



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Microbiología



Búsqueda de bacterias productoras de antibióticos como estrategia para generar futuras estrategias de control de microorganismos patógenos de humanos

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Licenciado en Microbiología

Presenta:

José Emilio Ramírez Piña

Director

Dr. José Antonio Cervantes Chávez

Dr. José Antonio Cervantes Chávez

Presidente

Firma

Dra. Bertha Carvajal Gámez

Secretario

Firma

Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo

Vocal

Firma

Dr. Fidel Landeros Jaime

Vocal

Firma

Resumen

Actualmente en el ambiente y en los hospitales se encuentran una gran diversidad de bacterias patógenas con resistencia a antibióticos (RA). La búsqueda de nuevos antibióticos es una de las medidas más importantes que se deben de implementar para mitigar el inminente problema que enfrentamos hoy en día. Esta búsqueda es factible de realizarse en las bacterias del suelo, debido a que en esos nichos se encuentran en una lucha constante por recursos contra otras bacterias; por lo que poseen genes biosintéticos que les permitan producir moléculas con actividad antimicrobiana. El objetivo de este estudio fue aislar y caracterizar bacterias productoras de antibiótico (BPA) del suelo, con la capacidad de antagonizar bacterias ESKAPE parientes seguros (ESKAPePS) que son un grupo de bacterias que sirven para buscar antagonistas contra patógenos sin correr riesgo alguno; para así poder en un futuro mitigar el problema de la RA, como parte de la iniciativa del “Tiny Earth Project” de la Universidad de Wisconsin.

A partir de una muestra de suelo de una milpa de maíz en Pinal de Amoles, se seleccionaron BPA por estría cruzada utilizando bacterias ESKAPePS y los aislados que mostraron actividad antimicrobiana se conservaron en ultracongelación. Se seleccionaron los aislados que inhibieron una mayor cantidad de ESKAPePS, se caracterizaron bioquímicamente y se corroboró su actividad antimicrobiana por “Patch-Patch”. Se seleccionaron 7 bacterias que inhibieron un mayor número de ESKAPePS por Patch-Patch, se obtuvo un extracto orgánico (EO) utilizando acetato de etilo y hexano, se ensayó la efectividad de los EO contra de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Los aislados bacterianos se identificaron por secuenciación del fragmento del gen 16S, cinco son *Serratia nematodiphila* DZ0503SBS1, una es *Serratia marcescens* NBRC 102204. Los 7 EO obtenidos con acetato de etilo, mostraron inhibición del crecimiento de *S. aureus* y *E. coli*; mientras que los extractos orgánicos obtenidos con hexano no todos presentaron el mismo efecto antimicrobiano. También se determinó que los EO de una de las cepas de *S. nematodiphila* mostró efecto antibacteriano y antifúngico. El presente trabajo sienta las bases para un estudio más a fondo de las cepas de *S. nematodiphila* DZ0503SBS1 y *Serratia marcescens* NBRC 102204 aisladas de este suelo, para identificar sus clusters de genes biosintéticos (CGB), caracterizar las moléculas antimicrobianas e incluso debido a su naturaleza antibacteriana y antifúngica y analizar la posibilidad de ser utilizadas en el biocontrol de patógenos de plantas en las milpas.

Palabras clave: bacterias productoras de antibiótico, resistencia a antibióticos, bacterias ESKAPE, Tiny Earth project, ESKAPE/parientes seguros

Abstract

Nowadays in the environment and in the hospitals is possible to find a great diversity of pathogen bacteria resistant to antibiotics. The search for new antibiotics is one of the most important actions to be implemented to mitigate the imminent problem we face today. This search is feasible to realize in soil bacteria, because in this ecological niche the bacteria have a constant fight for resources with other microorganisms; so that these bacteria have biosynthetic gene clusters, that allow them to produce antimicrobial compounds. The objective of this study was to isolate and characterize the antibiotic producing bacteria from the soil, with the ability to antagonize members of the ESKAPE safe relatives, that are a group of bacteria for the research of antagonisms against pathogens with no risk; all these activities are intended to in a future mitigate the problem of antibiotic resistance, as part of the initiative "Tiny earth project"-Wisconsin University.

A soil sample of maize milpa in Pinal de Amoles was collected, several antibiotic producing bacteria were selected by cross-streak using ESKAPE safe relatives (SR), the isolates with antimicrobial activity were preserved in deep-frozen. The isolates that inhibited the growth against more ESKAPE-SR, were biochemically characterized and their antimicrobial activity was corroborated by Patch-Patch method. Seven isolates were chosen since they showed an inhibitory effect against more ESKAPEs by the Patch-Patch method. Next, the organic extract with ethyl acetate and hexane was obtained, it was retested the effectivity of organic extract against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The bacteria isolates were identified with DNA sequencing (16S), the analysis revealed that five isolates were *Serratia nematodiphila* DZ0503SBS1 and the other one was *Serratia marcescens* NBRC 102204. The seven organic extracts obtained with ethyl acetate, showed an inhibitory effect in *S. aureus* and *E. coli*; while the organic extracts from hexane not all presented the same antimicrobial activity. The OE obtained from one *S. nematodiphila* has antibacterial and antifungal properties. This work laid the foundations for a deeper study about *S. nematodiphila* DZ0503SBS1 and *Serratia marcescens* NBRC 102204 isolated from this soil, such as the identification of their biosynthetic gene clusters, characterize the antimicrobial molecules acting as antibiotics and even due to the antibacterial and antifungal properties analyze the possibility to use it in the biocontrol of plant pathogens from milpas.

Key words: Antibiotic-producing bacteria, antibiotic resistance, ESKAPE bacteria, Tiny Earth project, ESKAPE / safe relatives

Agradecimientos personales

A mis padres por ser los que me apoyaron durante todos mis estudios, dándome su paciencia, comprensión y su confianza; a mi padre que me apoyo económicamente durante mis estudios y me aconsejaba en ámbitos profesionales y a mi madre que me apoyaba como solo lo hace una madre.

A mi primo Mauricio Piña que siempre escuchaba atentamente sobre todas mis metas, mis logros y siempre estaba abierto a escuchar lo que aprendía y a preguntarme sobre aquello que me interesa sin que se lo pidiera, muchas gracias.

A mis hermanos que siempre estaban para en caso de que necesitara algo.

Gracias a cada uno de mis profesores de la licenciatura que me otorgaron su conocimiento y no solo eso si no mostrarme nuevas formas de estudiar y de ver la vida en el mundo, cambiando la forma en la cual pienso. Un agradecimiento en especial a Antonio, Etzel, Roberto, Karina, Berta, Ulises y Fidel.

A mis compañeros del LAMIMO, Evelia, Juanita, Erick, Daniel, Martín y Jakie por darle ese toque extra que se necesita en cualquier lado en el que se este un poco de alegría y humor sin olvidar el trabajo serio en cual también me compartieron parte de su conocimiento.

A mis amigos que hice durante la licenciatura, Ana, Evelyn, La Jan, El vic, Erick, Mayo, Andy y Charlie y que sin ellos posiblemente no sería la persona que soy actualmente y que con su amistad aportaron un grano de arena en mi vida

A Ignacia Galeana por siempre motivarme a seguir adelante, escuchar mis sueños aquello que me apasiona, lo que hacía día tras día para mi tesis y mostrar interés por lo que hago y lo que quiero hacer.

Agradecimientos institucionales

Gracias al laboratorio de microbiología molecular por permitirme realizar mi tesis y en especial a la M. Evelia Judith Figueroa y Salvador Ramírez por su apoyo en el laboratorio.

Gracias al Dr. Alberto Elizalde por apoyar con el rotoevaporador para la obtención de mis extractos orgánicos.

Gracias a mis sinodales la Dra. Bertha Carvajal Gámez, Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo y el Dr. Fidel Landeros Jaime. A mi codirector Dr. Francisco Barona Gómez. A mi director de tesis José Antonio Cervantes Chávez por ser un ejemplo de lo que es la pasión por el descubrimiento y el dedicarse a la ciencia y la docencia.

Gracias a Alexandra Elbakyan, a la cual muchos la han apodado como la Robin Hood de la ciencia, debido a que permitió hacer accesible un sin fin de artículos científicos para cualquier persona en el mundo permitiendo así facilitar los estudios universitarios en ciencias y las investigaciones científicas.

Índice

Índice de figuras	9
Índice de cuadros	10
2.1 ¿Qué es un antibiótico?	14
2.2 Historia de los antibióticos.....	14
2.3 Rol de los antibióticos en la naturaleza y CGB	15
2.3.1 Función de los antibióticos en la naturaleza	15
2.3.2 Clusters de genes biosintéticos	16
2.3.3 Ejemplo de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana.....	16
2.4 Resistencia a antibióticos.....	17
2.4.1 ¿qué es un gen de resistencia?.....	17
2.4.2 Base genética de la resistencia	17
2.4.3 Mecanismos de RA	19
2.4.4 Aspectos evolutivos de la RA	20
2.4.5 El problema de la RA	21
2.5 ¿Cómo mitigar el problema de la RA?.....	23
2.5.1 Alternativas a los antibióticos	23
2.5.2 Aproximaciones basadas en cultivo para buscar BPA.....	24
2.5.3 Iniciativas creadas en respuesta para la RA.....	25
3. Justificación	27
4. Hipótesis.....	29
5. Objetivos.....	29
5.1 Objetivo General	29
5.2 Objetivos Particulares	29
6. Materiales y Métodos.....	30
6.1 Trabajo en campo	31
6.1.1 Selección de los sitios de colecta.....	31
6.1.2Recolección de muestras	31
6.1.3Crecimiento de los ESKAPEsPS.....	31

6.2Trabajo de laboratorio	31
6.2.1 Aislamiento de bacterias presentes en muestras de suelo.....	31
6.2.2 Pruebas de inhibición por estría cruzada y Patch-Patch	32
6.2.3Resguardo de las bacterias productoras de antibiótico.....	34
6.2.4Caracterización bioquímica de las cepas productoras de antibiótico.....	34
6.2.5Tinciones de las bacterias candidatas identificadas por el método Patch-Patch	35
6.2.6Pruebas de susceptibilidad a antibióticos en las bacterias productoras	35
6.2.7Obtención de los EO de las bacterias productoras de antibióticos seleccionadas.....	35
6.2.8Determinación de la cantidad de antibiótico obtenido	36
6.2.9Determinación del efecto antibacteriano de los EO	36
6.2.10Análisis estadístico del efecto antibacteriano de los EO	37
6.2.11Extracción de ADN cromosómico	37
6.2.12Amplificación del gen 16s ARN.....	38
6.2.13Secuenciación y análisis filogenético.....	38
6.2.14Pruebas bioquímicas complementarias a la identificación molecular	39
6.2.15Prueba de citotoxicidad en levaduras	39
7.Resultados.....	41
7.1Descripción ambiental de los sitios de colecta y cantidad de bacterias aisladas.....	41
7.2Bacterias productoras de antibiótico identificadas por estría cruzada y Patch-Patch	42
7.3Morfología, características bioquímicas, perfil de resistencia a antibióticos de las bacterias productoras de antibiótico	45
7.4Efecto antimicrobiano de los extractos orgánicos	47
7.5Identificación molecular de las bacterias seleccionadas	51
7.6Efecto citotóxico de los EO en <i>S. cerevisiae</i>	54
7.7Efecto citotóxico de los EO en <i>C. albicans</i>	55
8.Discusión	58
8.1Bacterias aisladas del suelo con actividad antimicrobiana.....	58
8.2Perfil de resistencia a antimicrobianos y características bioquímicas de las cepas productoras de antibiótico.....	59
8.3Identificación de las cepas productoras de antibiótico	60
8.4Actividad antibacteriana de las cepas aisladas del género <i>Serratia</i>	61
8.5Actividad antifúngica de las serratias aisladas.....	63

