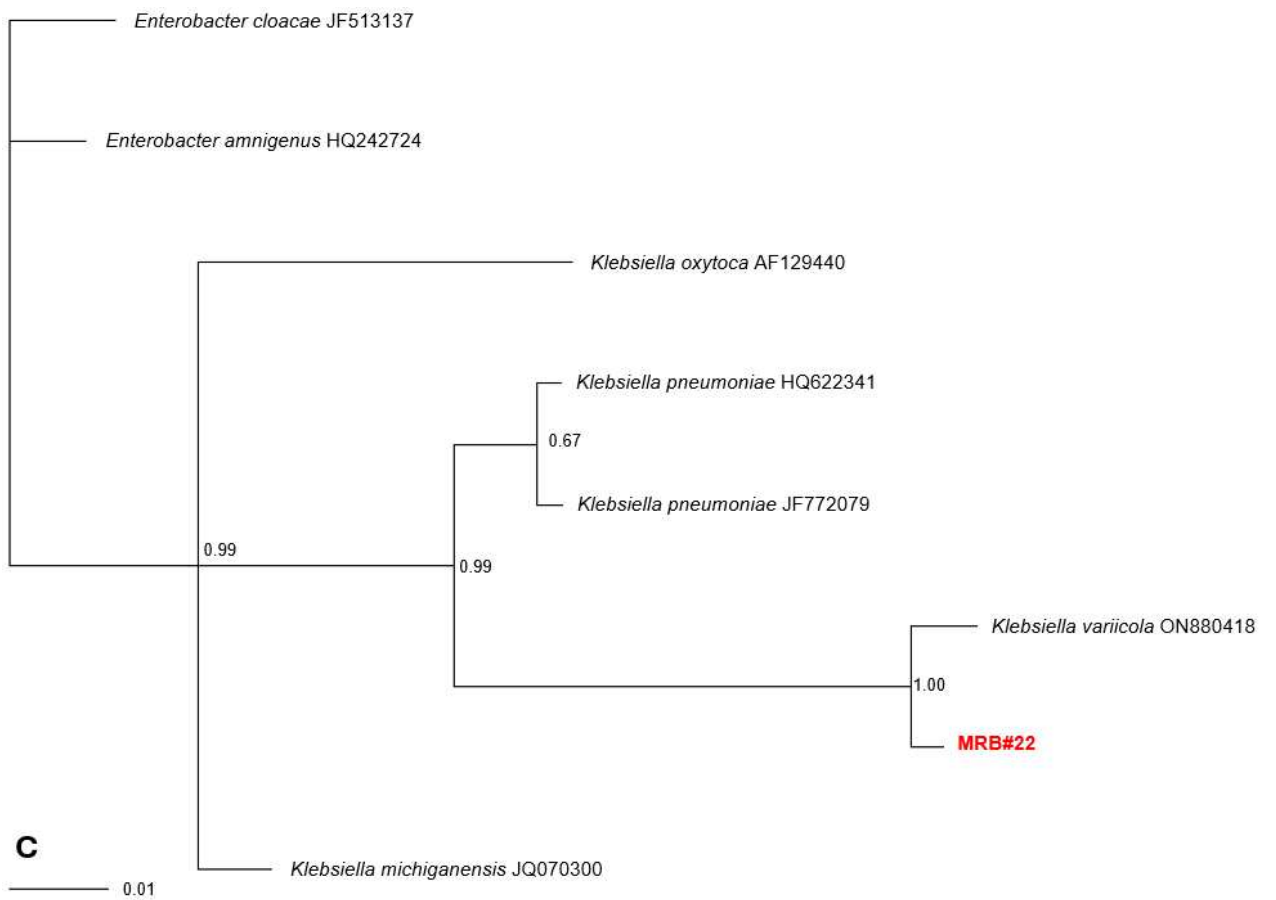
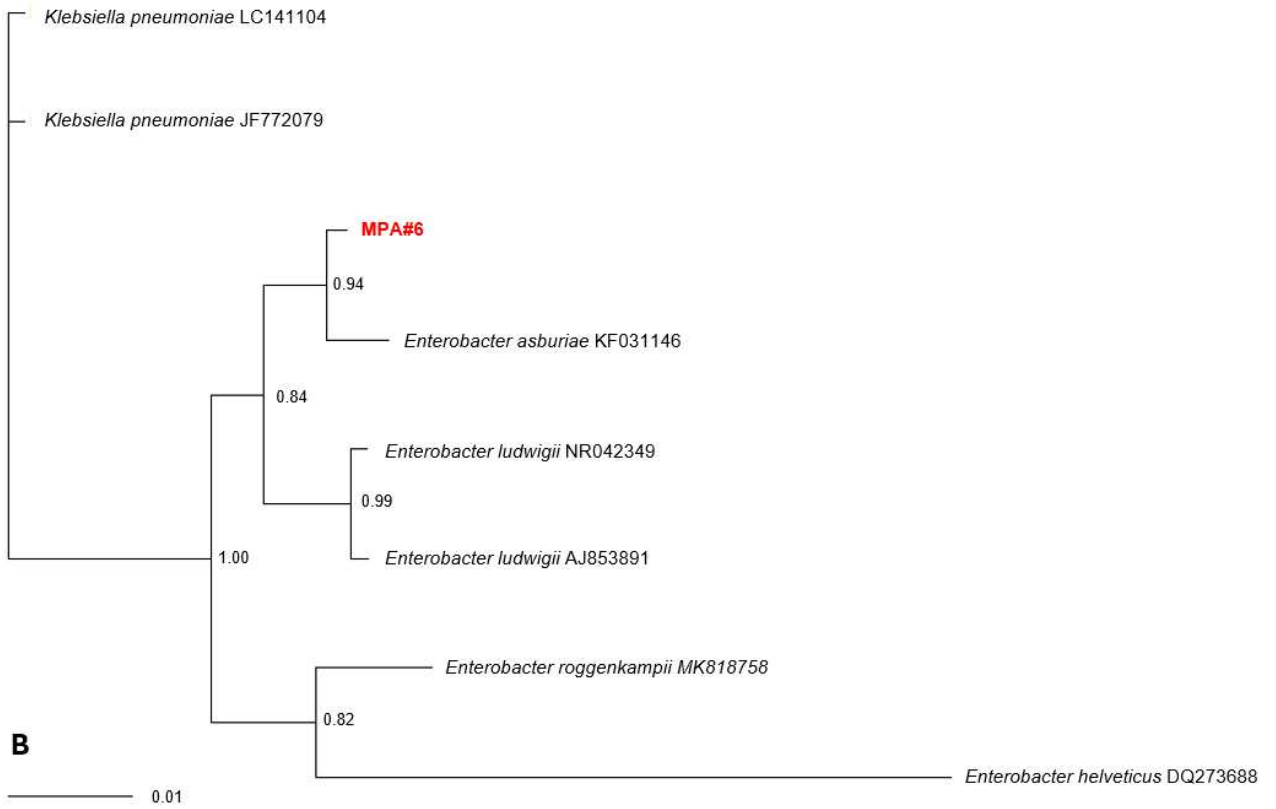


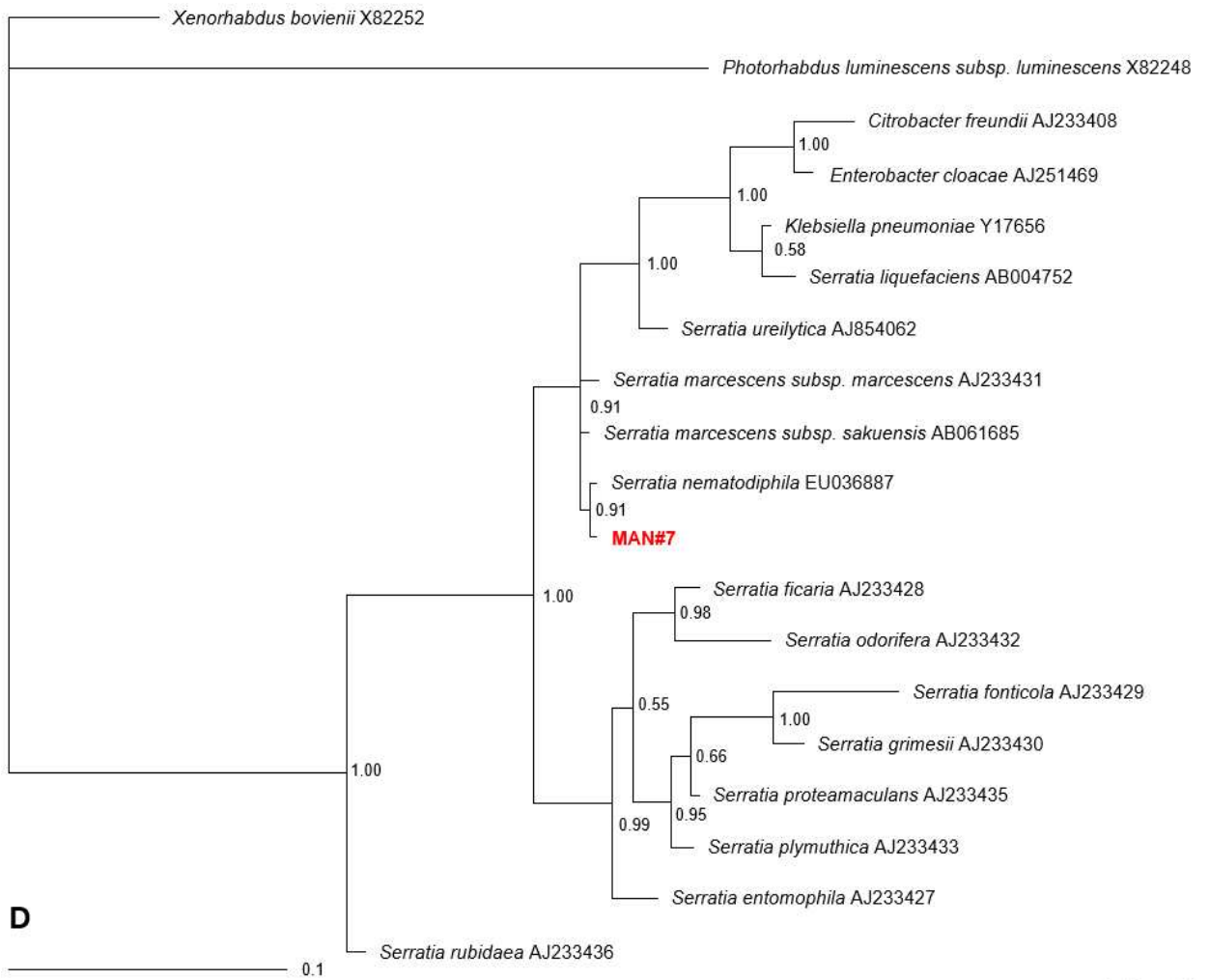
**Figura 15.** Electroforesis de la PCR mostrando la amplificación del gen 16S ADNr

Tabla 10. Identificación molecular de las bacterias productoras de MS con actividad antibiótica.			
Código de Cepario	Identidad	Código de GenBank	% de similitud
MFB#3	<i>Priestia megaterium</i>	OP565020	100
MPA#6	<i>Enterobacter asburiae</i>	KF031146	99.7
MRB#22	<i>Klebsiella variicola</i>	ON880418	99.87
MAN#7	<i>Serratia nematodiphila</i>	NR044385	100

El dato obtenido de análisis BLAST, indicó que contamos con 4 géneros y especies distintas. Sin embargo, para validar dicha información y relacionar filogenéticamente nuestras cepas seleccionadas con especies ya determinadas cuya información genética se encuentra en GenBank, se procedió a realizar el árbol filogenético para cada una de las cuatro secuencias que se encuentran en la **Figura 16** (las secuencias de las bacterias analizadas se encuentran en el **apéndice 5**).







**Figura 16.** A) Árbol Filogenético de la bacteria MFB#3. B) Árbol Filogenético de la bacteria MPA#6. C) Árbol Filogenético de la bacteria MRB#22. D) Árbol Filogenético de la bacteria MAN#7.