10.Perspectivas	64
12.Anexos.....	75

Índice de figuras

Figura 1. Mecanismos de Resistencia a antibióticos	20
Figura 2. Diagrama de flujo de la estrategia experimental para aislar e identificar bacterias productoras de antibióticos.....	30
Figura 3. Diagrama de la caja de Petri donde se sembraron las colonias aisladas de los cultivos líquidos de las muestras de suelo	32
Figura 4. Diagrama del sembrado para identificar bacterias productoras de antibióticos por el método de estría cruzada	33
Figura 5. Diagrama para la inoculación e identificación de bacterias productoras de antibióticos por el método Patch-Patch.....	34
Figura 6. Número de aislados obtenidos de cada muestra de tierra sembrada en Agar LB y AN ...	41
Figura 7. Ejemplo de la siembra de los aislados.....	42
Figura 8. Ejemplo del efecto inhibitorio por estría cruzada	43
Figura 9. Número de aislados con actividad antimicrobiana contra alguna ESKAPEsPS en cada muestra por estría cruzada.....	43
Figura 10. Ejemplo del efecto inhibitorio por el método Patch-Patch	45
Figura 11. Tinción de Gram de una de las bacterias productoras de antibiótico.....	46
Figura 12. Efecto antimicrobiano de los extractos orgánicos extraídos con acetato de etilo de los aislados bacterianos con actividad antimicrobiana en <i>E. coli</i> Top 10.....	49
Figura 13. Efecto antimicrobiano de los extractos orgánicos extraídos con hexano de los aislados bacterianos con actividad antimicrobiana en <i>E. coli</i> Top 10	49
Figura 14. Efecto antimicrobiano de los extractos orgánicos extraídos con acetato de etilo etilo de los aislados bacterianos con actividad antimicrobiana en <i>S. aureus</i>	50
Figura 15. Efecto antimicrobiano de los extractos orgánicos extraídos con hexano de los aislados bacterianos con actividad antimicrobiana en <i>S. aureus</i>	51
Figura 16. Producto de amplificación obtenido a partir del gen 16S	52
Figura 17. Análisis filogenético de las cepas secuenciadas.	53
Figura 18. Resultados de la producción de prodigiosina	54
Figura 19. Efecto antifungico en cepas de <i>S. cerevisiae</i> tratadas con los EO de los aislados M2AN18-1 Y M3LB50-2.....	55
Figura 20. Efecto antifungico en cepas de <i>C. albicans</i> tratadas con los EO de los aislados M2AN18-1 Y M3LB50-2.....	56
Figura 21. Efecto antifungico en cepas de <i>C. albicans</i> tratadas con los EO de los aislados M2AN18-1 Y M3LB50-2 combinados.....	57

Índice de cuadros

Tabla 1. Tratamientos para determinar el efecto antimicrobiano de los EO	37
Tabla 2. Tratamientos para determinar citotoxicidad en levaduras	40
Tabla 3. Aislados que inhibieron de 3 a 4 ESKAPEsPS por estría cruzada.....	44
Tabla 4. Aislados que inhibieron de 3 a 4 ESKAPEsPS por el método de Patch-Patch	44
Tabla 5. Características bioquímicas de los aislados bacterianos seleccionados a partir de la prueba Patch-Patch	46
Tabla 6. Antibiograma de los aislados seleccionados por el método Patch-Patch.....	47
Tabla 7. BLASTn más cercano a las secuencias editadas de la secuenciación.....	52
Tabla 8. Resultados de las pruebas bioquímicas complementarias a la identificación molecular	53
Tabla 9. Porcentaje de viabilidad celular de células de <i>S. cerevisiae</i> y número de células contadas después de ser tratadas con los EO de los aislados M2AN18-1 Y M3LB50-2.	55
Tabla 10. Porcentaje de viabilidad celular de células de <i>C. albicans</i> y número de células contadas después de ser tratadas con los EO de los aislados M2AN18-1 Y M3LB50-2.	56
Tabla 11. Porcentaje de viabilidad celular de células de <i>C. albicans</i> y número de células contadas después de ser tratadas con los EO de los aislados M2AN18-1 Y M3LB50-2 en conjunto.....	57

Introducción

Los antimicrobianos son moléculas con la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias, mediante la alteración de rutas metabólicas, modificando procesos celulares importantes como la síntesis de proteínas, la replicación del ADN, detener la división celular o causando la lisis de la célula (Blair et al. 2015). Naturalmente los antibióticos son producidos por algunos organismos y que puede tener antagonismo en el crecimiento de otro. Actualmente estas moléculas son importantes en el tratamiento de infecciones, prevenir infecciones durante el tratamiento con quimioterapia, pacientes inmunosuprimidos o en pacientes postoperatorios y se han utilizado en la industria ganadera como promotores del crecimiento y en la agricultura (Ventola 2015).

Debido al mal manejo que se ha hecho de los antibióticos se ha generado un problema de RA en bacterias, seleccionando las poblaciones con variantes alélicas que dan resistentes a la acción de alguno o varios antibióticos. Este problema es multifactorial y varias acciones antropogénicas agravan el problema, como lo son el uso excesivo de antibióticos, su prescripción sin un diagnóstico adecuado y su implementación sin regulación en la industria ganadera y agrícola, en donde muchas veces son usados cuando no se requieren estos fármacos, debido a que se pueden llegar a usar como un medio preventivo y por lo tanto lo usan cantidades subterapéuticas; todas estas acciones propician la selección y expresión de genes de resistencia a antibióticos (GRA) (Ventola 2015). Actualmente se ha agravado el problema con la situación que se está viviendo en la pandemia por COVID-19, debido a un uso inadecuado de los antibióticos dado que se prescriben a personas hospitalizadas como profiláctico sin alguna evidencia de que este presente una infección bacteriana. Se ha estimado que el 72% de las personas con COVID-19 reciben tratamiento con antibióticos cuando solo el 8% tienen una infección (Livermore 2021).

La base genética de la resistencia a los antibióticos son los GRA, los cuales por mutaciones puntuales y/o elementos móviles se pueden diversificar los mecanismos y propagar esa información genética. Los GRA se pueden propagar horizontalmente por medio de plásmidos, que pueden contener otros elementos móviles acarreadores de estos genes como lo son transposones e integrones y por otro lado están los fagos que pueden transmitir dicha información como consecuencia de su ciclo de replicación; una vez recibida esta información genética se puede integrar en el cromosoma bacteriano y al expresarse brinda resistencia a la bacteria que se encuentra expuesta al antibiótico (Ma, et al., 2016; Zhang, et al., 2018). Las mutaciones en los GRA pueden modificar la diana terapéutica o se modifican los GRA ya existentes mejorando su capacidad para responder contra el antibiótico por diversos mecanismos, por ejemplo prevenir la entrada del antibiótico y expulsarla hacia el espacio extracelular por medio de bombas de eflujo, modificar el antibiótico por acción enzimática ya sea la adición o la eliminación de grupos funcionales o bien la

destrucción de la molécula, así como la capacidad del microorganismo para formar biopelículas que dificultan la permeabilidad del fármaco (Naveed, et al., 2020). Un ejemplo es la transformación genética que ocurre de manera natural en *Streptococcus pneumoniae*, el cual adquiere genes que codifican para proteínas de unión a penicilina (PUP), las cuales se encargan de la síntesis de pared celular y son privadas de su función por la penicilina: por lo que al adquirir nuevas PUP que son menos afines a la penicilina no se afecta la síntesis de pared celular (Naveed, et al., 2020).

La RA es un problema de antaño, de los primeros casos se documentó en 1930 con el uso de sulfamidas para el tratamiento de infecciones por cocos Gram positivos y negativos lo cual llevó a que durante la Segunda Guerra Mundial se aislaron entre militares cepas de *Streptococcus pyogenes* que empezaron a generar resistencia a sulfamidas (Stuart 1982). El centro para el control y prevención de enfermedades ha enlistado bacterias de gran importancia para la salud pública debido a la RA que tienen dichas bacterias en la lista; entre las bacterias que están en la lista encontramos: Enterobacteriaceae carbapenem resistente, Enterococci, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp.* y *E. coli* por mencionar algunas (Ventola 2015). La RA es un problema mundial debido a que facilita el contraer infecciones postoperatorias, complicaciones durante la quimioterapia o en personas inmunodeprimidas, aumento en la mortalidad por infecciones bacterianas y la diseminación de microorganismos patógenos resistentes entre la población y el medio ambiente que la rodea (WHO 2018).

Debido a esta amenaza inminente se debe de actuar para contrarrestar este problema y una de las acciones que se pueden realizar es la búsqueda de nuevos antibióticos contra esas bacterias multirresistentes. En la naturaleza existen un sin fin de moléculas antimicrobianas producidas por bacterias, debido a un proceso de evolución de billones de años que fue diversificando el metabolismo bacteriano para la síntesis de estas moléculas. Por lo que no es descabellado pensar que aquí se puedan encontrar nuevos antibióticos para tratar infecciones bacterianas, por ejemplo, *Salinispora tropica* que vive en el sedimento marino y produce sporolida A y B (Lewis 2013). En los suelos y en cualquier ecosistema los microorganismos producen dosis muy bajas de estos compuestos y tienen un rol en el nicho donde se producen; por ejemplo pueden eliminar bacterias que cohabitan el mismo nicho, ser moléculas señalizadoras, por ejemplo, compitiendo por el sitio alostérico de otros metabolitos o regulando la transcripción, también induciendo la formación de biofilms, estimulantes de la esporulación o también como reguladores de la expresión de genes de virulencia (Sengupta, et al. 2013; Tyc, et al. 2017).

Una forma de encontrar estos antibióticos en bacterias del suelo es gracias a técnicas que se basan en encontrar antagonismos con bacterias que se encuentren estrechamente cercanas en un medio de cultivo líquido o sólido. Estas técnicas fueron desarrolladas en 1940 por Selman Waksman y

gracias a estos métodos se pudo realizar una investigación sistemática sobre actividad antimicrobiana de bacterias del género *Streptomyces* (Durand, et al. 2019). Además, permitió a la industria farmacéutica el inicio del descubrimiento de la gran mayoría de los antibióticos actuales entre 1940 y 1970 dando inicio a la era dorada de los antibióticos, donde se descubrieron más de 20 clases de antibióticos provenientes de hongos y bacterias (Durand, et al. 2019). Por lo que el uso de estas técnicas que son muy económicas para buscar el potencial antimicrobiano y la gran diversidad de bacterias con la capacidad de producir metabolitos en el suelo (los cuales aún no se exploran todos), es la combinación perfecta para encontrar nuevos antibióticos para hacer frente a bacterias patógenas de interés humano.

Es por ello que personas interesadas en esta problemática desarrollaron el “Tiny Earth Studentsourcing Antibiotic Discovery”, donde participan 19 países. El cual es una red liderada por las doctoras Joe Hendelsman y Nichole Broderick de las universidades de Wisconsin y Connecticut respectivamente. El objetivo de esta red es buscar nuevos antibióticos, a partir de bacterias que habitan en el suelo, para mitigar la problemática de bacterias multirresistentes. Una característica de la red es que el trabajo se lleva a cabo por estudiantes guiados por un instructor. Con la idea de impulsar el interés y la responsabilidad del uso de los recursos genéticos, capacitar y motivar a la investigación. En México esta red es implementada por el Dr. Francisco Barona Gómez del Langebio-Irapuato y el Dr. José Antonio Cervantes Chávez de la Universidad Autónoma de Querétaro.

2. Antecedentes

2.1 ¿Qué es un antibiótico?

Se puede considerar como antibiótico a cualquier molécula con la capacidad de tener un efecto antimicrobiano, usualmente hacia bacterias exclusivamente, aunque existen algunos que tienen efecto contra otros microorganismos. Una de las primeras definiciones de los antibióticos fue propuesta por Selman Waksman el descubridor de la estreptomina; definió esta palabra como: “cualquier molécula orgánica capaz de inhibir o matar microbios por medio de la interacción de la molécula con alguna parte de la bacteria” (Davies and Davies 2010). Existen diferentes clases de antibióticos utilizados para el tratamiento de infecciones bacterianas, estas clases se diferencian según la estructura química de la molécula; estas clases serían β -lactámicos, aminoglucósidos, glucopéptidos, tetraciclinas, macrólidos, lincosamidas, estreptograminas, oxazolidinonas, fenólicos, quinolonas, pirimidinas, sulfamidas, rifamicinas, lipopeptidos y péptidos catiónicos (Davies and Davies 2010).

2.2 Historia de los antibióticos

El conocimiento sobre los antibióticos se tiene desde hace mucho tiempo y aunque no se les nombraba como tal se tenía conocimiento de las propiedades antimicrobianas de algunos microorganismos que evitan o disminuyen el crecimiento de bacterias, como lo es el caso del antiguo Egipto donde cultivaban hongos filamentosos para el tratamiento de heridas y quemaduras (Pećanac, et al. 2013). En la edad media algunos curanderos en China y Grecia usaban algunas sustancias mohosas para retrasar el deterioro de alimentos. En el siglo XIX Sir John Scott Burden-Sanderson descubrió que había ausencia de bacterias en un medio líquido cubierto de moho. En 1871 Joseph Lister descubrió que *Penicillium glaucum* inhibe el crecimiento de bacterias y llegó a utilizar los extractos de este hongo para tratar las heridas de una enfermera. Mientras Joseph Lister descubrió lo anteriormente mencionado, Louis Pasteur descubrió y aisló junto con Jules François Joubert en 1877 a *Bacillus anthracis*, proveniente de muestras de orina que se encontraba en conjunto creciendo con bacterias aeróbicas, observaron que se inhibía el crecimiento de *B. anthracis*. Se habían hecho un sin fin de estudios en los cuales se encontraba un antagonismo entre microorganismos, pero ninguna molécula antimicrobiana se había purificado hasta 1909 cuando Paul Ehrlich descubrió la arsfenamina el cual se comercializó en 1911 (Durand, et al., 2019). Uno de los eventos más importantes en la ciencia y la medicina respecto al tratamiento de enfermedades infecciosas fue el descubrimiento accidental de la penicilina por Alexander Fleming, en 1928. Esto ocurrió cuando dejó olvidadas unas colonias de *Staphylococcus aureus* en las cuales había crecido el hongo que más tarde se identificó como *Penicillium notatum* del cual más adelante se purificó un compuesto conocido como penicilina (Fleming 1945).

Los antibióticos se prescribieron por primera vez en 1940 para el tratamiento de enfermedades infecciosas y tuvieron un papel muy importante durante la segunda guerra mundial debido a que permitieron controlar las infecciones bacterianas entre soldados (Ventola 2015).

La historia de los antibióticos se puede dividir en diferentes eras. Una época oscura o era pre antibiótica en la cual apenas se estaban descubriendo las propiedades y describiendo la estructura química de los que serían los antibióticos actuales, culminando esta etapa con el descubrimiento de la penicilina y su comercialización dando inicio a una época dorada, en la cual se fue aumentando en cantidad los antibióticos que se comercializan en el mercado (Davies and Davies 2010).

Selman Waksman descubrió una gran cantidad de antibióticos gracias al desarrollo de aproximaciones basadas en cultivo para encontrar bacterias productoras de antibiótico y permitió a la industria farmacéutica el inicio del descubrimiento de la gran mayoría de los antibióticos actuales entre 1940 y 1970 dando inicio a la era dorada de los antibióticos, donde se descubrieron más de 20 clases de antibióticos provenientes de hongos y bacterias (Durand, et al., 2019). Los últimos antibióticos descubiertos y comercializados fueron en 1980s y a partir de ese momento no se han comercializado muchos de los antibióticos descubiertos. Después de eso la industria tomó un enfoque diferente en el cual en lugar de producir los antibióticos a partir de los microorganismos se inició una síntesis química de nuevas moléculas en base a lo conocido de los mecanismos de acción de la molécula. Con esta técnica se desarrollaron antibióticos como el nitrofurán, quinolonas o las sulfamidas. Después de esto ahora se comenzaron a modificar las moléculas ya conocidas llevando a la comercialización de la daptomicina en el 2001 por ejemplo (Durand, et al. 2019). Desde antes de iniciar una aplicación farmacológica de los antibióticos ya se estaba consciente de que se podía generar una RA bacteriana si constantemente se hacía uso de estos lo cual se fue estudiando más y más conforme se comercializaban más antibióticos y se iban describiendo las bases del fenómeno de la RA (Davies and Davies 2010; Fleming 1945)

2.3 Rol de los antibióticos en la naturaleza y CGB

2.3.1 Función de los antibióticos en la naturaleza

Cuando se habla de antibióticos es usual que lo primero que se piense es en el tratamiento o control de infecciones bacterianas, pero los antibióticos en la naturaleza no siempre tienen una función como inhibidor del crecimiento de bacterias u otros microorganismos. En vida libre los microorganismos que producen dichos compuestos los sintetizan en dosis muy bajas y no solo producen antibióticos sino muchos otros compuestos, las cuales forman parte del parvoma; una gran diversidad de metabolitos secundarios de bajo peso molecular que tienen un rol en el nicho donde se producen. En la naturaleza los antibióticos sirven para eliminar a bacterias que cohabitan el

mismo nicho, también como moléculas señalizadoras por ejemplo compitiendo por el sitio alostérico de otros metabolitos o regulando la transcripción, también induciendo la formación de biofilms, estimulantes de la esporulación o también como reguladores de la expresión de genes de virulencia (Sengupta, et al. 2013; Tyc, et al. 2017).

2.3.2 Clusters de genes biosintéticos

Los genes responsables de la síntesis de antibióticos son los CGB (clusters de genes biosintéticos), que además de regular la síntesis de antibióticos también regula la producción de una gran diversidad de metabolitos secundarios, que son compuestos derivados del metabolismo primario. Estos genes consisten de genes que regulan la síntesis, elementos regulatorios, factores de transcripción y promotores, e incluso GRA que previenen la autodestrucción de la bacteria productora (Tran, et al. 2019). La diversidad de los CGB viene de una transferencia horizontal de genes, mutaciones puntuales, duplicación de genes o deleciones de genes que dan diversidad enzimática para unirse a nuevos sustratos y así crear nuevas moléculas (Durão, et al. 2018). Los productores de metabolitos con actividad antimicrobiana son tan antiguos como lo son los GRA, por lo que el conocer de cuando datan los CGB ayuda a inferir de cuando data el origen de los GRA (Perry, et al. 2016).

Aunque la producción de metabolitos secundarios depende de los genes, también influye la fase en la cual se encuentre el crecimiento bacteriano ya que estos metabolitos suelen producirse durante la fase estacionaria; también influye la abundancia de nutrientes, temperatura, pH, humedad, presencia de luz, ausencia de fuentes de carbono, nitrógeno, fosfatos u otros elementos traza (Sengupta, et al. 2013; Tyc, et al. 2017).

2.3.3 Ejemplo de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana

Estos metabolitos secundarios pueden ser compuestos volátiles o moléculas solubles que pueden abarcar un amplio espectro de polaridades, de las cuales algunas pueden ser hidrofílicas y algunas otras hidrofóbicas o pueden tener ambos motivos en su molécula (Hernandez, Simon et al. 2019). Muchos de los metabolitos secundarios son sintetizados a partir de moléculas previas que se encuentran en la célula. Como ejemplo de moléculas antibióticas que se han encontrado en bacterias del suelo están los policétidos, los cuales son subunidades de acetilo y una similitud en la síntesis de ácidos grasos. Otros ejemplos de antibióticos son la eritromicina. También se pueden encontrar híbridos entre policétidos y péptidos no ribosomales, como ejemplo de estos está la rapamicina. Otros compuestos son los terpenos que son sintetizados a partir de unidades de dimetilalil pirofosfato e isopentenil pirofosfato provenientes de la vía del mevalonato, como ejemplo

de éstos está la albaflavenona producida por *Streptomyces albidoflavus*. Por otro lado también están las Pirazinas los cuales son compuestos volátiles de 1,4-diabencenos. Otro tipo de compuestos son los péptidos no ribosomales entre los que se encuentran todos los aminoglucósidos (Tyc, et al. 2017).

2.4 Resistencia a antibióticos

2.4.1 ¿Qué es un gen de resistencia?

La resistencia a los antibióticos es cuando una bacteria es capaz de crecer en presencia del antibiótico que mata a la población sensible. Esta es una cualidad que se encuentra ampliamente distribuida entre muchos microorganismos además de las bacterias, como lo pueden ser hongos filamentosos y levaduras. Esta resistencia a antibióticos tiene una base genética y existen una gran diversidad de GRA con una gran diversidad de métodos de transmisión que ha permitido su intercambio entre bacterias por millones de años diversificando los mecanismos de RA (Blair, et al. 2015; Davies and Davies 2010). Los GRA tienen una función codificando proteínas que ayudan a mitigar el efecto de los antibióticos producidos por bacterias del nicho para acaparar recursos, hasta para inhibir el efecto del antibiótico producido por la propia bacteria para evitar su muerte. Un ejemplo de esto son las bacterias *Streptomyces* que producen una gran cantidad de β -lactamasas para los antibióticos que la misma bacteria produce (Davies and Davies 2010).

2.4.2 Base genética de la resistencia

Los mecanismos de RA tienen una base genética para su diversificación, la cual es la mutación en genes de resistencia y en las dianas terapéuticas y/o la transmisión de esta nueva información por medio de plásmidos, transposones, integrones o por fagos. Los GRA pueden codificar para una gran diversidad de mecanismos celulares como son, bombas de eflujo para regresar al espacio extracelular el antibiótico, porinas nuevas que limitan el paso del antibiótico, enzimas que modifican las dianas terapéuticas, enzimas que modifican el antibiótico destruyéndolo o por la transferencia de grupos químicos para su inactivación (Figura 1) (Blair et al. 2015).