## **5.- Discusión**

### **5.1.- Toma y procesamiento de muestra**

La cantidad y diversidad de morfotipos presentes en las muestras de suelo dependen de los aspectos fisiológicos y químicos del lugar de colecta, así como el grado de perturbación que presente, esto se observó en nuestros resultados donde en suelos perturbados tuvimos una media de 16 morfotipos por muestra la cual contrasta con el suelo conservado del Ejido Bolaños (Qro.) que presenta 32 morfotipos por muestra. En el caso de las muestras obtenidas de la Calera (Gto.), se obtuvo una media de 9 morfotipos por muestra a pesar de ser un sitio conservado. Esto se debe a la condición de un ambiente extremófilo por su alta concentración salina (además de la presencia de un cuerpo de agua) lo cual genera un pH alcalino provocando que los requerimientos básicos de los medios utilizados no sean los adecuados para el óptimo crecimiento de las bacterias presentes en este suelo y dado a que el uso de medios enriquecidos específicos no entra en el interés del proyecto, se descartó ahondar al respecto. Otra razón es que las distintas cualidades de los medios (ajenos al proyecto) interferirían con el óptimo crecimiento de las EPS al momento de hacer las pruebas, debido al desarrollo bacteriano en condiciones limitantes dando como posibles consecuencias: cambios en la expresión génica resultando en una producción alterna de metabolitos secundarios, así como el desarrollo de mecanismos de resistencia (anteriormente mencionados) (Carrillo, 2013; Enríquez-Velázquez, 2017; González y Aranda, 2023).

### **5.2.- Prueba de inhibición de crecimiento de bacterias ESKAPE parientes seguros**

Con la prueba de estriado cruzado fue posible seleccionar las bacterias que presentan producción de metabolitos secundarios con propiedades antibacterianas, esto se observa al presentarse halos de inhibición en las bacterias EPS retadas. De los 148 morfotipos que conforman el cepario bacteriano, a 45 de ellos se les atribuye esta capacidad (algunos de estos forman halos reducidos). Para confirmar y analizar el desempeño de la inhibición producida por las bacterias implementamos la técnica Patch-Patch arrojó que, de la cifra anterior 9 mostraron el mejor desempeño. Algo que captó nuestra

atención fue la incidencia de inhibición en las mismas EPS con 8 de las 9 bacterias del cepario. Para conocer esta relación se investigó las susceptibilidades naturales de *L. monocytogenes* y *E. aerogenes* puesto que estas son susceptibles a Beta-lactámicos, mientras que *E. coli*, *S. aureus* junto con *B. subtilis* presentan susceptibilidad a aminoglucósidos y fluoroquinolonas por lo que es posible que las bacterias analizadas produzcan moléculas pertenecientes a estos grupos de antibióticos, además *S. epidermidis* es conocida por producir betalactamasas confiriéndole resistencia a los beta lactámicos, lo cual apoya esta idea ya que no presentó inhibición, sin embargo, cabe aclarar que es una suposición que debería ser investigada a profundidad con otros estudios debido a que existen diversos factores por los que puede inhibirse o detener el crecimiento bacteriano por ejemplo: que las bacterias produzcan moléculas que inhiben procesos celulares a nivel de replicación del DNA, o moléculas que puedan dañar la membrana celular, o bien, que generen un ambiente oxidativo con la consecuente degradación de biomoléculas (Yassin & Ahmad, 2012; Kibret & Abera, 2011; Stock, 2002; Akanbi, 2017; García, 2003; Prieto et al., 2016).

De los 148 morfotipos bacterianos aislados, 45 presentaron capacidad de producción de MS con actividad antimicrobiana lo cual representa 30.4 % del total, si lo comparamos con investigaciones similares, podemos afirmar que entra en el estándar (aprox. 27 - 47 %), consideramos primordialmente las investigaciones “Búsqueda De Bacterias Productoras De Antibióticos A Partir Del Culturoma Rizosférico” y “Búsqueda de bacterias productoras de antibióticos como estrategia para generar futuras estrategias de control de microorganismos patógenos de humanos” debido a que usan una cantidad de morfotipos comparable a las usadas en nuestra investigación. Sin embargo, es complicado comparar si obtuvimos pocos o muchas bacterias debido a que las muestras obtenidas son de distintos lugares (variando en tipos de suelo), cambiando la carga bacteriana de cada uno, además de que en investigaciones similares no usan ESKAPE estrictamente (Ramírez, 2022; Egas & Tinajero, 2016; Fernández, 2020).

### **5.3.- Efecto antibiótico de los metabolitos secundarios**

De los solventes utilizados para la extracción de metabolitos secundarios observamos una mayor eficiencia usando acetato de etilo (polar) que con hexano (no polar) lo cual se puede verificar al consultar bibliografía. Debido a que el acetato de etilo puede disolver una amplia variedad de compuestos polares así como compuestos hidrofílicos y lipofílicos, otra característica a resaltar es que no es tóxico y tiene un punto de ebullición bajo (77 °C) lo cual facilita la recuperación de los MS al usar el rotaevaporador (destilación) (Sanli Fengxiang, 2023).

Después de analizar los resultados de las pruebas antibacterianas con los metabolitos secundarios, decidimos realizar pruebas de compatibilidad entre los 9 morfotipos para determinar la posibilidad de crear consorcios bacterianos; esto con la intención de inducir estrés por competencia de recursos y por consecuencia producir un aumento de metabolitos secundarios con capacidad antibacteriana. De los 2 consorcios que fue posible establecer, el que presentó mejor rendimiento fue el consorcio 2 ya que hubo un aumento considerable en la inhibición de crecimiento comprobable al observar los halos de inhibición producidos (crecimiento nulo de la bacteria, así como el tamaño del halo). Este dato indica la relevancia de establecer consorcios, los cual potencia su actividad que de manera individual es menor (Martínez, 2018).

Finalmente, de los 9 morfotipos analizados se seleccionaron los mejores 4 para identificarlos molecularmente. Se tomó como criterio: eficiencia individual y haber inhibido a más de la mitad de los EPS probados. Además, se incluyeron a los integrantes del consorcio con mejor desempeño (Dawan & Ahn, 2022).

### **5.4.- Identificación molecular**

Cabe destacar que conforme el diagnóstico molecular obtuvimos que las 4 bacterias secuenciadas son diferentes entre sí, demostrando que la selección por morfotipos es una buena opción en trabajos con una gran cantidad de muestras y cepas desconocidas que respaldan la elaboración de ceparios por morfotipo bacteriano. Las pruebas API mostraron un porcentaje de compatibilidad muy bajo, además de que no coincide con algunos resultados ya determinados de las especies, debido a que las tiras reactivas ocupadas en esta



investigación son específicas para bacilos Gram negativos de baja exigencia, por lo que otras pruebas (de la misma marca) pueden resultar más efectivas para la identificación de las mismas. Además, en el caso de *Klebsiella variicola* y *Enterobacter asburiae* existe una estrecha relación con *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae* respectivamente que sólo puede ser diferenciada por la secuenciación de su genoma, lo cual puede generar un sesgo al utilizar pruebas bioquímicas únicamente. En el caso de la tinción de Gram sí coinciden las morfologías bacterianas a los descritos en la bibliografía (Li et al., 2023).

A continuación, discutimos las especies determinadas en cuestión.

#### **5.4.1.- *Priestia megaterium***

Descrita por primera vez en 1884 por De Bary, es un bacilo gram positivo aerobio, formador de esporas cuyo nombre megaterium hace alusión a su gran tamaño celular de aproximadamente 4 x 1.5  $\mu\text{m}$  (Calderón, 2022). Conocido anteriormente como *Bacillus megaterium*, este organismo, así como otros del género *Bacillus* fueron reclasificados en 2020 por Gupta et al. Debido a que este género tenía varios clados marcados por indeles conservados (inserciones y deleciones genéticas) y por ello se propusieron que estos clados fueran reconocidos como nuevos géneros, entre ellos *Priestia*.

Algunas de las características más destacables de *Priestia megaterium* son:

Alta capacidad de resistencia a condiciones hostiles como elevadas concentraciones salinas y exposición a metales pesados como; mercurio, arsénico, cobre, cobalto, cadmio, zinc y aluminio. Lo cual brinda posibilidades de cultivo en tierras contaminadas con metales (desarrollo de técnicas de biorestauración) y el estudio de la interacción planta-bacteria (Guzmán-Moreno et al., 2022).

Además, esta especie es uno de los productores biotecnológicos más usados y estudiados, ejemplo de ello es su aprovechamiento en la síntesis de vitamina B12, biopolímeros (polihidroxibutirato) con características químicas y físicas similares al plástico convencional y producción del ácido indol acético (auxina natural presente en la mayoría de plantas, cuyo propósito es regular diversos procesos del desarrollo vegetal como la mejora del crecimiento del fruto) por lo

tanto actúa como un promotor de crecimiento en plantas, esto se relaciona con nuestros resultados ya que nuestra cepa fue extraída de cultivo de frijol (Calderón, 2022; Biedendieck et al., 2021; Castillo et al., 2005; Mata & Natera, 2009). En otras investigaciones se ha determinado que esta bacteria promueve la síntesis de lignina, así como la acumulación de ácidos salicílicos libres y la expresión de genes relacionados con la defensa contra patógenos en *A. thaliana* (Li, 2022). Otros fitopatógenos que *P. megaterium* inhibe son *Septoria tritici* en trigo, *Aspergillus flavus* en arroz y *Erwinia amylovora* (fuego bacteriano o tizón en perales), según Zeling Cui, debido a la gran cantidad de metabolitos secundarios que *P. megaterium* produce; entre ellos se encuentra un amplio espectro de lipopéptidos (surfactinas, liquenisina, iturina A y fengicinas A y B). Los responsables del efecto inhibitorio en *E. amylovora* son los lipopéptidos surfactina e iturina A (Cui, 2023).

Recientemente se demostró la capacidad antimicrobiana de *P. megaterium* contra *S. aureus* y *E. coli*. Donde a partir de la extracción de metabolitos secundarios del sobrenadante y pastilla, se observaron distintos efectos sobre los patógenos (Liu et al., 2023), para el sobrenadante usaron acetato de etilo mientras que para la pastilla usaron acetona. Mostrando mejor efecto de inhibición sobre *S. aureus* con los metabolitos del sobrenadante, mientras que con los metabolitos de la pastilla a *E. coli*. Gracias al aporte de Diego Guzmán (2018) se determinó que los MS de *P. megaterium* presentan estructuras químicas similares a la familia de los Beta-lactámicos.

#### **5.4.2.- *Enterobacter asburiae***

Descrita por primera vez en 1986 por Brenner et al. *E. asburiae* es un bacilo Gram negativo, no pigmentado, no formador de esporas, facultativo anaeróbico, no móvil (en su mayoría, aunque depende de la cepa ya que algunas presentan movilidad como es nuestro caso), que actúa como un patógeno oportunista pertenecientes al género *Enterobacter*, cuyas especies son difíciles de identificar con pruebas bioquímicas y filogenéticas, por ejemplo: *E. asburiae* es bioquímicamente similar a *E. cloacae* (Brenner et al., 1986; Kato, 2024; Mardaneh & Dallal, 2016).

Algunas características de *Enterobacter* spp. es que presentan resistencia natural a ampicilina, amoxicilina y cefalosporinas de primera generación e inhibidores de  $\beta$ -lactamasas (ácido clavulánico, sulbactama y tazobactama) conferida por una  $\beta$ -lactamasa cromosómica (Lopardo et al., 2016).

Otras características de *E. asburiae* es su capacidad como bacteria promotora de crecimiento, donde se ha reportado su actividad en plantas como: palma de dátiles, trigo, camote, entre otros. Las cuales son de gran importancia económica en todo el mundo, brindando un gran potencial al empleo de esta bacteria en los cultivos (Kato, 2024). Además, en el estudio realizado por Anirudha (2016) encontró una cepa de *E. asburiae* capaz de degradar níquel presente en suelo, en este determinaron la producción de moléculas promotoras de crecimiento (1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa, ácido indolacético y sideróforos) en plantas. Estos aspectos lo vuelven un posible candidato para su aprovechamiento en biorremediación en suelos contaminados por níquel y como promotor de crecimiento vegetal en tierras contaminadas (Paul & Mukherjee, 2016).

En el caso de otras aplicaciones, se encuentra el aprovechamiento de los metabolitos secundarios con capacidad antimicrobiana en acuicultura, en el estudio de Li (2023) se evaluó la eficiencia de una cepa de *E. asburiae* como posible probiótico en la dieta de la carpa común (*Cyprinus carpio*) contra *Aeromonas veronii* (patógeno mortal en peces) generando una mayor tolerancia ambiental y nulo daño al huésped. *E. asburiae* actúa como inmunoestimulante para la regulación positiva de algunas respuestas inmunitarias y humorales. Además, presenta una excelente actividad antibacteriana contra las siguientes cepas: *Aeromonas hydrophila*, *A. veronii*, *A. caviae*, *A. media*, *A. jandaei*, *A. enteropelogenes*, *A. schubertii*, *A. salmonicida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida*, *Plesiomonas shigelloides* y *Shewanella*. Debido a estas características sería posible implementar a *E. asburiae* como un producto seguro y ecológico en la acuicultura, además de poder extrapolarlo a otro tipo de industrias como la agricultura (Li et al., 2023).