Los GRA se propagan de manera vertical y horizontalmente por elementos genéticos móviles; los cuales pueden ser plásmidos, transposones, integrones y fagos. Los plásmidos son secuencias de ADN circular que pueden contener a cualquiera de los demás elementos móviles que acarrean GRA, transfiriéndose horizontalmente entre bacterias por medio del pili. Uno de esos elementos móviles son los transposones, los cuales son elementos genéticos que pueden moverse de una molécula de ADN a otra por medio de una enzima llamada transposasa. Los transposones se pueden dividir en

dos clases, una de ellas los de clase II que son de ADN y son los acarreadores de GRA. Por ejemplo existe un transposón llamado Tn10 el cual contiene el gen *tetA* que codifica para una bomba de eflujo en *Shigella flexneri*, otorgándole resistencia a tetraciclina (Babakhani and Oloomi 2018). Los integrones pueden adquirir casetes de genes, los cuales pueden contener varios GRA y genes de virulencia, movilizándose entre el genoma y los plásmidos de las bacterias para propagarse (Akrami, et al. 2019; Zhang 2017)

Los integrones que poseen GRA son los de clase I que suelen tener casetes de genes que codifican para dihydroflavonol-4-reductasa, β -lactamasas de amplio espectro y enzimas modificadoras de aminoglucósidos; estos integrones se han encontrado *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Campylobacter*, *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* y *Salmonella*. Los de clase II para resistencia a aminoglucósidos adeniltransferasa (*Dfr1*, *sul1*, *aadA1*) y se encuentran usualmente en *E. coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Salmonella enterica* y *Burkholderia*. Los de clase III para resistencia a sulfamidas, metalo- β -lactamasas y β -lactamasas de amplio espectro y se han encontrado en *E. coli*, *Acinetobacter* spp., *Salmonella* spp., *Citrobacter freundii*, *Alcaligenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida* y *Serratia marcescens*. Por último los integrones de clase IV que se han encontrado en bacterias *Vibrionaceae*, *Shewanella*, *Xanthomonas* y otras bacterias marinas del grupo proteobacteria y suelen otorgar resistencia a fosfomicina y cloranfenicol (Akrami, et al. 2019).

Otra forma de propagación de GRA es por medio del ciclo lítico de un fago, una transducción generalizada y/o una transducción especializada. En el caso del ciclo líticos, el fago integra su material genético en el genoma de la bacteria replicando así su material genético cuando se replica el genoma de la bacteria y por medio de una terminasa que reconoce motivos *pac* o *cos* los cuales son motivos que marcan el inicio del empaquetamiento y separación del genoma del fago, que involucra la secuencia *pac* corta fragmentos del genoma de la bacteria donde pueden contener GRA junto con el ADN viral. Durante una transducción generalizada se empaqueta fragmentos de ADN genómico o de plásmido proveniente de la bacteria dentro del fago de manera aleatoria cuando el material genético de la bacteria está fragmentado. Dicho material se transfiere a otra bacteria mediado por un fago que porta este material genético. Por otro lado la transducción lateral o especializada recientemente descrita, ocurre cuando el profago sigue unido al cromosoma bacteriano y el empaquetamiento inicia desde el sitio *pac* primero que en los sitios pseudo-*pac* como en la transducción generalizada, empaquetando parte del genoma del fago con material genético adyacente (Chiang, et al. 2019).

2.4.3 Mecanismos de RA

Uno de los diversos mecanismos codificados por GRA son las bombas de eflujo, las cuales son complejos que pueden ser multiproteicos y se encuentran anclados a las membranas y/o la pared celular de las bacterias. Existen seis familias actualmente de bombas de eflujo las cuales son: las bombas ABC que utilizan ATP para poder mover los antibióticos y las otras cinco familias son transportadores activos que dependen de energía electroquímica para poder mover los antibióticos. Estas últimas serían la familia mayor de facilitadores (MFS), extrusión de toxinas y múltiples drogas (MATE), resistencia de pequeñas múltiples drogas (SMR), división de resistencia-nodulación-celular (RND) y las eflujo de compuestos antimicrobianos de proteobacterias (PACE). Las familias de bombas de eflujo aunque tienen un mecanismo de funcionamiento distinto, todas tienen la misma función de evitar que los antibióticos lleguen a su diana terapéutica dentro de la bacteria expulsándolo de regreso al espacio extracelular cuando el antibiótico logra entrar (Du, et al. 2018).

Un ejemplo de enzimas que modifican al antibiótico son las β -lactamasas, las cuales son enzimas que hidrolizan el anillo β -lactámico de algunos antibióticos que lo poseen, provocando que la molécula ya no sea funcional ni se una a su diana terapéutica para llevar a cabo su acción. Las β -lactamasas se pueden clasificar en 4 clases, la C que se encuentran en plásmidos y el cromosoma de Gram negativas, la A que son penicilinasas, las β -lactamasas de amplio espectro, enzimas hidrolíticas de carbenicilina, cloxacilina, cefalosporinasas y carbapenemasas inhibidas por ácido clavulánico, la clase B que son metaloenzimas y la D donde están las enzimas que no encajan en ninguno de los grupos (Ghafourian Sobhan, et al. 2015).

Estos mecanismos de RA mencionados anteriormente pueden ser específicos para clases de antibiótico en específico. Por ejemplo, en el caso de las quinolonas dirigidas a la topoisomerasa, el mecanismo de resistencia involucra genes relacionados a dicho proceso o dicha diana terapéutica, como lo es mutaciones en *gyrA* que es una girasa que al ser alterada ya no se une el antibiótico. En ocasiones hay mecanismos más generales útiles para diversos antibióticos como bombas de eflujo (Sultan et al. 2018).

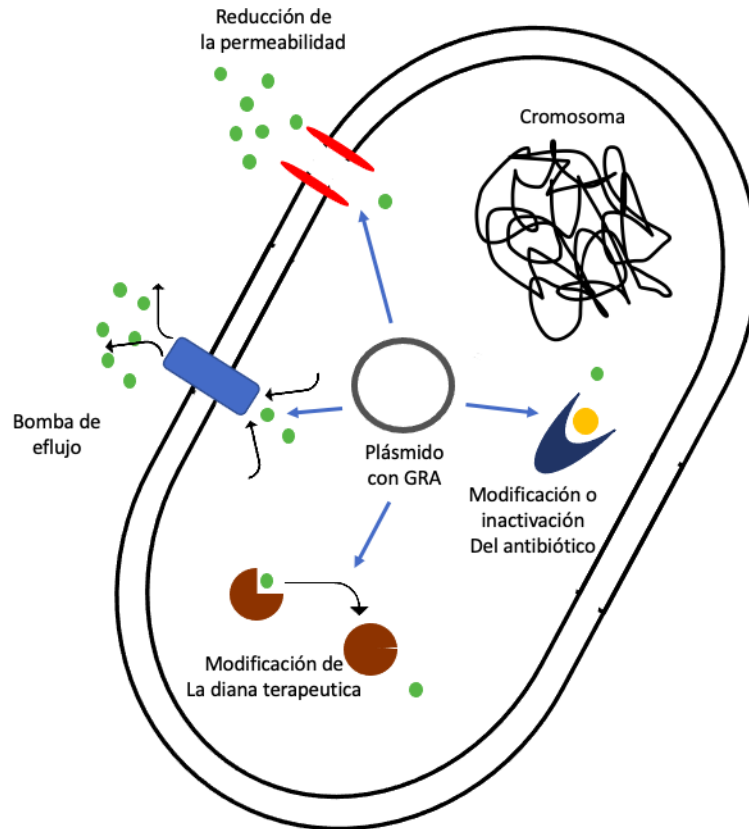


Figura 1. Mecanismos de Resistencia a antibióticos. se muestran la resistencia a antibióticos mediada por reducción en la permeabilidad, presencia de bombas de eflujo, modificación de la diana terapéutica y la modificación de la molécula antibiótica.

2.4.4 Aspectos evolutivos de la RA

La RA es un mecanismo que emerge por mutaciones y se disemina y se mantiene entre las poblaciones dependiendo de el fitness de las bacterias que poseen la RA, el nivel de resistencia, las presiones de selección ejercida por el medio ambiente y todas las interacciones entre las bacterias del nicho que determinará que mutaciones prevalecerán en los GRA. Además de otros factores más inherentes al contexto genético como lo es las interacciones epistáticas que pueden compensar el costo que tiene algún GRA sobre el fitness, la coselección de GRA que se heredan, aunque no se utilicen porque las condiciones del medio no requieren su expresión, pero se heredan por permanecer cerca de genes que si se expresan (por ejemplo, múltiples GRA en un plásmido) (Hughes and Andersson 2017). La tasa a la cual se originan bacterias con RA depende de la tasa en la cual se originan mutaciones de novó y a la cual se da una transferencia horizontal de genes o elementos genéticos móviles. Las mutaciones adaptativas que en ocasiones potencian mutaciones relacionadas a la resistencia ocurren con una frecuencia de 10^{-5} por célula por generación mientras que mutaciones que llevan a un reordenamiento del genoma como lo pueden ser deleciones,

inserciones, duplicaciones e inversiones que ocurren a 0^{-3} hasta 10^{-5} por célula por generación lo cual acelera la adquisición de GRA (Durão et al. 2018; Hughes and Andersson 2017).

Los GRA al originarse desde hace millones de años se encuentran ampliamente distribuidos por todo el mundo y no es algo exclusivamente de bacterias patógenas sino que también está presente en bacterias de vida libre. Un ejemplo de esto son los genes que codifican para β -lactamasas, la CTX-M que es una β -lactamasa de amplio espectro que se encontró en la bacteria *Kluyvera* y posteriormente ese gen se encontró en cepas clínicas desde 1990 (Davies and Davies 2010). La capacidad del hielo de poder preservar el ADN íntegro nos ha permitido extraer secuencias de ADN antiguas, como lo son GRA provenientes de bacterias congeladas, por ejemplo, el gen *bla* para resistencia a β -lactámicos, *Erm* que codifica para una metiltransferasa de ribosoma, *vanX* para resistencia a vancomicina y *tetM* para resistencia a tetraciclina, a partir de núcleos de hielo provenientes de Bear Creek, Yukon Canadá. De estas secuencias de *van* aisladas, el gen *vanA* aislado al determinar la estructura cuaternaria y terciaria de la proteína que codifica tenían una gran similitud a la estructura de la proteína codificada por *vanA* en *Enterococcus faecium* actual (D'Costa, et al. 2011). Incluso se han encontrado GRA que datan de hace 4 millones de años, como el caso del gen *mph* para resistencia a macrólidos en *Streptomyces sp.* o el *cat* para resistencia a fenólicos en *Agrobacterium tumefaciens* (Olaitan and Rolain 2016). Incluso desde antes de que se empezaran a comercializar antibióticos se han encontrado GR desde la era común de 950-1200 EC, por ejemplo, β -lactamasas y el gen *ble* para resistencia a β -lactámicos en *Porphyromonas gingivalis* o los genes *pbpA* y *tetR* para tetraciclinas en *Leptotrichia buccalis* (Olaitan and Rolain 2016).

2.4.5 El problema de la RA

Actualmente la evolución de la RA sigue presente pero ahora se ha alterado su curso en especial en bacterias patógenas para humanos. Cuando Fleming recibió el premio Nobel y escribió en su discurso en 1945 sobre algo que él sabía que sucedería y muchos no contemplaron al momento de comercializar y usar los antibióticos de manera desmedida; citando sus palabras él escribió: “no es difícil hacer que los microbios se hagan resistentes a la penicilina en el laboratorio al exponerlas a concentraciones insuficientes para matarlas, y lo mismo en nuestros cuerpos. Viene el tiempo en el cual la penicilina pueda ser comprada por cualquiera en las tiendas. Luego existe el peligro de que el hombre ignorante pueda fácilmente tomar una dosis insuficiente y al exponer sus microbios a cantidades no letales de la droga, los haga resistentes” (Fleming 1945).

Actualmente hay un nuevo factor que interviene en la evolución de los GRA ejerciendo presiones de selección, este es el humano el cual por medio de sus acciones promueve la selección y la diseminación de los GRA. Las principales acciones realizadas por los humanos que promueven la

RA son el uso excesivo de los antibióticos, prescripción del antibiótico inadecuado, tomar tratamientos incompletos, un uso extensivo en la agricultura y mal manejo de los desechos que contienen antibióticos (Ventola 2015.). La presencia de bacterias RA se fue observando a medida que se iban comercializando nuevos antibióticos, por ejemplo la vancomicina que se introdujo para su uso clínico en 1972 para tratar *S. aureus* y estafilococos coagulasa negativos pero en 1979 se empezaron a reportar casos de resistencia a vancomicina en estafilococos coagulasa negativos. Y así hay una diversidad de casos, otro ejemplo en la introducción de la tetraciclina en 1950 y se reporta en 1959 una cepa de *Shigella* resistente a este medicamento o aún más resistente en el 2010 se introduce la ceftarolina y en el 2011 se reportó un *Staphylococcus* resistente a este medicamento (Ventola 2015).

Al ser un problema mundial la RA, México también se ha visto afectado. Se han aislado *S. aureus* y *Staphylococcus* coagulasa negativa en muestras clínicas de heridas quirúrgicas, secreciones bronquiales, hemocultivos, puntas de catéter y cultivos óseos, de las cuales se aislaron 9 cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina y a cefoxitina (García, et al. 2019). En niños menores de 18 años del hospital de especialidades pediátricas en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas se aislaron bacterias causantes de faringitis, infecciones en tejidos blandos y piel, fascitis necrotizante y causantes de síndrome de shock tóxico. Se aislaron cepas de *Streptococcus agalactiae* resistentes a tetraciclina y cepas de *S. dysgalactiae* subsp. *Equismilis*, y *constellatus* subsp. *Pharyngis* resistentes a eritromicina (Gutiérrez-Jiménez, et al. 2018). De igual manera se han aislado cepas de *S. aureus* presente en muestras de infecciones en heridas quirúrgicas, aspirados traqueales, exudados nasales, catéteres, piel y tejidos blandos en el hospital central “Dr. Ignacio Morones Prieto” en San Luis Potosí, México. De las cepas aisladas 17 de 68 eran meticilina resistentes (Martínez-Medina, et al. 2020). En hemocultivos de pacientes del Instituto Nacional de Cancerología se aislaron 43 cepas de *P. aereginosa* multidrogoresistente y 23 de *A. baumannii* (Velázquez-Acosta, et al. 2018).

El problema de la RA no sólo está presente en hospitales, sino que también está presente en el ambiente, por ejemplo, se han encontrado cepas de *Salmonella* recuperadas de los ríos Humaya, Tamazula y Culiacán en el valle de Culiacán en el noroeste de México, el 50.5% de las cepas aisladas tenían resistencia a algún antibiótico; con un principal fenotipo de resistencia a ampicilina, neomicina, cloranfenicol y ceftazidima. Incluso hubo una cepa no tifoidea con resistencia a diversos antibióticos, esta fue la cepa Oranienburg la cual tenía resistencia a ampicilina, ceftazidima, amoxicilina-ácido clavulánico, cloranfenicol, neomicina, estreptomina, tetraciclina, sulfonamidas y ácido nalidixico (Castañeda-Ruelas and Jiménez-Edeza 2018). En 12 municipios de Sinaloa en un periodo de enero a diciembre del 2015 se recolectaron un total de 472 muestras de canales de irrigación, agua de río, presas y diques identificándose cepas de *E. coli* diarreogénica, enteropatogénica, enteroagregativa, enterotoxigénica, enteroinvasiva y adherente difusa con

resistencia a más de un solo antibióticos como lo son la tetraciclina, ampicilina o ceftriaxona y el 12.5% de las cepas diarreogénicas tienen resistencia hasta a 5 antibióticos (Canizalez-Roman, et al. 2019). La presencia de diversas cepas en el ambiente con resistencia a múltiples antibióticos son una potencial fuente de infecciones, difíciles de tratar y sirviendo como reservorios (Canizalez-Roman, et al. 2019; Castañeda-Ruelas and Jiménez-Edeza 2018).

Al reducir la efectividad de los antimicrobianos actuales nos encontramos con un problema que repercute no solamente en el tratamiento de enfermedades infecciosas si no en el tratamiento de cirugías mayores, pacientes en quimioterapia y mayor mortalidad en pacientes en cuidados intensivos para prevenir infecciones bacterianas. Esto es un problema que ya se manifiesta desde ahora por infecciones bacterianas que se trataban sin problema con antibióticos ahora son resistentes a los tratamientos (Isaías-Camacho, et al. 2018), observado inicialmente en hospitales, dada la prescripción de antibióticos Actualmente las actividades humanas también están impactando al medio ambiente por medio de la dispersión de antibióticos que llevan a la selección de GRA en las bacterias del ambiente, por ejemplo en muestras de sedimentos marinos que están fuertemente influenciados por actividades humanas (Tan, et al. 2009).

2.5 ¿Cómo mitigar el problema de la RA?

2.5.1 Alternativas a los antibióticos

Existen una gran cantidad de alternativas a los antibióticos entre ellas están el uso de nanopartículas que tienen propiedades antimicrobianas. Ejemplo de esto son los óxido metálicos, nanopartículas de oro y/o plata, metales combinados como Cu/Zn; todas estas suelen tener un efecto en las bacterias causando un estrés oxidativo, inhibición enzimática y/o inactivación de proteínas (Baptista, et al. 2018). Otra alternativa enfocada más al uso de microorganismos es el uso de fagos o de sus proteínas líticas para destruir la pared celular de las bacterias como lo son endopeptidasas, amidasas o glicosidasas (Rodríguez-Rubio, et al. 2015). También está la alternativa de usar los fagos directamente para el control de la infección. Por ejemplo, esto se ha realizado preparando un cóctel de bacteriofagos proveniente del centro de investigación médica naval en Estados Unidos, para tratar a un paciente con *A. baumannii* multidrogoresistente (Schooley, et al. 2017). Otra alternativa para mitigar esta RA es el uso de otras moléculas en conjunto con el antibiótico para potenciar su efecto o inhibir el mecanismo de resistencia que evita que la molécula llegue a su diana terapéutica, a esto se le llama antibiótico adyuvante. Un ejemplo de antibiótico adyuvante es el ácido clavulánico con amoxicilina, en donde el adyuvante del antibiótico es el ácido clavulánico el cual bloquea el sitio alostérico de la β -lactamasa permanentemente para evitar que la enzima degrade a la amoxicilina (Cole 1982). Otra alternativa al problema y que está muy enfocada en la prevención

es el uso de probióticos. Por ejemplo el uso como probiótico de bacterias del género *Bacillus* en animales para prevenir y/o controlar infecciones bacterianas reduciendo así el consumo de antibióticos en la industria de la crianza de animales (Mingmongkolchai and Panbangred 2018). Además de que actualmente se ha optado por un diseño más racional de antibióticos apoyándose de otras tecnologías para su desarrollo. Por ejemplo el uso de la dinámica molecular para conocer la interacción que hay entre el antibiótico y su diana terapéutica y conocer los efectos que tienen las mutaciones en esta última o que pasaría si se cambia la estructura química del antibiótico para desarrollar el antibiótico más óptimo (Pavlova, et al. 2017)

Actualmente otra alternativa para mitigar el problema está basado en métodos desarrollados en 1940 por Selman Waksman, los cuales permiten encontrar antibióticos de bacterias provenientes del suelo por medio de cultivos. Estas técnicas se basan en encontrar antagonismos con bacterias que se encuentren estrechamente cercanas en un medio de cultivo líquido o sólido; a estas técnicas se les llama método waksman o plataforma waksman. Con estos métodos se realizó una investigación sistemática sobre actividad antimicrobiana de bacterias del género *Streptomyces* (Durand, et al. 2019).

2.5.2 Aproximaciones basadas en cultivo para buscar BPA

Los métodos basados en cultivos representan una ventaja, debido a que son baratos permitiendo encontrar un gran número de BPAs con muy pocos recursos. Uno de los métodos realizados en medio sólido es el método de estría cruzada en el cual se inocular la bacteria que se busca si tienen un efecto antimicrobiano de manera vertical y la bacteria indicadora o la que se busca ser inhibida se siembra horizontalmente a la bacteria que se busca si tiene un efecto antimicrobiano. Este método su única desventaja es que las bacterias utilizadas deben tener las mismas condiciones de cultivo y poder crecer igual bajo esas condiciones (atmósfera, temperatura y tiempo de crecimiento) (Durand, et al. 2019). Otro método es el “spot-on-the-lawn” por su nombre en inglés, el cual consiste en realizar un estriado en césped de la bacteria que se busca inhibir y posteriormente sobre esta se deposita una gota de la bacteria que se desea probar su efecto antimicrobiano, observándose un halo de inhibición alrededor de la gota depositada en la caja (Durand, et al. 2019; Williston, et al. 1947). Otro método es la difusión en caja el cual consiste en sembrar la cepa a la que se busca su efecto antimicrobiano y se incuba el tiempo suficiente en el cual produzca las sustancias antimicrobianas, posteriormente se retira una porción de agar y se coloca en la caja de la bacteria que se busca inhibir. Una variante de este método es colocar un cultivo líquido de la bacteria a probar en un orificio hecho en la caja de agar con la bacteria a inhibir sembrada previamente en césped (Durand, et al. 2019).

Un método basado en cultivos líquidos consiste, en un cocultivo en el cual se incuban dos bacterias en un mismo medio de cultivo pero separadas por una membrana que permita el paso libre de los metabolitos pero no de las bacterias; para posteriormente tomar una porción de la cepa que se busca inhibir para hacer una lectura por densidad óptica o diluciones y sembrar para hacer un conteo de colonias (Waksman 1945). Una variante de este método es agregar el sobrenadante filtrado y concentrado de la bacteria que se busca su efecto antimicrobiano a un cultivo líquido de la bacteria que se busca inhibir (Durand, et al. 2019).

2.5.3 Iniciativas creadas en respuesta para la RA

Para conocer el alcance del problema que representa la RA se han creado iniciativas que buscan conocer la evolución de la problemática en México, como lo es el “Programa Universitario de Investigación en Salud, PUIS” de la Universidad Nacional Autónoma de México; el cual creó un programa llamado “Plan Universitario de control de la Resistencia Antimicrobiana” o PUCRA. En un estudio en el cual se recolectó información sobre patrones de RA de microorganismos aislados de hemocultivos y urocultivos del 2016 al 2017, se encontró la presencia de bacterias ESKAPE de las cuales *E. coli* y *K. pneumoniae* tuvo una resistencia mayor al 30%, *P. aeruginosa* y *A. baumannii* de 80 a 100% y *S. aureus* de hasta el 60% (Miranda-Navales, et al. 2019). En un estudio retrospectivo donde se incluyeron a 47 centros de salud en 20 estados del país se encontraron 22,943 cepas con resistencia a algún antibiótico, en las cuales se encontraban *E. coli*, *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *S. aureus* y *Enterococcus* sp., en muestras clínicas de orina, muestras de tracto respiratorio, sangre, líquido cefalorraquídeo y heces. *E. coli* mostró una resistencia de 3% a carbapenémicos, 50% para cefalosporinas de tercera y cuarta generación y un 60% para sulfametoxazol. Mientras que *Klebsiella* sp., la resistencia a carbapenémicos fue de 12.5% en muestras respiratorias. En *P. aeruginosa* se detectó un 40% de resistencia a carbapenémicos y del 19.1% para piperacilina-tazobactam. En *A. baumannii* se encontró resistencia de más del 50% a cefepime, ciprofloxacina, meropenem y piperacilina-tazobactam. Las cepas con una mayor tasa de multiresistencia fueron *A. baumannii*, *klebsiella* sp. y *E. coli* (Garza-González et al. 2019).