En el caso de las bacterias del género *Enterobacter*, se recomienda usar otro marcador filogenético ya que el basado en el gen 16S ribosomal, no es suficiente por sí solo, el marcador recomendado es el gen *gyrB* el cual tiene un papel crítico

en la replicación del ADN y está ampliamente distribuido en especies bacterianas. Además, se considera que esta secuencia es útil para discriminar por sobre la 16S ribosomal (Li et al., 2023).

#### **5.4.3.- *Klebsiella variicola***

Descrita por primera vez en 2004 se diferenció de *Klebsiella pneumoniae* dando origen a otra especie del género *Klebsiella*. Esta se determinó utilizando pruebas bioquímicas, de resistencia/sensibilidad a antibióticos y análisis filogenéticos de 6 genes marcadores moleculares: rpoB, gyrA, nifH, infB, phoE y mdh. Actualmente estas 2 especies no son posibles de diferenciar utilizando pruebas bioquímicas convencionales. *K. variicola* se caracteriza por la fijación de nitrógeno, ser patógeno oportunista, no fermenta adonitol, se encuentra en diferentes hábitats (agua, suelo y abundar en plantas) y además representan menos del 10% de aislados clínicos (Rodríguez, 2019; Peralta, 2023; Martínez, 2018).

*K. variicola* es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, no móvil, forma colonias circulares, convexas y mucoides. También es un patógeno emergente en humanos cuya resistencia a antibióticos incrementa exponencialmente e incluso se considera como reservorio de genes de resistencia a antibióticos ( $\beta$ -lactámicos y quinolonas). Poseen una gran capacidad de colonizar raíces y actúan como rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal. Debido a la presencia de genes que contribuyen en esta labor: operon nif (fijación de nitrógeno), indol-3-piruvato descarboxilasa (producción de ácido indol acético), entre otros. Además de la síntesis de fitohormonas como auxinas y giberelinas que controlan el crecimiento vegetal, germinación, floración y formación de frutos. Actualmente *K. variicola* es utilizada como modelo de estudio de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal resistentes a condiciones de desecación extrema, conservando la capacidad de colonizar y promover el crecimiento vegetal. Otra característica importante es la capacidad de potenciar sus efectos (anteriormente mencionados) por medio de la creación y empleo de consorcios bacterianos (Rosete, 2019; De la Vega, 2023).

Existe registro de la producción de metabolitos secundarios con capacidad antimicrobiana, Guato-Molina et al., (2019) menciona que *K. variicola* inhibe el

crecimiento de los hongos *Moniliophthora roreri* causante de moniliasis del cacao y *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* responsable de la marchitez en el tomate. También se ha documentado que pueden producir otros tipos de sustancias inhibidoras como ácidos orgánicos, sideróforos, antifúngicos y bacteriocinas (Cesa, 2020). Además, Okudo, (2020) registró que una cepa de *K. variicola* mostró efectos antimicrobianos contra cepas clínicas de bacterias Gram positivas y negativas (Okudo, 2020). Esto abre la posibilidad de usar esta bacteria como solución contra organismos fitopatógenos así como de usar los metabolitos secundarios para desarrollar nuevos antibióticos.

En el aspecto biotecnológico, se han investigado en el aprovechamiento de producción de biocombustibles, la biorremediación en suelos contaminados con plomo y la degradación del colorante azoico rojo 198 utilizado en la industria textil, curtidurías e impresión que contamina cuerpos de agua debido a su no-degradabilidad, esto es de gran importancia, debido a que se trata de un colorante cancerígeno y mutagénico. La remoción de este colorante ha sido posible con un consorcio bacteriano entre *Enterococcus faecalis* y *Klebsiella variicola* eliminando más del 98% del contaminante (Pancho, 2023).

#### **5.4.4.- *Serratia nematodiphila***

Descrito por primera vez en 2009 por Zhang et al., *S. nematodiphila* tiene forma de bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, quimioorganotrofo, cuyas colonias bacterianas presentan las siguientes características: circulares, convexas y lisas. Encontramos esta especie en diversos hábitats, como en suelo, agua y en plantas, este último en raíces ya que *S. nematodiphila* es conocida por su capacidad de promover el crecimiento vegetal (rizobacterias) gracias a la producción de ácido indol acético, HCN, sideróforos, solubilización de fosfatos y la posibilidad de crecer en ambientes libres de nitrógeno; exitosamente probado el efecto como bioestimulante y biofertilizante en pimienta negra (*Piper nigrum L.*) y en arroz (Zhang et al., 2009; Dastager, 2010).

Por otro lado, se ha documentado que la inoculación de *S. nematodiphila* en las semillas de hierba mora (*Solanum nigrum L.*) incrementó la fitorremediación de metales pesados por la misma planta, resultando en un incremento en la producción de la biomasa y pigmentos fotosintéticos en hojas. Otro efecto fue la

inducción de actividades enzimáticas antioxidativas en esta planta, esto posibilita el uso de suelo contaminado por metales pesados, así como la biorremediación de estos (Khoa et al., 2016).

*S. nematodiphila* tiene la capacidad de producir metabolitos secundarios con actividad antibacteriana. Se han identificado los siguientes compuestos activos: bacteriocinas del grupo A o B, DNA extracelular, prodigiosina, carbapenémicos y enzimas lipido-hidrolíticas como la mayoría de los integrantes del género *Serratia*. Se ha documentado su efecto antagonista contra la bacteria *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* (Khoa et al., 2016; Soenens & Imperial, 2019). Además, se ha demostrado que la prodigiosina puede inhibir el crecimiento de las siguientes bacterias: *Listeria* sp., *Pseudomonas* sp., *Yersinia* sp. y *Shigella* sp. La prodigiosina a pesar de no tener un rol primario en su fisiología, ha sido reportado por tener otras actividades (además de las antimicrobianas), como inmunomodulante, antimalárico, y anticancerígeno (Gondil et al., 2017).

Finalmente, *S. nematodiphila* ha demostrado tener la facultad de producir potentes proteínas insecticidas como la familia Sep (SepA, SepB y SepC) (Al-Ghanem, 2018). Debido a la gran cantidad de metabolitos secundarios que produce y sus diversos efectos, es posible aprovechar de manera biotecnológica y mejorar diversos procesos y problemas que enfrenta la industria.

### **5.5.- Análisis filogenéticos**

Se realizaron árboles filogenéticos de cada una de las bacterias secuenciadas, para poder conocer y confirmar la filogenia bacteriana de nuestras cepas, ya que, aunque molecularmente posean una alta compatibilidad con secuencias de bacterias ya clasificadas en la plataforma GenBank, es necesario determinar la relación filogenética con organismos del mismo género, así como anclar el clado con organismos parientes, con la finalidad de asegurar el correcto parentesco. Una de las principales dificultades de la filogenia bacteriana es la continua transferencia de genes, por lo tanto es importante establecer el criterio que manejaremos para la selección del gen a secuenciar, buscando los más conservados para un buen análisis, en nuestro caso fue el marcador molecular 16S ribosomal ya que son secuencias cortas que aparecen en la mayor parte de un clado filogenético y raramente se encuentran en otro clado, por lo tanto, se

esperan modificaciones genéticas compartidas entre clados. Otro punto por considerar es la gran cantidad de secuencias mal clasificadas que encontramos en la plataforma debido a factores como, una reclasificación repentina, falta de secuencias a comparar y la mala selección del gen a secuencias y analizar como lo menciona Li et al., (2023) (Del Rosario Rodicio & Del Carmen Mendoza, 2004; Li et al., 2023).

Finalmente, el análisis molecular realizado indicó que las cuatro bacterias secuenciadas y analizadas, muestra alta importancia en lo que se refiere a la producción de metabolitos secundarios, por lo cual estas bacterias serán sujetos de estudios posteriores en los que se analice su perfil de antibióticos, su efecto contra bacterias resistentes a antibióticos, así como su posible uso en el área de promoción de crecimiento en plantas, al haber sido obtenidas de muestras de suelo (Liu et al., 2023; Li et al., 2023; Guato-Molina et al., 2019; Khoa et al., 2016).

## 6.- Conclusiones

- 1.- Se aislaron 148 bacterias con diferente morfología colonial a partir de 10 muestras de suelo.
- 2.- Del suelo obtenido de Campus Aeropuerto se obtuvo mayor diversidad. Influenciado por el pH, la condición de perturbación del suelo y ecosistema (tipo de vegetación).
- 3.- De los 148 morfotipos bacterianos, 45 producen metabolitos secundarios con capacidad para inhibir el crecimiento de EPS.
- 4.- Los metabolitos secundarios obtenidos con acetato de etilo mostraron mejor desempeño al momento de retar a los EPS.
- 5.- La actividad antibiótica de los metabolitos secundarios obtenidos a partir del consorcio fue mayor. Este dato indica la importancia de establecer consorcios microbianos cuyo efecto se ve potenciado, superando el efecto de los miembros del consorcio de manera individual.
- 6.- Cuatro cepas bacterianas resultaron candidatos interesantes debido a su alta capacidad de inhibición de EPS.
- 7.- La identificación molecular de las cuatro cepas reveló que pertenecen a géneros distintos, validando la selección de bacterias realizadas basada en los morfotipos desplegados en caja Petri.
- 8.- Se identificaron las 4 bacterias seleccionadas como: *Priestia megaterium*, *Enterobacter asburiae*, *Klebsiella variicola* y *Serratia nematodiphila*. Cuya capacidad de producción de metabolitos secundarios se ha confirmado en contra de diversos patógenos, éstas están catalogadas como rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal con requerimientos nutricionales bajos y con potenciales aplicaciones biotecnológicas.



## **7.- Perspectivas**

- 1.- Identificar los metabolitos secundarios producidos por las bacterias analizadas usando cromatografía líquida, electroforesis capilar y espectrofotometría de masas.
- 2.- Determinar el efecto antibiótico de las bacterias seleccionadas contra bacterias resistentes a antibióticos de origen clínico.
- 3.- Determinar la concentración mínima inhibitoria de los metabolitos secundarios contra bacterias ESKAPE y bacterias fitopatógenas.
- 4.- Conocer la toxicidad de los metabolitos en células eucariotas.
- 5.- Determinar el perfil bioquímico característico de bacterias promotoras de crecimiento vegetal, para valorar su potencial implementación como agentes de control biológico.

## 8.- Referencias

- Akanbi, O. E., Njom, H. A., Fri, J., Otigbu, A. C., & Clarke, A. M. (2017). Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolated from Recreational Waters and Beach Sand in Eastern Cape Province of South Africa. *International journal of environmental research and public health*, 14(9), 1001. <https://doi.org/10.3390/ijerph14091001>
- Al-Ghanem, M. M. (2018). *Serratia* A Novel Source of Secondary Metabolites. *Advances In Biotechnology & Microbiology*, 11(3). <https://doi.org/10.19080/aibm.2018.11.555814>
- Batra, P., Barkodia, M., Ahlawat, U., Sansanwal, R., & Wati, L. (2020). Effect of compatible and incompatible endophytic bacteria on growth of chickpea plant. *Defence life science journal*, 5(1), 45-48. <https://doi.org/10.14429/dlsj.5.15119>
- Benintende, S., y Sánchez, C. (2009). Microorganismos del Suelo. Cátedra de Microbiología Agrícola. [http://www2.fca.uner.edu.ar/files/academica/deptos/catedras/microbiologia/parte\\_de\\_unidades\\_10\\_y\\_11\\_microorganismos\\_del\\_suelo.pdf](http://www2.fca.uner.edu.ar/files/academica/deptos/catedras/microbiologia/parte_de_unidades_10_y_11_microorganismos_del_suelo.pdf)
- Biedendieck, R., Knuuti, T., Moore, S., & Jahn, D. (2021). The “beauty in the beast”—the multiple uses of *Priestia megaterium* in biotechnology. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 105(14-15), 5719-5737. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11424-6>
- Biomérieux. (2024) API®-20E™. <https://www.biomerieux.com.mx/diagnostico-clinico/productos/apir>
- Brenner, D. J., McWhorter, A. C., Kai, A., Steigerwalt, A. G., & Farmer, J. J. (1986). *Enterobacter asburiae* sp. nov., a new species found in clinical specimens, and reassignment of *Erwinia dissolvens* and *Erwinia nimipressuralis* to the genus *Enterobacter* as *Enterobacter dissolvens* comb. nov. and *Enterobacter nimipressuralis* comb. nov. *Journal Of Clinical Microbiology*, 23(6), 1114-1120. <https://doi.org/10.1128/jcm.23.6.1114-1120.1986>
- Bruslind, L. (2020). *General Microbiology*.
- Calderón, A. (2022). Aislamiento, Caracterización E Identificación De Compuestos Naturales En *Bacillus megaterium*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Calderón-Rojas, G., & Aguilar-Ulate, L. (2016). Resistencia Antimicrobiana: Microorganismos Más Resistentes Y Antibióticos Con Menor Actividad. *Revista Médica de C. R. y Centroamérica*, 73 (621)
- Cárdenas, J., Castillo, O., De Cámara, C., & González, V. (2018). Combatiendo La Resistencia Bacteriana: Una Revisión Sobre Las Terapias Alternas A Los Antibióticos Convencionales. *Bol Venez Infectol*, 29 (1)
- Carrillo, L. (2013). *Manual de Microbiología Agrícola (1a Ed)*. Editorial Universitaria de Jujuy.
- Castillo, G., Altuna, B., Michelena, G., Bravo, J. S., & Echeverría, M. A. (2005). Cuantificación del contenido de ácido indolacético (AIA) en un caldo de

fermentación microbiana. Gaceta Sanitaria, 27, 137-142. <https://digitum.um.es/xmlui/bitstream/10201/2255/1/AB27%20%282005%29%20p%20137-142.pdf>