Como se mencionó anteriormente, hay varias maneras de mitigar este problema de manera directa contra los microorganismos, pero existen otras formas a modo de prevención entre las que se encuentran una gestión de la administración de agentes antimicrobianos haciendo diagnóstico microbiológico, evitar su uso excesivo, prevenir la contracción de infecciones (lavado de manos, buena alimentación para mantener el sistema inmune funcional, etc.) y reducir la contaminación ambiental (Isaías-Camacho et al. 2018). En México se ha tomado acción por parte del gobierno con la creación del acuerdo para la Estrategia Nacional de Acción Contra la Resistencia a los

Antimicrobianos, el cual tiene como objetivo la concientización de la problemática, realizar vigilancia epidemiológica, implementación de medidas preventivas de infecciones, uso racional de antibióticos y el desarrollo de alternativas (desarrollar nuevos medicamentos y vacunas) (Diario oficial de la federación 2018). Incluso hay instancias que se dedican a conocer más al respecto como lo es la Unidad Integral de Servicios, Diagnóstico y Constatación que es un centro de referencia para la RA. Aún existe el problema de que a pesar de estas medidas puede ocurrir que haya infecciones por bacterias con RA a los ya conocidos por lo que otra forma de mitigar el problema y prevenirse es la búsqueda de nuevos antibióticos.

Naturalmente en el suelo hay una gran diversidad y riqueza de bacterias, donde algunas presentan cierto antagonismo contra otras por medio de secreción de metabolitos, afectando el crecimiento de otras bacterias. Hasta el momento no se han explorado todos los suelos en la búsqueda de la diversidad de bacterias, especialmente dirigido a encontrar a aquellas que producen antibióticos. Una de las soluciones a la falta de antibióticos es buscar bacterias que se encuentran en suelos aun no explorados, permitiendo generar futuras estrategias de control de bacterias multirresistentes a los antibióticos conocidos hoy en día. Es por ello que personas interesadas en esta problemática desarrollaron el "Tiny Earth Studentsourcing Antibiotic Discovery", donde participan 19 países. El cual es una red liderada por las doctoras Joe Hendelsman y Nichole Broderick de las universidades de Wisconsin y Connecticut respectivamente. El objetivo de esta red es buscar nuevos antibióticos en el suelo, para mitigar la problemática de bacterias multirresistentes. Una característica de la red es que el trabajo se lleva a cabo por estudiantes guiados por un instructor. Con la idea de impulsar el interés y la responsabilidad del uso de los recursos genéticos, capacitarlo y motivarlo a la investigación. En México esta red es implementada por el Dr. Francisco Barona Gómez del Langebio-Irapuato y el Dr. José Antonio Cervantes Chávez de la Universidad Autónoma de Querétaro.

En el presente trabajo se pretende apoyar a dicha iniciativa para mitigar la problemática de la RA. Esto se realizó por medio de aproximaciones basadas en cultivos para encontrar BPA además de hacer una caracterización bioquímica y molecular de los aislados más prometedores, obtención de extractos orgánicos (EO) de las bacterias seleccionadas para obtener sus moléculas antimicrobianas y estudiar sus propiedades antimicrobianas; para así sentar las bases de más proyectos relacionados a este, en búsqueda de un nuevo antibiótico.

3. Justificación

Las bacterias resistentes a antibióticos son de gran relevancia mundial, por la presencia de multirresistencia. En el 2019 el Center for Disease Control and Prevention, de los Estados Unidos de Norteamérica (CDC) actualizó la lista de microorganismo con resistencia a antibióticos que es de urgencia encontrar una solución. Estos son: *Enterobacter* carbapenem resistente, *Enterococci*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* y *E. coli* por mencionar algunos (CDC, 2019). El grupo de bacterias denominadas ESKAPE, que por sus siglas son: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp.*, son aquellas que suponen el reto más importante a vencer, por las infecciones que ocasionan y la multirresistencia que presentan. Para realizar el trabajo de manera segura se utilizan los ESKAPEsPS, los cuales son: *Enterococcus raffinosus*, *Staphylococcus epidermidis*, *E. coli*, *Acinetobacter baylyi*, *Pseudomonas putida* y *Enterobacter aerogenes*. Con esta colección de bacterias es posible buscar bacterias productoras de antibióticos que inhiban su crecimiento sin correr riesgos por parte del investigador (Hernández, et al. 2019).

Algo que agrava el problema es que actualmente ya no se han descubierto antibióticos y mucho menos llevados a fases clínicas II, III y IV para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Las grandes compañías farmacéuticas actualmente están más enfocadas en el desarrollo de medicamentos que requieren su uso constante por largos periodos en comparación del tratamiento para enfermedades infecciosas en los cuales se toman por un periodo corto de tiempo que va de 1 a 2 semanas. Esta preferencia al tratamiento de enfermedades crónicas se ve reflejado también en las pruebas clínicas que se realizan para aprobar un fármaco para su comercialización; en marzo del 2015 solamente 28 antibióticos se probaron en pruebas clínicas II y III comparado con 504 fármacos para tratamiento de cáncer. Esto no implica que haya un abandono en el tratamiento de enfermedades infecciosas muestra de ello es la inversión en vacunas, pero si hay una preferencia por la inversión en fármacos que implican tomarse de una manera constante. Aproximadamente 20 compañías farmacéuticas realizan investigaciones para el desarrollo de antibióticos en 1980s pero ahora solamente 5 se encuentran activas realizando investigación en este campo; las cuales son Novartis, GSK, Roche, Sanofi y Merck (Blaskovich, et al. 2017).

En la naturaleza existen un sin fin de moléculas antimicrobianas producidas por bacterias gracias a un proceso de evolución de billones de años, por lo que no es descabellado pensar que en el suelo se puedan encontrar nuevos antibióticos para combatir infecciones bacterianas. Existen varios ejemplos de compuestos descubiertos por serendipia de toda esta diversidad de microorganismos; por ejemplo el productor de antibióticos *Penicillium rubens* descubierto por una espora que llegó a una caja de petri parcialmente abierta, bacterias del mar como lo es *Salinispora tropica* que vive en

el sedimento marino y produce sporolida A y B, bacterias que tienen CGB silenciados como lo es el caso de *Streptomyces coelicolor* que produce hasta 20 metabolitos secundarios o esos organismos no cultivables que puede producir compuestos antimicrobianos (Lewis 2013). Los suelos de la milpa son muy diversos en cuanto a phyla bacterianos debido a que se encuentran proteobacterias, acidobacterias, actinobacterias, bacteroidetes, chloroflexi, planctomycetes, gemmatimonadetes, verrucomicrobia, nitrospirae, cyanobacteria, firmicutes, acidobacteria y armatimonadetes por mencionar algunos (Aguirre-von-Wobeser, et al. 2018; Romero-Salas, et al. 2021). Entre toda esa diversidad bacteriana se han encontrado bacterias con la capacidad de inhibir bacterias patógenas para plantas que se cultivan en la milpa como lo es el maíz; por ejemplo algunas de estas bacterias encontradas son *Paenibacillus polymyxa* NMA1017 y *Burkholderia cenocepacia* CACua-24 y *Amycolatopsis* BX17 (Cabrera, et al. 2020; Chávez-Ramírez, et al. 2020). Es por ello importante y factible explorar e identificar especies bacterianas que aún no han sido analizadas en todo en México, para poder encontrar BPA que potencialmente sus antibióticos puedan utilizarse para el tratamiento de infecciones bacterianas en humanos.

4. Hipótesis

En las tierras de cultivo en el municipio de Pinal de Amoles en Querétaro existen bacterias con la capacidad de producir antibióticos contra las bacterias ESKAPE/parientes seguros.

5. Objetivos

5.1 Objetivo General

Aislar y caracterizar a partir de muestras de suelo de cultivo provenientes de la milpa bacterias productoras de antibiótico con capacidad de antagonizar bacterias ESKAPE parientes seguros.

5.2 Objetivos Particulares

- 1.- Aislar las bacterias presentes en las muestras de suelo de cultivo proveniente de la milpa.
- 2.- Identificar las bacterias que tienen acción antagónica en el crecimiento de las bacterias ESKAPEsPS.
- 3.- Conformar un cepario de las bacterias con actividad antimicrobiana.
- 4.- Extraer el antibiótico de las bacterias que inhiben a un mayor número de ESKAPEsPS y probar su efecto en el crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.
- 5.- Identificar a nivel molecular y bioquímico, perfil de resistencia a antibióticos a las bacterias productoras de antibiótico que inhiben a un mayor número de ESKAPEsPS.
- 6.- Determinar el efecto tóxico de los antibióticos obtenidos en un modelo eucariota (levaduras).

6. Materiales y Métodos

Resumen de la metodología

Se hizo una recolección de muestras del suelo. Se tomó una porción de la muestra, se diluyó en agua y se sembró en medios sólidos para obtener colonias aisladas que se recuperaron y se sembraron para ser utilizadas en los siguientes experimentos. Todas las colonias obtenidas se crecieron junto con ESKAPEsPS por el método de estría cruzada para encontrar cuales potencialmente producen antibióticos. Se seleccionaron las cepas que inhibieron un mayor número de ESKAPEsPS y se sembraron para obtener colonias aisladas. Se seleccionan dos colonias de cada cepa, a las cuales se les hicieron pruebas bioquímicas y se probó su actividad antimicrobiana por el método Patch-Patch. Las cepas que inhibieron un mayor número de ESKAPEsPS por el método anterior, se les obtuvo un extracto orgánico (EO) con solventes para probar sus efectos antimicrobianos. Se amplificó un fragmento del gen 16S, se secuenció y se identificó la identidad de las bacterias, posteriormente se realizaron pruebas bioquímicas complementarias a la identificación de las cepas. Finalmente se realizó una prueba de citotoxicidad en levaduras (Figura 2).