Caycedo Lozano, Liliana, Ramírez, Lucía Constanza Corrales, & Suárez, Diana Marcela Trujillo. (2021). Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química. Nova, 19(36), 49-94. Epub January 17, 2021. <https://doi.org/10.22490/24629448.5293>

Cesa-Luna C, Baez A, Quintero-Hernández V, De la Cruz-Enríquez J, Castañeda-Antonio MD, & Muñoz-Rojas J. The importance of antimicrobial compounds produced by beneficial bacteria on the biocontrol of phytopathogens. Acta biol. Colomb. 2020;25(1): 140-154. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v25n1.76867>

Cui Z, Hu L, Zeng L, Meng W, Guo D, & Sun L. (2023). Isolation and characterization of *Priestia megaterium* KD7 for the biological control of pear fire blight. Front. Microbiol. 14:1099664. doi: 10.3389/fmicb.2023.1099664

Dastager, S. G., Chirayath, D., & Pandey, A. (2010). Potential plant growth-promoting activity of *Serratia nematodiphila* NII-0928 on black pepper (*Piper nigrum* L.). World Journal Of Microbiology & Biotechnology Incorporating The MIRCEN Journal Of Applied Microbiology And Biotechnology/World Journal Of Microbiology & Biotechnology, 27(2), 259-265. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0454-z>

Dawan, J., & Ahn, J. (2022). Bacterial Stress Responses as Potential Targets in Overcoming Antibiotic Resistance. Microorganisms, 10(7), 1385. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071385>

De la Vega-Camarillo E, Sotelo-Aguilar J, Rios-Galicia B, Mercado-Flores Y, Arteaga-Garibay R, Villa-Tanaca L, & Hernández-Rodríguez C. (2023). Promotion of the growth and yield of *Zea mays* by synthetic microbial communities from Jala maize. Front. Microbiol. 14:1167839. doi: 10.3389/fmicb.2023.1167839

Del Arco, J. (2014). Antibióticos: situación actual. ELSEVIER. <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-antibioticos-situacion-actual-X0213932414516605>

Del Rosario Rodicio, M., & Del Carmen Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 22(4), 238-245. [https://doi.org/10.1016/s0213-005x\(04\)73073-6](https://doi.org/10.1016/s0213-005x(04)73073-6)

Diario Oficial de la Federación. (2022). Estrategia Nacional De Acción Contra La Resistencia A Los Antimicrobianos. SEGOB. [https://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5670896&fecha=09/11/2022#gsc.tab=0](https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5670896&fecha=09/11/2022#gsc.tab=0)

Egas-Rosero, I., & Maldonado, M. (2016). Aislamiento De Microorganismos Capaces De Producir Antibióticos, A Partir De Suelos De Las Regiones Naturales De Ecuador. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/12142/1/UPS-QT09705.pdf>

Enríquez-Velázquez, Olga, Aguilar-Aguilar, Rosenda, Valencia-Cantero, Eduardo, & Velázquez-Becerra, Crisanto. (2017). Perfil fisicoquímico y microbiológico de tres distintos suelos forestales y su efecto en el crecimiento de *Pinus Devoniana* Lindl. *Polibotánica*, (44), 109-118. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.44.8>

Facultad de Ciencias Agropecuarias. (2015). Guía De Actividades Prácticas Microbiología Agrícola. <http://agro.unc.edu.ar/~microbiologia/wp-content/uploads/2014/04/Guia-de-Trabajos-Practicos.pdf>

FAO. (2023). ¿Cuáles son los mecanismos de acción de los antibióticos?. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. <https://www.fao.org/3/y5468s/y5468s05.htm>

FAO. (2010). El Suelo, Diferencias Según Su Aspecto Físico Y Químico. <https://www.fao.org/3/ah645s/AH645S04.htm>

Fernández, A., García, C., Saéz, J., & Valdezate, S. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. SEIMC. <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>

Fernández, V., Higuera, P., Rodrigo, M., & Ruiz, D. (2018). De Yale Al IES Madrid Sur: Descubriendo Nuevas Bacterias. *Psychologia Latina*, Especial (115-117)

Fernández-Villacorta, N., Mateos, P. F., & Saati-Santamaría, Z. (2020). Búsqueda de bacterias productoras de antibióticos a partir del culturoma rizosférico. *Farmajournal*, 5(2), 43-50. <https://doi.org/10.14201/fj2020524350>

Fresno, C. (2001). El diseño de nuevos antibióticos. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 17(2), 196-199. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-21252001000200015&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21252001000200015&lng=es&tlng=es).

García Apac, Coralith, Pardo Valdespino, Juan, & Seas Ramos, Carlos. (2003). Bacteremia por *Staphylococcus epidermidis* y absceso de partes blandas en un paciente post-operado: reporte de un caso. *Revista Medica Herediana*, 14(4), 221-223. Recuperado en 15 de marzo de 2024, de [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1018-130X2003000400012&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2003000400012&lng=es&tlng=es).

Giraldo-Hoyos, N. (2021). Historia De La Penicilina: Más Allá De Los Héroes, Una Construcción Social. *IATREIA*, 34 (2)}

Gondil, V. S., Asif, M., & Bhalla, T. C. (2017). Optimization of physicochemical parameters influencing the production of prodigiosin from *Serratia nematodiphila* RL2 and exploring its antibacterial activity. *3 Biotech*, 7(5). <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0979-z>

González-Mendoza, J., Maguiña, C., & González, F. (2019). La Resistencia A Los Antibióticos: Un Problema Muy Serio. *Acta Médica Peruana*, 36 (2)

González, J. M., & Aranda, B. (2023). Microbial Growth under Limiting Conditions-Future Perspectives. *Microorganisms*, 11(7), 1641. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071641>

González, R. C., Elizalde, B., Cortés, M. E., & Orduña, M. (2015). Las tinciones básicas en el Laboratorio de Microbiología: Un enfoque gráfico. UNAM. <https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/publicaciones/libros/cbiologicas/libros/Tinciones.pdf>

Guato-Molina JJ, Auhing-Arcos JA, Crespo-Ávila JA, Esmeraldas-García GA, Mendoza-León AF, & Canchignia-Martínez HF. Plant growth promoting bacteria with potential biocontrol agent of *Fusarium oxysporum* f. Sp. *lycopersici*, and *Monilophthora roreri*. *Scientia Agropecuaria*. 2019;10(3):393–402. Disponible en: <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.03.10>

Guevara-Díaz, J. A., Maldonado, M., Valadez, D., Muro, R., & Matsumoto, I. (2021). Resistencia Bacteriana: Organismos Del Grupo ESKAPE. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 41 (3)

Gupta, R. S., Patel, S., Saini, N., & Chen, S. (2020). Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel *Bacillaceae* genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the *Subtilis* and *Cereus* clades of species. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 70(11), 5753-5798. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004475>

Gutiérrez-Jiménez, Javier, Luna-Cazáres, Lorena Mercedes, Mendoza-Orozco, Mónica Ivonne, Díaz-Marina, Gabriela de Jesús, Burguete-Gutiérrez, Julio César, & Feliciano-Guzmán, José Manuel. (2015). Organización, mantenimiento y preservación de la Colección de Cultivos Bacterianos del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH), México. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 35(2), 95-102. Recuperado en 19 de junio de 2024, de [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562015000200007&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562015000200007&lng=es&tlng=es).

Guzmán-Moreno, J., García-Ortega, L. F., Torres-Saucedo, L., Rivas-Noriega, P., Ramírez-Santoyo, R. M., Sánchez-Calderón, L., Quiroz-Serrano, I. N., & Vidales-Rodríguez, L. E. (2022). *Bacillus megaterium* HgT21: a Promising Metal Multiresistant Plant Growth-Promoting Bacteria for Soil Bioremediation. *Microbiology Spectrum*, 10(5). <https://doi.org/10.1128/spectrum.00656-22>

Guzmán, D. (2018). Análisis Químico Del Antibiótico Producido Por *Bacillus Megaterium* Aislado De Muestras De Suelo, Mediante Cromatografía Y Técnicas Espectroscópicas. Universidad Politécnica Salesiana

Hernández, S., (2018). *Tiny Earth A Research Guide to Student Sourcing Antibiotic Discovery* (2da Ed). XanEdu.

Hoffman, C.S. & Winston, F. (1987). A ten minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. 267-272.

GBD 2019 Antimicrobial Resistance Collaborators. (2022). Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*, 400(10369), 2221-2248. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(22\)02185-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(22)02185-7)

Kato, A. (2024). Isolation and draft genome sequence of *Enterobacter asburiae* strain i6 amenable to genetic manipulation. *Journal Of Genomics*, 12, 26-34. <https://doi.org/10.7150/jgen.91337>

Khan Academy. (2017). Variación genética en procariontes. <https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/mutations-ap/a/genetic-variation-in-prokaryotes>

Khoa, N. Đ., Giàu, N. Đ. N., & Tuấn, T. Q. (2016). Effects of *Serratia nematodiphila* CT-78 on rice bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Biological Control*, 103, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.07.010>

Kibret, M., & Abera, B. (2011). Antimicrobial susceptibility patterns of *E. coli* from clinical sources in northeast Ethiopia. *African health sciences*, 11 Suppl 1(Suppl 1), S40–S45. <https://doi.org/10.4314/ahs.v11i3.70069>

Li, J., Zhang, Z., Wu, Z., Qu, S., Wang, G., Wei, D., Li, P., & Ling, F. (2023). *Enterobacter asburiae* E7, a Novel Potential Probiotic, Enhances Resistance to *Aeromonas veronii* Infection via Stimulating the Immune Response in Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Microbiology Spectrum*, 11(2). <https://doi.org/10.1128/spectrum.04273-22>

Li Q, Hou Z, Zhou D, Jia M, Lu S, & Yu J. (2022). A plant growth-promoting bacteria *Priestia megaterium* JR48 induces plant resistance to the crucifer black rot via a salicylic acid-dependent signaling pathway. *Front. Plant Sci.* 13:1046181. doi: 10.3389/fpls.2022.1046181

Liu, J., Liang, Y., Wang, S., Jin, N., Sun, J., Lu, C., Sun, Y., Li, S., Fan, B., & Wang, F. (2023). Antimicrobial activity and comparative metabolomic analysis of *Priestia megaterium* strains derived from potato and dendrobium. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-32337-6>

Lopardo, H., Predari, S. & Vay, C. (2016). Bacterias de Importancia clínica. Manual De Microbiología Clínica De La Asociación Argentina De Microbiología. ISBN 978-987-26716-8-6

Mau, S., Vega, K., & Araya, M. (2011). Aislamiento De Bacterias Del Suelo Y Su Potencial Utilización En Sistemas De Tratamiento De Aguas Residuales. *Revista de Ciencias Ambientales*, 42(2), 2215-3896. DOI: <http://dx.doi.org/10.15359/rca.42-2.4>

Mardaneh, J., & Dallal, M. M. S. (2016). Isolation and Identification Enterobacter asburiae from Consumed Powdered Infant Formula Milk (PIF) in the Neonatal Intensive Care Unit (NICU). *DOAJ (DOAJ: Directory Of Open Access Journals)*, 54(1), 39-43. <https://doaj.org/article/c58405d684724fb6a7b467d56a86f666>

Martínez, B. & Soto, G. (2018) Aplicación De Consorcios Microbianos En La Agricultura. Universidad Autónoma de Querétaro.