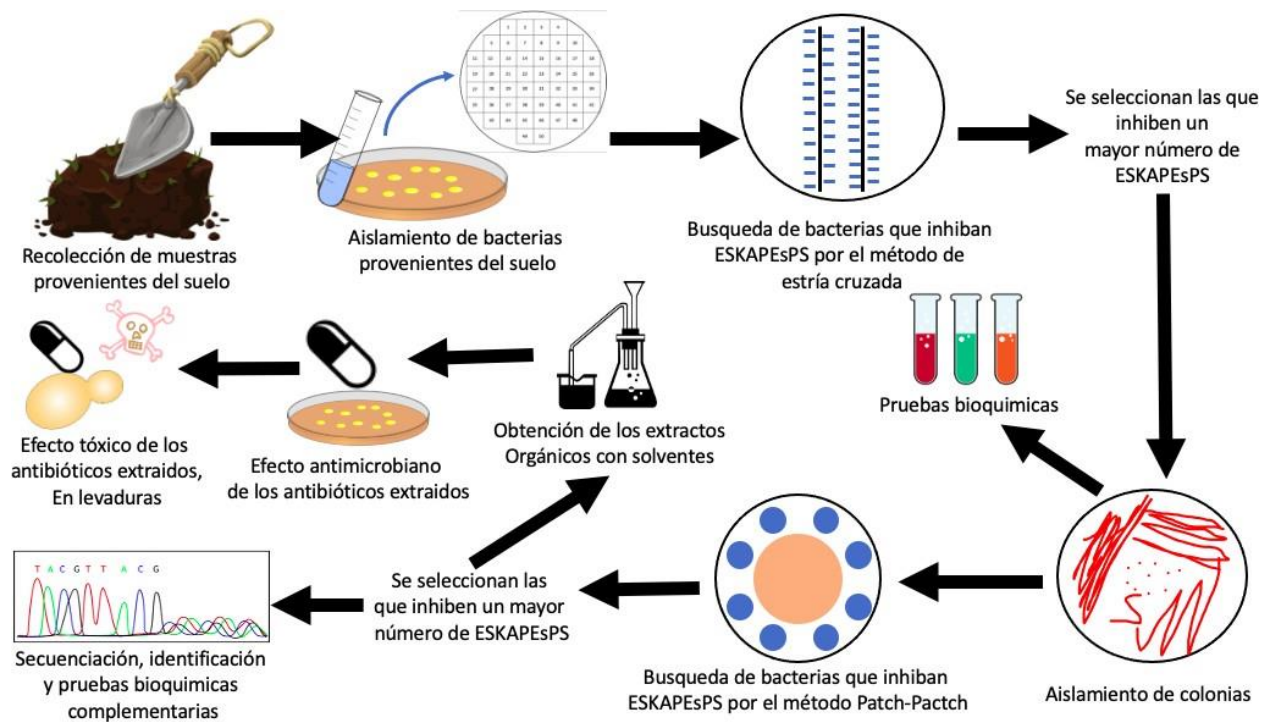


Figura 2. Diagrama de flujo de la estrategia experimental para aislar e identificar bacterias productoras de antibióticos.

6.1 Trabajo en campo

6.1.1 Selección de los sitios de colecta

Se seleccionaron 3 sitios de colecta, los cuales son tierras de cultivo de una milpa de Pinal de Amoles. Los tres sitios de colecta fueron georreferenciados con el celular en la aplicación Google maps®.

6.1.2 Recolección de muestras

Se realizó la colecta de muestras de suelo en junio del 2020. Con una pala desinfectada con alcohol al 70%, se escarbo 30 cm de profundidad en el sitio de colecta, se volvió a desinfectar la pala, se recolectaron 30 g de suelo aproximadamente y se guardó en una bolsa de plástico nueva con cierre. Las 3 muestras de tierra se almacenaron en refrigeración a 4°C hasta el momento de ser procesadas.

6.1.3 Crecimiento de los ESKAPEsPS

Los ESKAPEsPS (*Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas putida*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli* y *Staphylococcus epidermidis*) se obtuvieron del cepario en el laboratorio de microbiología molecular de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro y del Langebio, Cinvestav-Irapuato almacenados a -80°C. Se resembraron en cajas de agar LB e incubadas a 37°C para su uso en los posteriores experimentos.

6.2 Trabajo de laboratorio

6.2.1 Aislamiento de bacterias presentes en muestras de suelo

Para el aislamiento de las bacterias del suelo primero se hizo un cultivo en caldo de las muestras debido a que no se pudo hacer el aislamiento de colonias de inmediato. Primero se pesó un gramo de cada una de las muestras de tierra y se disolvió en cinco mililitros de agua destilada estéril. Se tomó un mililitro de la dilución y se inoculó en 5ml de caldo Luria-Bertani (LB) y en caldo nutritivo (CN), esto para cada una de las muestras y se incubaron a 28°C a 200 rpm por 24 hrs. Se llenó a un tercio de su capacidad un minitubo estéril de 1.5 ml con 1/3 de glicerol estéril y se llenó con 2/3 de cultivo líquido, posteriormente se mezcló con un vortex a máxima potencia por 10 segundos, esto para cada una de las muestras y se llevaron a congelar a -80°C hasta su posterior procesamiento.

Se sembró en 5ml un raspado de los minitubos de cada una de las muestras congeladas y se incubó a 28°C durante 24 hrs. Se realizaron diluciones 1:10,000,000 de cada cultivo y se inocularon 100 µl de la última dilución en agar nutritivo (AN) si era muestra de CN y agar LB si era muestra de caldo LB, posteriormente se colocaron 4 perlas de vidrio estériles en la caja de Petri y se agitaron para distribuir el inóculo. Una vez distribuido el inóculo se destaparon las cajas de Petri y se dejó secar el líquido para posteriormente ser incubadas a 28°C por 24 hrs.

Después de que transcurrió el tiempo de incubación se resembraron las colonias de la muestra uno (M1AN), de la muestra dos (M2AN) y de la muestra tres (M3AN) que crecieron en agar nutritivo y de la muestra uno (M1LB), de la muestra dos (M2LB) y de la muestra tres (M3LB) que crecieron en agar LB, cada una de las colonias se sembraron con palillos de madera estériles picando las colonias y sembrándose en otra caja de agar nutritivo y agar LB cuadriculadas y numeradas respectivamente (Figura 3).

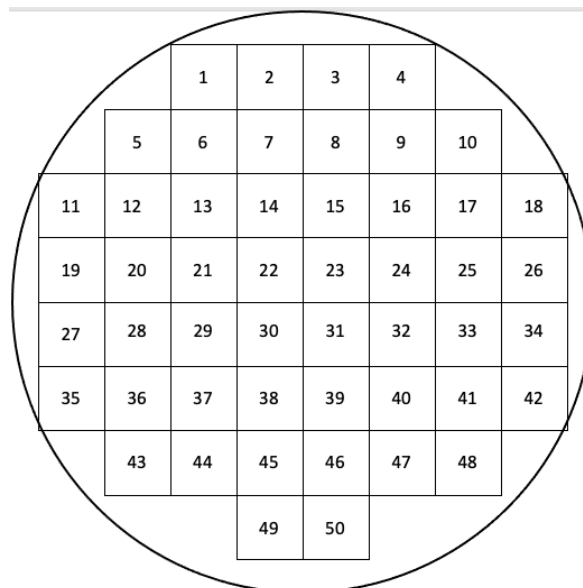


Figura 3. Diagrama de la caja de Petri donde se sembraron las colonias aisladas de los cultivos líquidos de las muestras de suelo. El número identifica a la colonia aislada para los siguientes experimentos

6.2.2 Pruebas de inhibición por estría cruzada y Patch-Patch

Para identificar las bacterias productoras de algún metabolito con propiedades antimicrobianas se realizó un procedimiento similar a la estría cruzada. Se sembraron en agar nutritivo las bacterias ESKAPePS (*Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas putida*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli* y *Staphylococcus epidermidis*) y se incubaron a 37°C. En una placa de Agar LB y de AN se sembró con un palillo de madera estéril las bacterias ESKAPePS a inhibir dibujando una línea recta en la caja, se volvió a picar la colonia de la bacteria a inhibir para dibujar otra línea en

paralelo a 4 cm de distancia aproximadamente. Posteriormente se picó con un palillo estéril una colonia de los aislados de suelo a probar y se sembró dibujando una pequeña línea de medio cm ubicada a 0.2 cm de distancia de manera perpendicular a la línea donde se sembró la bacteria ESKAPEsPS, se picó otra colonia y se sembró de igual manera a 3-4 mm más abajo y del lado contrario, así sucesivamente hasta sembrar todos los aislados de de suelo (Figura 4). Las cajas se incubaron a 28°C por 24 hrs.

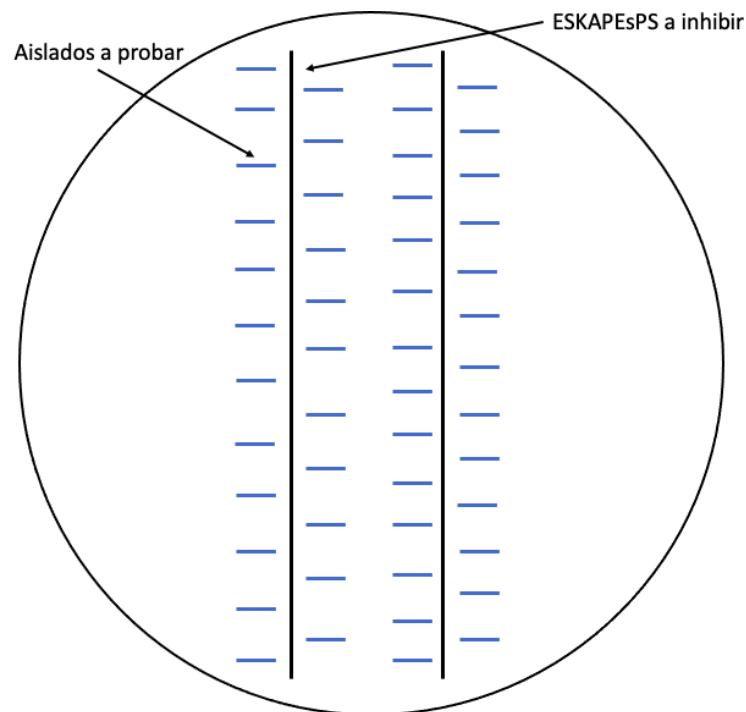


Figura 4. Diagrama del sembrado para identificar bacterias productoras de antibióticos por el método de estría cruzada

Se seleccionaron aquellos aislados con actividad antimicrobiana en base a las que inhiben un mayor número de ESKAPEsPS. Se tomó una asada de los aislados y se estriaron por agotamiento en cajas de AN y Agar LB de acuerdo al medio en el cual se aisló originalmente para obtener colonias aisladas. Se seleccionaron dos colonias y se sembraron para tener un respaldo. Las bacterias seleccionadas se cultivaron en 5ml de caldo LB o caldo nutritivo dependiendo de en qué medio se aislaron y se incubaron a 28°C en agitación 200 rpm por 24 hrs. Se sembraron en 5 ml de caldo nutritivo las ESKAPEsPS y se incubaron a 28°C en agitación 200rpm por 24 hrs. Se midió la DO (densidad óptica) del cultivo líquido de las bacterias a una longitud de onda de 600nm en el espectrofotómetro Genesys 10s UV-Vis ThermoScientific® y se ajustaron a una DO de 1 haciendo una dilución con caldo LB o nutritivo estéril dependiendo del aislado. Se realizó la técnica de Patch-Patch modificada, se tomaron 10 µl de la dilución y con ayuda de una plantilla se inocularon alrededor de cajas de LB y AN, estas cajas se incubaron a 28°C por 48 hrs. Transcurrido el tiempo de incubación en el centro de la caja se sembraron 100µl de la bacteria ESKAPEsPS a probar y se

distribuyó circularmente con un hisopo estéril guiándose con una plantilla (Figura 5) y se incubó a 28°C por 24 hrs.