Martínez-Romero E, Rodríguez-Medina N, Beltrán-Rojel M, Silva-Sánchez J, Barrios-Camacho H, Pérez-Rueda E, & Garza-Ramos U. Clasificación errónea de aislados de *Klebsiella variicola* y *Klebsiella quasipneumoniae* obtenidos de plantas, animales y humanos. *Salud Publica Mex* 2018;60:56-62. <http://doi.org/10.21149/8149>

Mata, N. J. M., & Natera, J. R. M. (2009). Efecto del ácido indol acético y ácido naftaleno acético sobre el rendimiento en melón (*Cucumis melo L*). *Revista Científica UDO Agrícola*, 9(4), 793-801. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3394093>

Okudo, I., Umedum, C., Ezekwueche, S. & Uba, C. (2020). Preliminary Screening of Bacteria Isolated from Insects Living in Poultry for Antibiotic Production. *Microbiology Research Journal International*. ISSN: 2456-7043

OMS. (2023). Resistencia a los antibióticos. Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>

Oromí, J. (2000). Resistencia bacteriana a los antibióticos. ELSEVIER. <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-resistencia-bacteriana-losantibioticos-10022180>

Osorio-Vega, N. W. (2009). Microorganismos del suelo y su efecto sobre la disponibilidad y absorción de nutrientes por las plantas. En *Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelos & Centro Nacional de Investigaciones de Café (Eds.)*, *Materia orgánica biología del suelo y productividad agrícola: Segundo seminario regional comité regional eje cafetero* (pp. 43–71). Cenicafé. [https://doi.org/10.38141/10791/0003\\_3](https://doi.org/10.38141/10791/0003_3)

Pancho, A. & Muñoz, J. (2023) Aplicaciones de *Klebsiella variicola* y uso potencial en la producción agrícola. *Benemérita Universidad Autónoma de Puebla*. <http://doi.org/10.5281/zenodo.7993587>

Parada, R., Marguet, E., & Vallejo, M. (2017). Aislamiento Y Caracterización Parcial De Actinomicetos De Suelos Con Actividad Antimicrobiana Contra Bacterias Multidrogo-Resistentes. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.64098>

Paul, A., & Mukherjee, S. K. (2016). *Enterobacter asburiae* KUNi5, a Nickel Resistant Bacterium for Possible Bioremediation of Nickel Contaminated Sites. *Polish Journal Of Microbiology*, 65(1), 115-118. <https://doi.org/10.5604/17331331.1197284>

Pavone, D. (2022). *Azotobacter* en la agricultura: Una bacteria biofertilizante que protege a las plantas. *TECNOVITA*. <https://tecnovitaca.com/azotobacter-biofertilizante/>

Peralta, P. (2023). Caracterización Molecular Y Fenotípica De Aislamientos De *Klebsiella* Spp. De Interés Clínico Y Epidemiológico Obtenidos En Hospitales De Querétaro. *Universidad Autónoma de Querétaro*. FQMAC-300251-0223-323

Pérez, M. (2020). Bacterias ESKAPE y Nuevas Estrategias de Combate. [https://oa.upm.es/67013/1/TFG\\_MALENA\\_PEREZ\\_LORENZO.pdf](https://oa.upm.es/67013/1/TFG_MALENA_PEREZ_LORENZO.pdf)

Piazza, A. (s. f.). Caracterización de Bacterias Utilizables en Procesos de Biorremediación de Aguas. [https://rephip.unr.edu.ar/bitstream/handle/2133/15987/PIAZZA\\_AINELEN.pdf?sequence=3&isAllowed=y](https://rephip.unr.edu.ar/bitstream/handle/2133/15987/PIAZZA_AINELEN.pdf?sequence=3&isAllowed=y)

Piña, J. (2022). Búsqueda de bacterias productoras de antibióticos como estrategia para generar futuras estrategias de control de microorganismos patógenos de humanos. Repositorio Universidad Autónoma de Querétaro. <http://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/3941>

Prieto, M., Martínez, C., Aguerre, L., Rocca, M. F., Cipolla, L., & Callejo, R. (2016). Antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* in Argentina. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 34(2), 91-95. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.03.007>

Ramírez, M. (2016). Extracción y Caracterización de Metabolitos Secundarios a Partir de *Bacillus thuringiensis*. <https://repositorioinstitucional.buap.mx/bitstream/handle/20.500.12371/2246/081116T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Ritter, J. M., Flower, R. J., Henderson, G., Rang, H. P., Mrcp, Y. K. L. M. B., MD, & MacEwan, D. (2020). Rang y Dale. Farmacología. Elsevier.

Rodríguez, C., & Zhurbenko, R. (2018). Manual De Medios De Cultivo (4ª ed.). BioGen.

Rodríguez, N., Barrios, H., Duran, J. & Garza, U. (2019). *Klebsiella Variicola*: An Emerging Pathogen In Humans. Instituto Nacional de Salud Pública. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1634981>

Rosete, M., Quintero, V., Morales, Y., Rodriguez, O., & Rivera, A. (2019). La Personalidad Multifacética Del Género *Klebsiella*: El Bueno, El Malo Y El Feo. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. <https://estadisticas.repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/9332?locale-attribute=es>

Sanli Fengxiang. (2023). Why is Ethyl Acetate a Good Solvent for Extraction?. <https://www.slchemtech.com/news/why-is-ethyl-acetate-a-good-solvent-for-extraction.html>

Sanchoyarto, R. (2020). Texturas del Suelo en el Viñedo. <https://www.aprenderdevino.es/suelos-textura/#:~:text=Suelo%20Arenoso%3A%20Este%20suelo%20est%C3%A1,No%20presenta%20adhesividad>

Soenens, A., & Imperial, J. (2019). Biocontrol capabilities of the genus *Serratia*. *Phytochemistry Reviews*, 19(3), 577-587. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09657-5>

Stock I. (2002). Natural antibiotic susceptibility of *Enterobacter* spp., with special reference to *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter intermedius* strains. *Journal of chemotherapy* (Florence, Italy), 14(5), 444-460. <https://doi.org/10.1179/joc.2002.14.5.444>



Srakocic, S. (2020). Understanding the Relationship Between Antibiotics and Bacteria. Healthline. <https://www.healthline.com/health/antibiotics/how-do-bacteria-become-resistant-to-antibiotics>

Tarback, E. J., & Lutgens, F. K. (2005). Ciencias de la Tierra: una introducción a la geología física. PRENTICE HALL.

Universidad Nacional Autónoma de México. (2019). Recomendaciones para el control de la resistencia antimicrobiana en México. UNAM. <http://www.puis.unam.mx/ReportePUCRArecomendaciones.pdf>

Universidad Pedagógica Nacional. (s.f.). Línea de Investigación en Biodiversidad Biotecnología y Conservación. Grupo de Investigación Estudios en Enseñanza de la Biología. <https://bbcdbiupn.wordpress.com/vf/laboratorio-1/>

Universidad de Puerto Rico. (2013). Extracción de ADN genómico. Recinto Universitario de Mayagüez. [http://biology.uprm.edu/files/modulo\\_i\\_extraccion\\_de\\_adn.pdf](http://biology.uprm.edu/files/modulo_i_extraccion_de_adn.pdf)

Vargas, C. (2015). Análisis Microbiológico De Suelos (2da ed.). INTA.

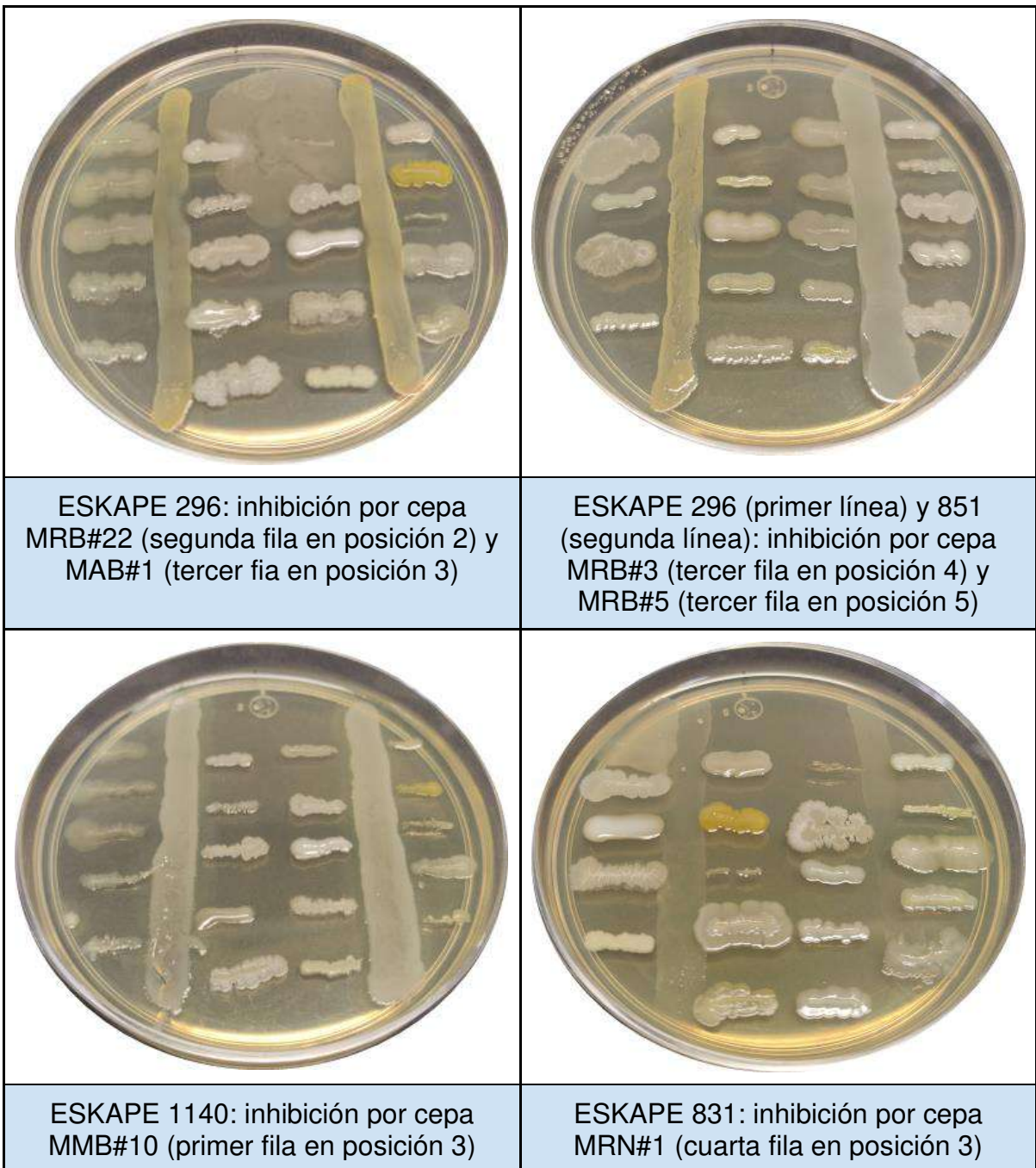
Weber (2021). El valor del medicamento desde una perspectiva social 2021. Madrid, España: Fundación Weber.

Yassin NA, & Ahmad AM. (2012). Incidence and Resistotyping Profiles of *Bacillus subtilis* Isolated from Azadi Teaching Hospital in Duhok City, Iraq. Mater Sociomed. 194-7. doi: 10.5455/msm.2012.24.194-197. PMID: 23678324; PMCID: PMC3633405.

Zhang, C., Yang, S., Xu, M., Sun, J., Liu, H., Liu, J., Liu, H., Kan, F., Sun, J., Lai, R., & Zhang, K. (2009). *Serratia nematodiphila* sp. nov., associated symbiotically with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditoides chongmingensis* (Rhabditida: Rhabditidae). International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology, 59(7), 1603-1608. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.003871-0>

## 9.- Apéndice

### 1.- Resultados estriado cruzado





ESKAPE 830: inhibición por cepa MAB#1 (tercer fila posición 3)



ESKAPE 1044: inhibición por cepa MFB#3 (segunda fila posición 4)



ESKAPE 1044 (primer línea) y 830 (segunda línea): inhibición por cepa MMN#9 (primer fila posición 2) y MRN#6 (cuarta fila posición 4)



ESKAPE 296 BHI: inhibición por cepa MRB#3 (primer fila posición 4), MRB#5 (primer fila posición 5), MRB#22 (segunda fila posición 2) y MFB#18 (tercer fila posición 3)





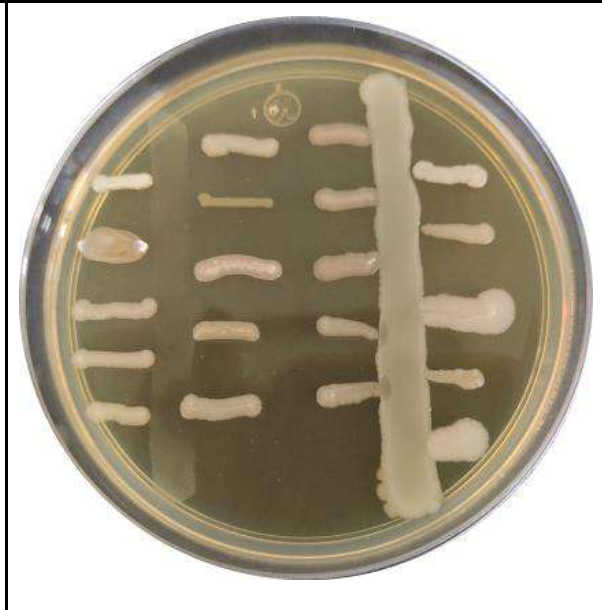
ESKAPE 296 (primer línea) y 830 (segunda línea) BHI: inhibición por cepa MRB#3 (tercer fila posición 4), MRB#5 (tercer fila posición 5) y MRB#11 (cuarta fila posición 1)



ESKAPE 830 BHI: inhibición por cepa MAB#1 (primer fila posición 3)



ESKAPE 831 BHI: inhibición por cepa MRB#11 (segunda fila posición 1)



ESKAPE 831 (primer línea) y 851 (segunda línea) BHI: inhibición por cepa MRN#3 (segunda fila posición 5), MRB#3 (tercer fila posición 4) y MRB#5 (tercer fila posición 5)



ESKAPE 851 BHI: inhibición por cepa MRN#3 (cuarta fila posición 5)



ESKAPE 1044 BHI: inhibición por cepa MRB#3 (primer fila posición 4), MRB#5 (primer fila posición 5) y MAB#1 (tercer fila posición 3)



ESKAPE 1044 (primer línea) y 1140 (segunda línea) BHI: inhibición por la cepa MAB#1 (segunda fila posición 5)



ESKAPE 1208 BHI: inhibición por la cepa MRB#5 (primer fila posición 5) y MRB#22 (segunda fila posición 2)





ESKAPE 830 A. Nut: inhibición por la cepa MAN#5 (tercer fila posición 1) y MAN#7 (tercer fila posición 3)



ESKAPE 831 (primer línea) y 296 (segunda línea) A. Nut: inhibición por la cepa MRN#9 (tercer fila posición 4)



ESKAPE 296 A. Nut: inhibición por la cepa MAN#7 (tercer fila posición 1) y MAN#11 (tercer fila posición 3)



ESKAPE 851 A. Nut: inhibición por la cepa MRN#25 (segunda fila posición 4)



ESKAPE 851 (primer línea) y 1044 (segunda línea) A. Nut: inhibición por la cepa MRN#9 (tercer fila posición 4) y MRN#25 (cuarta fila posición 4)



ESKAPE 296 BHI: inhibición por la cepa MRN#9 (segunda fila posición 4) y MFN#5 (tercer fila posición 3)



ESKAPE 296 (primer línea) y 830 (segunda línea) BHI: inhibición por la cepa MRN#9 (cuarta fila posición 4)



ESKAPE 830 BHI: inhibición por la cepa MFN#3 (primer fila posición 2)



ESKAPE 851 BHI: inhibición por la cepa MRN#2 (segunda fila posición 4) y MRN#6 (tercer fila posición 2)



ESKAPE 851 (primer línea) y 1044 (segunda línea) BHI: MFN#3(primer fila posición 2), MFN#5 (primer fila posición 3), MFN#8 (primer fila posición 4), MRN#8 (tercer fila posición 3) y MRN#25 (cuarta fila posición 4)



ESKAPE 1140 (primer línea) y 1208 (segunda línea) BHI: inhibición por la cepa MRN#25 (cuarta fila posición 4)



ESKAPE 1217 BHI: inhibición por la cepa MAN#14 (primer fila posición 5)





ESKAPE 831 A. Nut: inhibición por la cepa MAA#19 (tercera fila posición 1), M2B#2 (tercera fila posición 2), M2B#6 (cuarta fila posición 1) y M2B#7 (cuarta fila posición 2)



ESKAPE 296 (primer línea) y 830 (segunda línea) A. Nut: inhibición por la cepa MAA#19 (primer fila posición 3)



ESKAPE 831 (primer línea) y 851 (segunda línea) A. Nut: inhibición por la cepa M2B#3 (primer fila posición 3)



ESKAPE 1044 A. Nut: inhibición por la cepa MRA#8 (primer fila posición 5)



ESKAPE 1044 (primer línea) y 1140 (segunda línea) A. Nut: inhibición por la cepa M2B#3 (primer fila posición 3) y MFA#2 (cuarta fila posición 3)



ESKAPE 1140 A. Nut: inhibición por la cepa MAA#2 (primer fila posición 2), MAA#3 (primer fila posición 3) y M2B#3 (tercer fila posición 3)



ESKAPE 296 BHI: inhibición por la cepa MAA#3 (tercer fila posición 3)



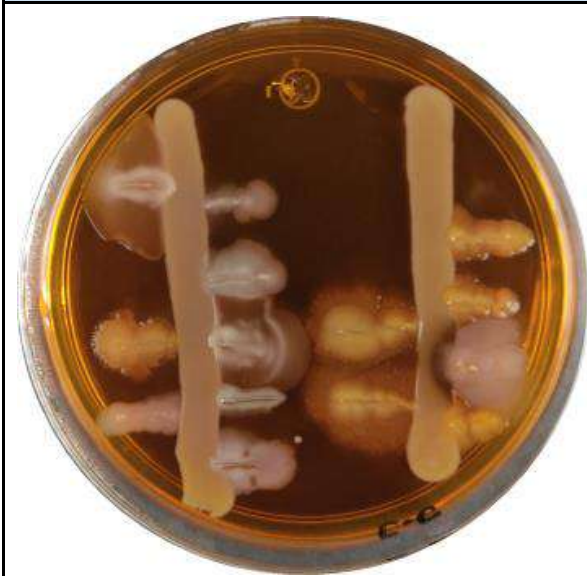
ESKAPE 296 BHI: inhibición por la cepa M4B#3 (segunda fila posición 5)



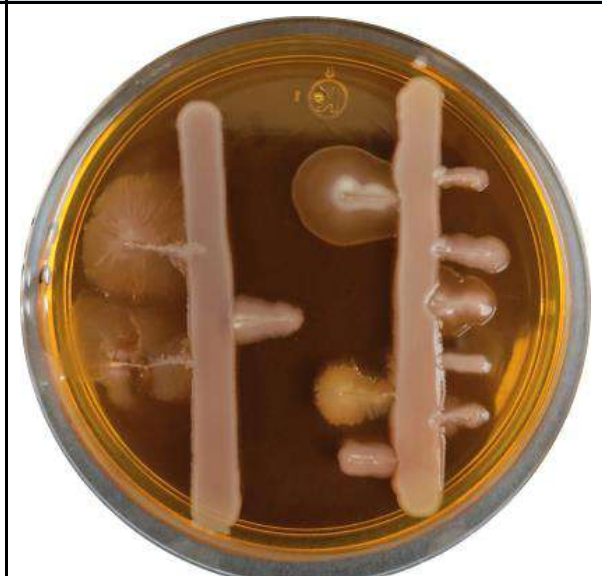
ESKAPE 851 BHI: inhibición por la cepa MRA#8 (primer fila posición 5)



ESKAPE 851 (primer línea) y 1044 (segunda línea) BHI: inhibición por la cepa MRA#8 (tercer fila posición 5)



ESKAPE 296 BHI: inhibición por la cepa M3A#12 (cuarta fila posición 4)



ESKAPE 851 (primer línea) y 1044 (segunda línea) BHI: inhibición por la cepa M4N#2 (cuarta fila posición 3)





ESKAPE 296 A. Nut: inhibición por la cepa MPB#2 (primer fila posición 1), MPB#3 (primer fila posición 2), MPB#4 (primer fila posición 3), MPB#7 (primer fila posición 4), MNA#5 (segunda fila posición 1), MNA#7 (segunda fila posición 2), MNA#9 (segunda fila posición 3), MNA#10 (segunda fila posición 4), MNA#11 (tercer fila posición 1), MPA#1 (tercer fila posición 2), MPA#6 (tercer fila posición 3), MPA#9 (tercer fila posición 4), MPA#11 (cuarta fila posición 1)





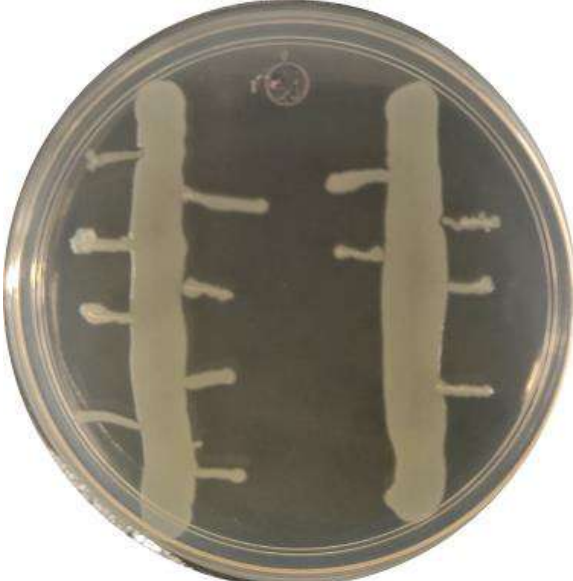

ESKAPE 830 A. Nut: inhibición por la cepa MPB#7 (primer fila posición 4) y MPA#6 (tercer fila posición 3)





ESKAPE 851 A. Nut: inhibición por la cepa MPB#2 (primer fila posición 1) y MPB#7 (primer fila posición 4)

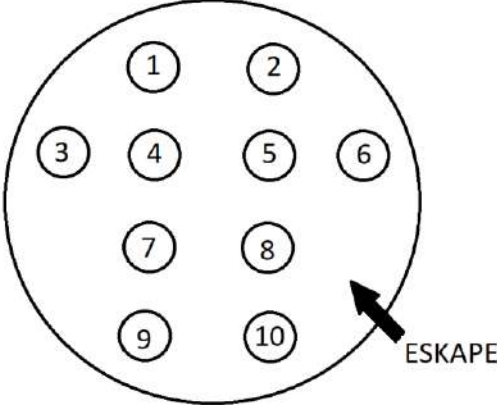



ESKAPE 1044 A. Nut: inhibición por la cepa MPB#2 (primer fila posición 1), MPB#7 (primer fila posición 4)

	y MPA#6 (tercer fila posición 3)
	
<p>ESKAPE 1140 A. Nut: inhibición por la cepa MPB#2 (primer fila posición 1), MPB#3 (primer fila posición 2), MPB#4 (primer fila posición 3), MPB#7 (primer fila posición 4), MNA#5 (segunda fila posición 1), MNA#7 (segunda fila posición 2), MNA#9 (segunda fila posición 3), MNA#10 (segunda fila posición 4), MNA#11 (tercer fila posición 1), MPA#1 (tercer fila posición 2), MPA#6 (tercer fila posición 3), MPA#9 (tercer fila posición 4), MPA#11 (cuarta fila posición 1)</p>	<p>ESKAPE 1208 A. Nut: inhibición por la cepa MPB#7 (primer fila posición 4), MNA#5 (segunda fila posición 1) y MPA#6 (tercer fila posición 3)</p>
	
<p>ESKAPE 1217 A. Nut: inhibición por la</p>	<p>ESKAPE 851 (primer línea) y 1044</p>

<p>cepa MPB#2 (primer fila posición 1), MPB#7 (primer fila posición 4) y MPA#6 (tercer fila posición 3)</p>	<p>(segunda línea) BHI: inhibición por la cepa MPA#6 (segunda fila posición 3)</p>
	
<p>ESKAPE 1044 BHI: inhibición por la cepa MPA#6 (cuarta fila posición 3)</p>	<p>ESKAPE 1217 BHI: inhibición por la cepa MPA#6 (segunda fila posición 3)</p>

## 2.- Resultados prueba Patch – Patch

	
<p>Ejemplo de estructura para prueba de reinhibición Patch-Patch, los círculos pequeños son las bacterias a prueba y la ESKAPE es el tapete</p>	<p>ESKAPE 296 A. Nut: reinhibición por las cepas MRB#3 (posición 2), MRB#5 (posición 3), MRB#22 (posición 5), MFB#3 (posición 6), MAB#1 (posición 7), MRN#1 (posición 9) y MRN#3 (posición 10)</p>





ESKAPE 830 A. Nut: reinhibición por las cepas MRB#3 (posición 2), MRB#5 (posición 3), MRB#11 (posición 4), MRB#22 (posición 5), MFB#3 (posición 6), MAB#1 (posición 7), MMN#9 (posición 8) y MRN#3 (posición 10)



ESKAPE 851 A. Nut: reinhibición por las cepas MRB#3 (posición 2), MRB#5 (posición 3), MRB#22 (posición 5), MFB#3 (posición 6), MMN#9 (posición 8) y MRN#3 (posición 10)



ESKAPE 1044 A. Nut: reinhibición por las cepas MRB#3 (posición 2), MRB#5 (posición 3), MRB#22 (posición 5), MFB#3 (posición 6), MMN#9 (posición 8) y MRN#3 (posición 10)



ESKAPE 1208 A. Nut: reinhibición por las cepas MMB#10 (posición 1), MRB#3 (posición 2), MRB#5 (posición 3), MRB#22 (posición 5), MFB#3 (posición 6), MAB#1 (posición 7), MRN#1 (posición 9) y MRN#3 (posición 10)



ESKAPE 296 BHI: reinhibición por las cepas MRB#3 (posición 2), MRB#5 (posición 3), MRB#22 (posición 5) y MRN#3 (posición 10)



ESKAPE 830 BHI: reinhibición por las cepas MRB#3 (posición 2), MRB#5 (posición 3), MRB#22 (posición 5), MAB#1 (posición 7), MMN#9 (posición 8) y MRN#3 (posición 10)



ESKAPE 851 BHI: reinhibición por las cepas MRB#3 (posición 2), MRB#22 (posición 5), MFB#3 (posición 6), MMN#9 (posición 8) y MRN#3 (posición 10)



ESKAPE 1044 BHI: reinhibición por las cepas MRB#3 (posición 2), MRB#5 (posición 3), MRB#22 (posición 5), MFB#3 (posición 6), MAB#1 (posición 7), MMN#9 (posición 8), MRN#1 (posición 9) y MRN#3 (posición 10)





ESKAPE 1208 BHI: reinhibición por las cepas MRB#3 (posición 2), MRB#5 (posición 3), MRB#22 (posición 5) y MRN#3 (posición 10)



ESKAPE 296 A. Nut: reinhibición por la cepa MRN#9 (posición 2), MRN#25 (posición 3), MFN#5 (posición 5), MAN#7 (posición 6), MAN#11 (posición 8) y MRA#8 (posición 10)



ESKAPE 830 A. Nut: reinhibición por la cepa MRN#9 (posición 2), MRN#25 (posición 3), MFN#5 (posición 5), MAN#7 (posición 6), MAN#11 (posición 8) y MRA#8 (posición 10)



ESKAPE 851 A. Nut: reinhibición por la cepa MRN#9 (posición 2), MRN#25 (posición 3), MFN#5 (posición 5), MAN#7 (posición 6), MAN#11 (posición 8) y MRA#8 (posición 10)



ESKAPE 1044 A. Nut: reinhibición por la cepa MRN#9 (posición 2), MRN#25 (posición 3), MFN#5 (posición 5), MAN#7 (posición 6), MAN#11 (posición 8) y MRA#8 (posición 10)



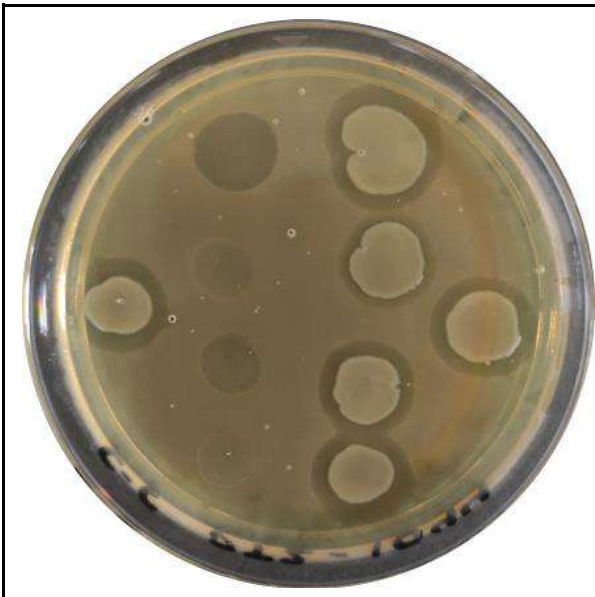
ESKAPE 296 BHI: reinhibición por la cepa MAN#11 (posición 8)



ESKAPE 830 BHI: reinhibición por la cepa MRN#9 (posición 2), MRN#25 (posición 3), MAN#7 (posición 6), MAN#11 (posición 8) y MRA#8 (posición 10)



ESKAPE 851 BHI: reinhibición por la cepa MRN#9 (posición 2), MRN#25 (posición 3), MFN#5 (posición 5), MAN#7 (posición 6), MAN#11 (posición 8) y MRA#8 (posición 10)



ESKAPE 1044 BHI: reinhibición por la cepa MRN#9 (posición 2), MRN#25 (posición 3), MFN#5 (posición 5), MAN#7 (posición 6), MAN#11 (posición 8) y MRA#8 (posición 10)



ESKAPE 296 A. Nut: reinhibición por la cepa MFA#2 (posición 1), MAA#2 (posición 3), M2B#3 (posición 7) y MAN#6 (posición 8)



ESKAPE 851 A. Nut: reinhibición por la cepa MAA#2 (posición 3)

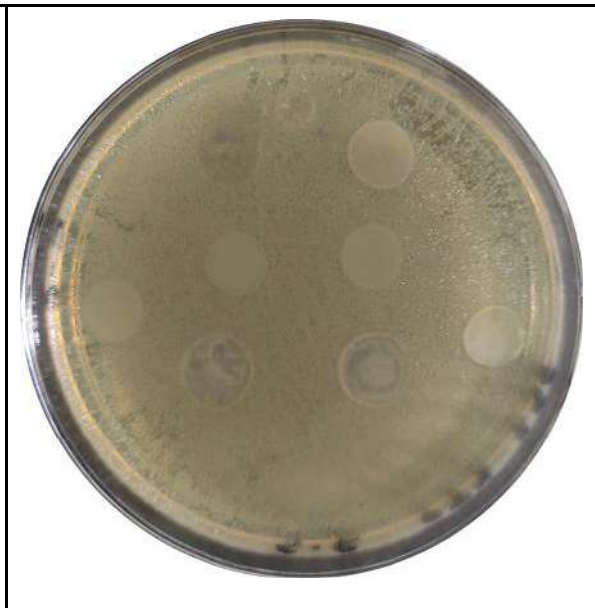


ESKAPE 1044 A. Nut: reinhibición por la cepa MFA#2 (posición 1), MAA#2 (posición 3), M2B#3 (posición 7)

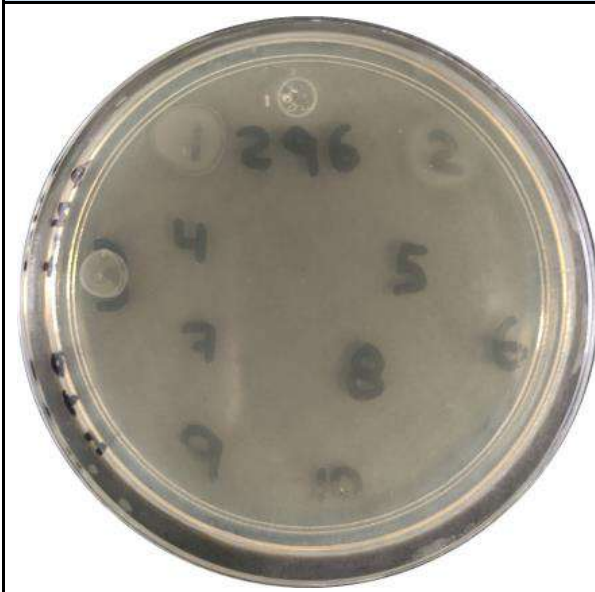




ESKAPE 1140 A. Nut: reinhibición por la cepa MFA#2 (posición 1), MAA#2 (posición 3) y M2B#3 (posición 7)



ESKAPE 296 BHI: reinhibición por la cepa M2B#3 (posición 7) y MAN#6 (posición 8)



ESKAPE 294 A. Nut: reinhibición por la cepa M4N#2 (posición 3)



ESKAPE 1044 A. Nut: reinhibición por la cepa M4N#2 (posición 3)



ESKAPE 296 A. Nut: reinhibición por la cepa MPA#6 (posición 1)



ESKAPE 851 A. Nut: reinhibición por la cepa MPB#2 (posición 1), MPB#7 (posición 4), MNA#5 (posición 5), MNA#7 (posición 6), MNA#10 (posición 8), MNA#11 (posición 9) y MPA#1 (posición 10)



ESKAPE 851 A. Nut: reinhibición por la cepa MPA#6 (posición 1)



ESKAPE 1044 A. Nut: MPB#2 (posición 1), MPB#4 (posición 3), MPB#7 (posición 4), MNA#5 (posición 5), MNA#7 (posición 6), MNA#9 (posición 7), MNA#10 (posición 8), MNA#11 (posición 9) y MPA#1 (posición 10)



ESKAPE 1044 A. Nut: reinhibición por la cepa MPA#6 (posición 1) y MPA#11 (posición 3)



ESKAPE 1140 A. Nut: MPB#2 (posición 1), MPB#4 (posición 3), MPB#7 (posición 4), MNA#5 (posición 5), MNA#7 (posición 6), MNA#9 (posición 7), MNA#10 (posición 8), MNA#11 (posición 9) y MPA#1 (posición 10)



ESKAPE 1140 A. Nut: reinhibición por la cepa MPA#6 (posición 1) y MPA#11 (posición 3)



ESKAPE 1208 A. Nut: reinhibición por la cepa MPA#6 (posición 1)

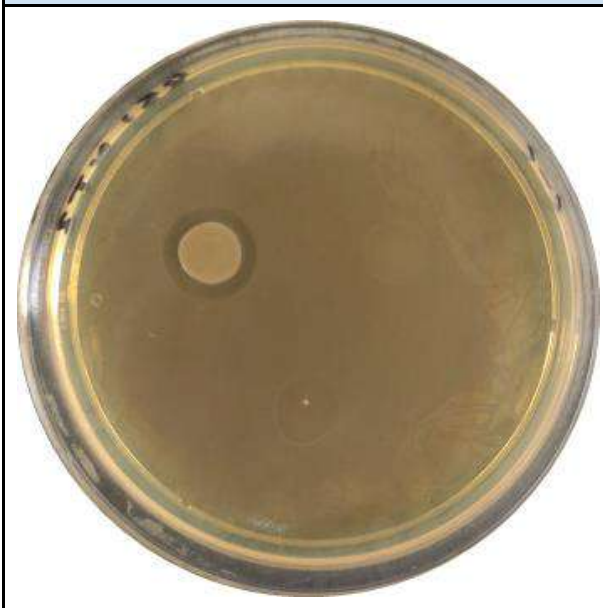




ESKAPE 1217 A. Nut: reinhibición por la cepa MPA#6 (posición 1)



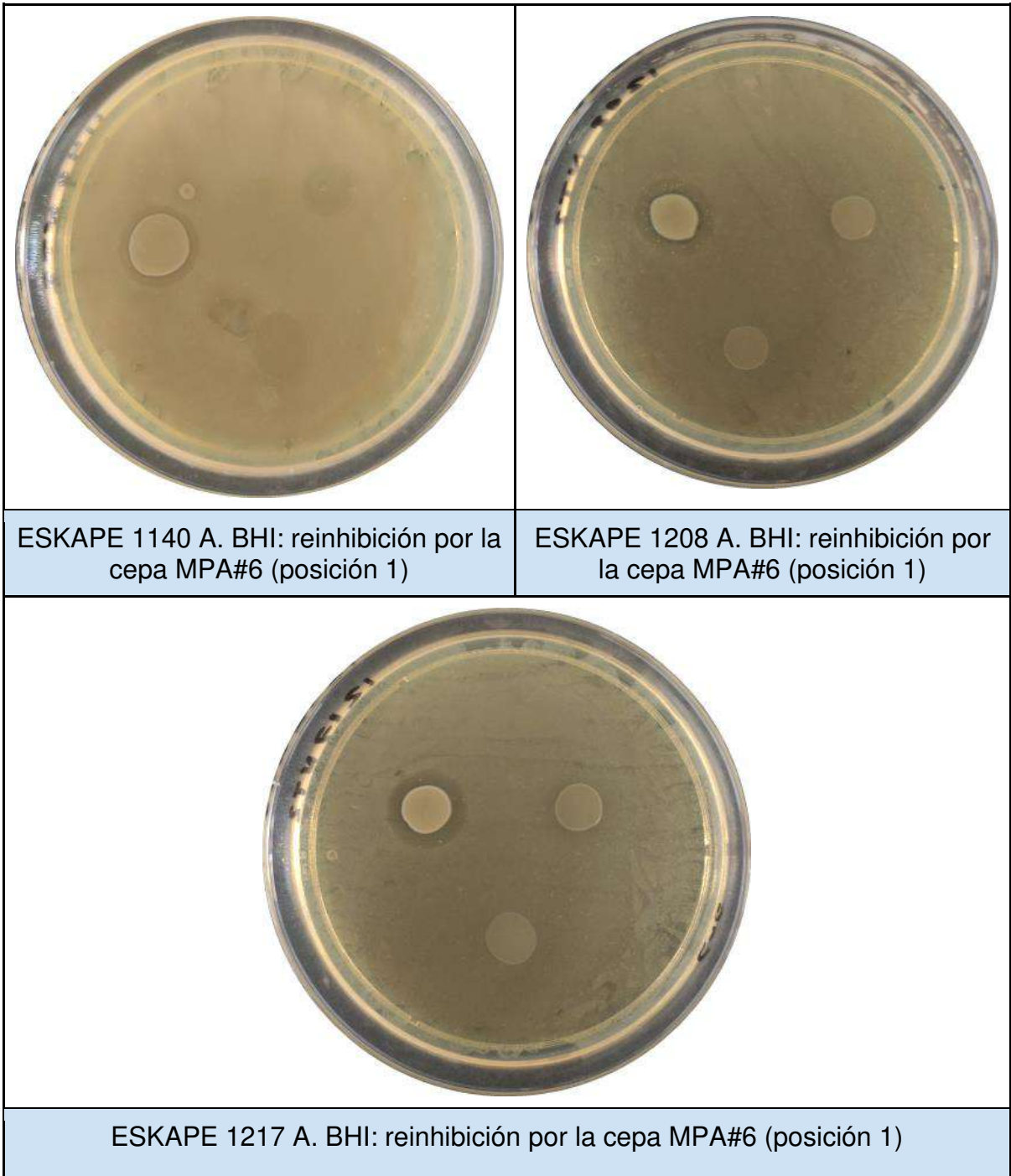
ESKAPE 296 A. BHI: reinhibición por la cepa MPA#6 (posición 1)



ESKAPE 851 A. BHI: reinhibición por la cepa MPA#6 (posición 1)



ESKAPE 1044 A. BHI: reinhibición por la cepa MPA#6 (posición 1)



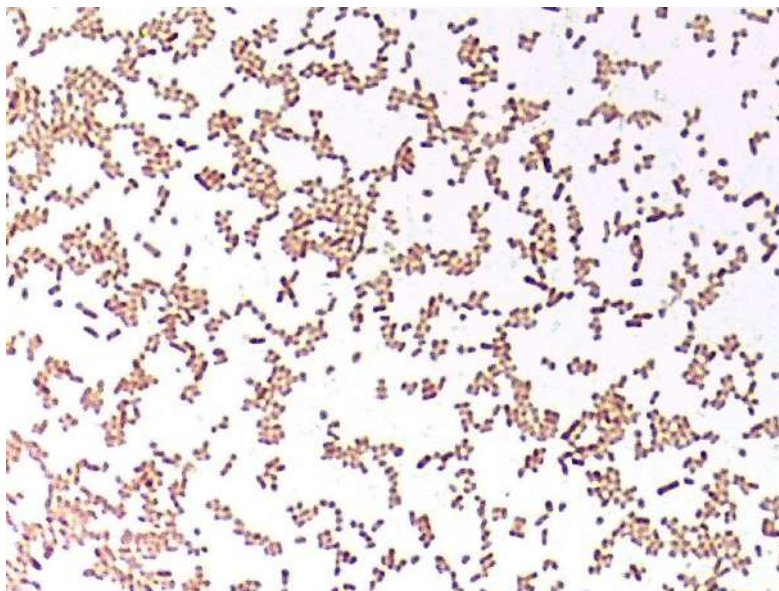
### 3.- Tinción de Gram:

A continuación, se muestran las tinciones vistas al microscopio para los 9 morfotipos seleccionados: MRB#3, MRB#5, MRB#22, MFB#3, MRN#3, MRN#25, MAN#7, MAA#2 y MPA#6.





MRB#3 diplococos Gram negativos (muestra de suelo de raíz de maíz) objetivo 100X.



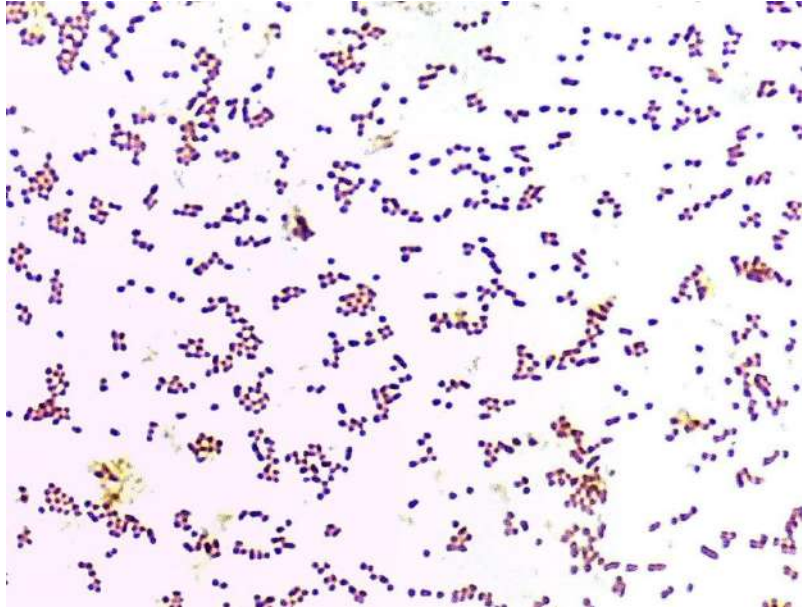
MRB#5 diplobacilos gram negativos (suelo de raíz de maíz) objetivo x100.



MRB#22 bacilos gram negativos (suelo de raíz de maíz) objetivo x100.



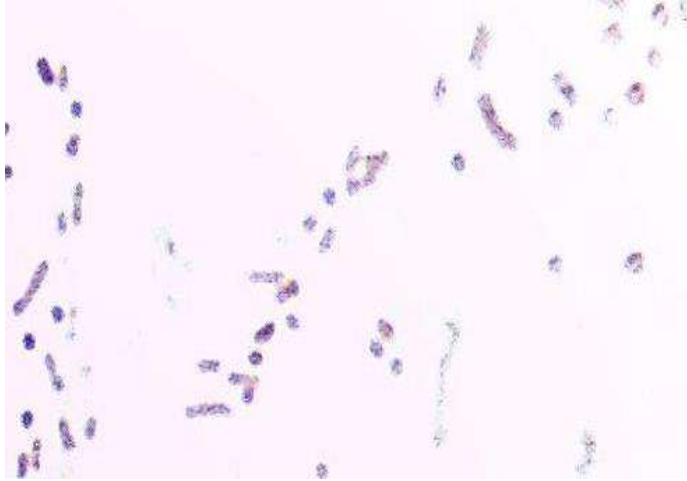
MFB#3 bacilos gram positivos (suelo de frijol) objetivo x100.



MRN#3 estafilococos gram negativos (suelo de raíz de maíz) objetivo x100.



MRN#25 bacilos gram negativos (suelo de raíz de maíz) objetivo x100.

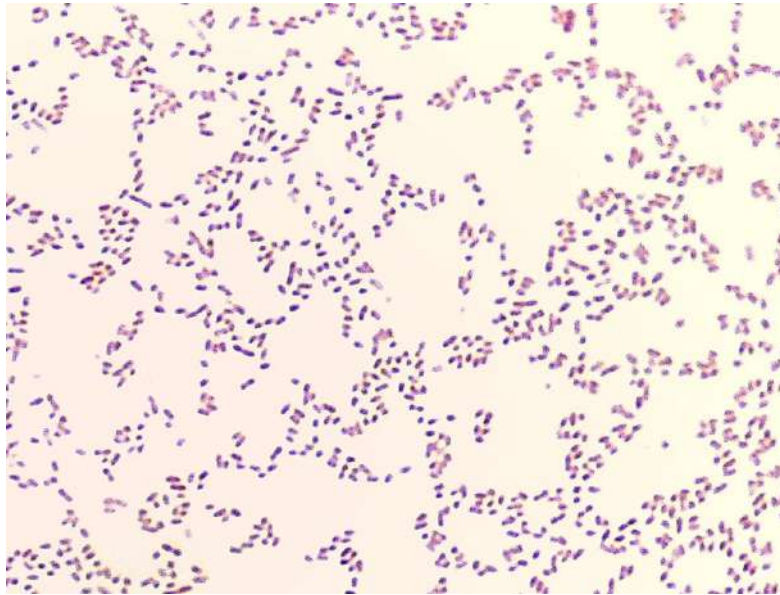


MAN#7 bacilos gram negativos (suelo de campus aeropuerto) objetivo x100.



MAA#2 bacilos Gram positivos (muestra suelo de campus aeropuerto) objetivo 100X.





MPA#6 bacilos gram negativos (suelo de cultivo en pausa) objetivo x100.

#### 4.- Pruebas api® 20 E™

Se muestran las pruebas bioquímicas correspondientes (api® 20 E™) para los 9 morfotipos seleccionados MRB#3, MRB#5, MRB#22, MFB#3, MRN#3, MRN#25, MAN#7, MAA#2 y MPA#6.



MRB#3 prueba api® 20 E™.



MRB#5 prueba api® 20 E™.



MRB#22 prueba api® 20 E™.



MFB#3 prueba api® 20 E™.



MRN#3 prueba api® 20 E™.



MRN#25 prueba api® 20 E™.



MAN#7 prueba api® 20 E™.



MAA#2 prueba api® 20 E™.



MPA#6 prueba api® 20 E™.

## 5.- Secuencias:

### *Priestia megaterium*:

```
TGCAGTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCG
GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGG
ATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTTC
ATGGGAGATGATTGAAAGATGTTTTCGGCTATCACTTACAGATGGG
```

CCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGC  
AACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGAC  
TGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCT  
TCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAT  
GAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTA  
CGAGAGTAACTGCTTGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAC  
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGC  
GTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCCGTTTCTTA  
AGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAA  
ACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTA  
GCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGC  
GGC

*Enterobacter asburiae*:

CTTGCTCCCGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGG  
AAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATA  
CCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTT  
GCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACG  
GCTCACCTAGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGC  
CACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA  
GTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCC  
GCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGG  
AGGAAGGTGTTGAGGTTAATAACCTCNNCAATTGACGTTACCCGCA  
GAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGG  
AGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGCA  
GGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGG  
AACTGCATTGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGGTAG  
AATCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACC  
GGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCG  
AAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC  
GTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCC  
GGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCT

*Klebsiella variicola*:

TGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAG  
CGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGG  
GATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGAC  
CAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGAT  
GGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATC  
CCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACCTGAGACAC  
GGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAAT  
GGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCT  
TCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGATNAGGTTAA  
TAACCTTGTGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACT  
CCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCG  
GAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGA  
TGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGAAACTGGCA  
GGCT

*Serratia nematodiphila*:

TGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGGGGAGCTTGCTCCCCGGGTGACG  
AGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGG  
GGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTGCAAG  
ACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCA  
GATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACG  
ATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGA ACTGAGA  
CACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCAC  
AATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGG  
CCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAGGTGGTGAGCT  
TAATACGCTCATCAATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAA  
CTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAAT  
CGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAG  
ATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTGAAACTGGC  
AAGCTAGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGT  
GAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCC  
CCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA  
CAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTT  
GGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAA  
ATCGACCGCCT