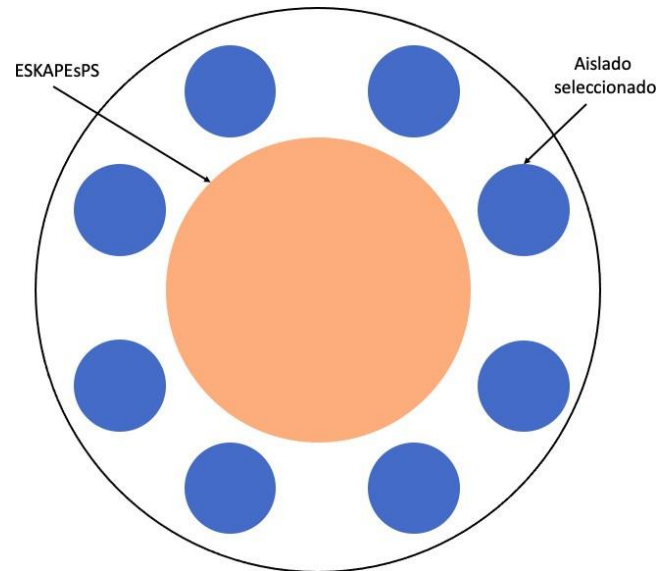


Figura 5. Diagrama para la inoculación e identificación de bacterias productoras de antibióticos por el método Patch-Patch

6.2.3 Resguardo de las bacterias productoras de antibiótico

Para resguardar las bacterias con actividad antimicrobiana tanto del método de estría cruzada como por el método Patch/patch, se sembró una asada de las bacterias en caldo LB o nutritivo dependiendo de la procedencia del aislado y se incubó a 28°C en agitación a 200rpm por 24 hrs. Se llenó un tubo de 1.5 ml a 1/3 de su capacidad con glicerol estéril y se vertió cultivo de la bacteria a resguardar hasta la máxima capacidad del tubo. El glicerol se mezcló con el cultivo con ayuda del vortex para posteriormente ser almacenados a -80°C.

6.2.4 Caracterización bioquímica de las cepas productoras de antibiótico

Se caracterizaron bioquímicamente las bacterias utilizadas en el experimento de Patch-Patch. Se prepararon los medios Hierro triple azúcar (TSI), Agar Kiggler Hierro(AKH), Agar Hierro lisina(LIA), Medio MIO, Agar salado manitol (ASM), Agar DNasa, Agar sangre y caldo ureasa (CU). Se inocularon con un asa bacteriológica en punta en las diferentes pruebas bioquímicas, se incubaron a 28°C por 24 hrs. También se utilizaron controles positivos y negativos. Para la lectura de las pruebas se realizaron chequeando las instrucciones del fabricante.

6.2.5 Tinciones de las bacterias candidatas identificadas por el método Patch-Patch

A las bacterias productoras de antibiótico identificadas utilizadas en el experimento Patch-Patch se les realizó una tinción de Gram para determinar su morfología, y si son Gram positivas o Gram negativas., para ello se realizó la tinción de Gram según Hernández et al 2019. La preparación se visualizó en un microscopio Leica® DM750 100x y se capturaron las imágenes con el software Leica Acquire®.

6.2.6 Pruebas de susceptibilidad a antibióticos en las bacterias productoras

Se determinó la susceptibilidad a antibióticos de las bacterias que inhiben más ESKAPEsPS por el método Patch-Patch. Se tomaron asadas de las bacterias y se inocularon en 5 ml de caldo LB durante 24 hrs a 28°C. Se midió la D.O. de los cultivos en el espectrofotómetro Genesys 10s UV-Vis ThermoScientific® a los cultivos, se ajustó la densidad óptica a 0.3 utilizando caldo LB. Se inocularon 200 µl del cultivo ajustado a 0.3 en cajas de Agar Muller Hilton (MH) y se distribuye por toda la caja utilizando un hisopo estéril. Se colocaron 7 círculos de 5 mm de papel filtro, en el agar MH y se colocaron 10µl de los antibióticos gentamicina (10 µg/µl), kanamicina (30 µg/µl), streptomina (10 µg/µl), tetraciclina (30 µg/µl), cloranfenicol (30 µg/µl), ampicilina (10 µg/µl) y ceftriaxona (10 µg/µl). Se incubaron las cajas a 28°C por 24 hrs y pasado el tiempo de incubación se midió el halo de inhibición utilizando un Vernier.

6.2.7 Obtención de los EO de las bacterias productoras de antibióticos seleccionadas

Para obtener los EO se utilizaron los aislados bacterianos que inhibieron a mayor número de ESKAPEsPS por el método Patch-Patch. Se inoculó una asada de las cepas productoras de antibiótico en 5 ml de medio de cultivo líquido correspondiente del medio en el cual fue aislada la bacteria de interés, se incubó a 28°C en agitación a 150 rpm por 24 hrs. Se inocularon 12 cajas por aislado con 160µl del cultivo líquido en medio de cultivo sólido en el cual se observó la actividad antimicrobiana, se distribuyó en estriado en césped con un hisopo estéril, se incubaron a 28°C por 72 hrs. Pasado el tiempo de incubación, el agar se cortó en pequeños cuadros de 5x5 mm aproximadamente y se vertió el agar de 6 cajas de un aislado en un frasco de vidrio estéril (500 ml) y el agar de las otras 6 en otro, se congelaron a -80°C por 48 hrs; lo mismo para el resto de los aislados. Pasado el tiempo a uno de los dos frascos del aislado se le añadieron 120 ml de acetato de etilo (AE) y 60 ml de agua destilada estéril, al otro frasco se le añadieron 120 ml de hexano (HEX) y 60 ml de agua destilada estéril, se envolvieron con papel aluminio, se agitaron a 100 rpm a temperatura ambiente por 24 hrs. Se filtró el líquido de los frascos en un embudo con magitel, el

líquido recuperado se pasó a un embudo de separación. Se agitó y se dejó reposar para permitir la formación de la fase orgánica y la acuosa. Se recuperó la fase orgánica y se almacenó a -20°C hasta su procesamiento (se utilizó un pedazo de magitel distinto para cada muestra); el embudo de separación y el embudo se lavó con agua corriente, agua destilada y metanol entre cada muestra. En un rotoevaporador Heidolph® se eliminó el solvente para concentrar los EO, 77°C para el AE y 69°C para el HEX, a 50 rpm. Se recuperaron 3 ml del respectivo con una pipeta volumétrica, los EO así obtenidos se recuperaron en frascos ámbar estériles previamente pesados. Se almacenaron a -20°C hasta el momento de su uso.

6.2.8 Determinación de la cantidad de antibiótico obtenido

Los frascos con los EO se colocaron en baño maría a la respectiva temperatura para la evaporación del solvente, hasta su evaporación total. Posteriormente los frascos a temperatura ambiente, se volvieron a pesar y por diferencia de peso se determinó la cantidad de mg obtenidos de EO.

6.2.9 Determinación del efecto antibacteriano de los EO

Para determinar el efecto antimicrobiano de los EO obtenidos, éstos se solubilizaron con una mezcla metanol:agua 70:30 y se ajustaron a una concentración de $0.1\text{mg}/\mu\text{l}$. Primero se agregó el metanol, posteriormente se añadió el agua destilada estéril, una vez disueltos los EO se recuperaron en un tubo de 1.5 ml envuelto con papel aluminio.

Posteriormente se creció a partir de un cultivo en agar LB a *E. coli* y *S. aureus* en caldo nutritivo durante 24 hrs, se ajustó la D.O. de los cultivos a 0.07. utilizando caldo Muller Hinton (MH). Se prepararon 9 microcultivos con 9 tratamientos diferentes por duplicado como se indica en la Tabla 1. Se mezclaron los minitubos durante 5 segundos en el vortex y se incubaron a 150 rpm a 37°C durante 18 hrs. Pasado el tiempo de incubación se hicieron diluciones seriadas de los controles y el tratamiento con solvente hasta 1×10^{-6} con solución fisiológica estéril, para el resto de los tratamientos se diluyó hasta 1×10^{-5} ; se tomaron $100\mu\text{l}$ de la última dilución y se inocularon en agar LB, el inóculo se esparció con 4 perlas estériles de vidrio, una vez secas las placas se incubaron 37°C durante 24 hrs. Se determinó el número de unidades de formadoras de colonia (UFC) obtenidas por μl decultivo. En caso de que la cantidad de UFC fueran incontables o no hubiera crecimiento se sembró una dilución menor o una dilución mayor respectivamente.

Tabla 1. Tratamientos para determinar el efecto antibacteriano de los EO.

Tratamientos	Descripción del tratamiento		
Sin solvente ni metanol al 30%	75µl de cultivo ^a	75µl de caldo MH ^b	
Con metano al 30%	75µl de cultivo ^a	45µl de caldo MH ^b	30µl de metanol al 30%
EO de la cepa M2AN18-1	75µl de cultivo ^a	45µl de caldo MH ^b	30µl de EO
EO de la cepa M2AN18-2	75µl de cultivo ^a	45µl de caldo MH ^b	30µl de EO
EO de la cepa M1LB17-2	75µl de cultivo ^a	45µl de caldo MH ^b	30µl de EO
EO de la cepa M1LB45-1	75µl de cultivo ^a	45µl de caldo MH ^b	30µl de EO
EO de la cepa M3LB50-1	75µl de cultivo ^a	45µl de caldo MH ^b	30µl de EO
EO de la cepa M3LB50-2	75µl de cultivo ^a	45µl de caldo MH ^b	30µl de EO
EO de la cepa M2LB16-1	75µl de cultivo ^a	45µl de caldo MH ^b	30µl de EO

a) cultivo a 0.07 D.O. b) MH, Mueller Hinton

6.2.10 Análisis estadístico del efecto antibacteriano de los EO

Los datos obtenidos del experimento de la determinación del efecto antimicrobiano de los antibióticos se analizaron utilizando el lenguaje de programación R V4.1.0 (<https://www.r-project.org/>). Para la carga de los datos se utilizó el paquete readxl v1.3.1. y se realizó un análisis de varianza de una vía. El valor de $p < 0.05$ se consideró como estadísticamente significativo. Posteriormente se realizó una prueba de TukeyHSD para encontrar diferencias significativas comparando entre tratamientos considerándose como $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

6.2.11 Extracción de ADN cromosómico

Para la extracción de ADN de los aislados bacterianos de interés, se sembraron colonias aisladas de las bacterias en matraz con 40 ml de caldo nutritivo y se incubaron a 28°C a 150 rpm durante 24 hrs. El cultivo se centrifugó 6000 rpm durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante dejando solamente 1 ml de medio. Se resuspendió la pastilla en el medio restante y se transfirió a un tubo de 1.5 ml que se centrifugó a 6000 rpm durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se guardó el tubo a -80°C. Con un mortero y pistilo previamente congelado y estéril se molió la pastilla de bacterias con ayuda de nitrógeno líquido, se raspo con una espátula fría y estéril las células molidas y se transfirieron a un minitubo de 1.5ml. Se le añadió 400 µl de buffer TSNTE a 4°C, microperlas de vidrio, 400 µl de fenol-cloroformo (1:1) a 4°C y se agitó en vortex durante 2 minutos. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos y se extrajo la fase acuosa a otro tubo de 1.5 ml. Se añadieron 3µl de RNasa A (10 mg/ml), se mezcló con ayuda de un vortex durante 5 segundos y se incubó a 37°C por 5 minutos. Se añadieron 400 µl de fenol-cloroformo, se mezcló en el vortex durante 2 minutos y se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos. Se recuperó nuevamente la fase acuosa y se le añadió una décima parte del volumen de muestra de acetato de sodio 3M y dos volúmenes de la muestra de etanol absoluto frío, se mezcló y se incubó durante 60 minutos a -20°C. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos y se desechó el sobrenadante. Se añadieron 300 µl de etanol al

75%, se disgregó la pastilla, se centrifugó a 12,000 rpm durante 3 minutos, se decantó el sobrenadante y se dejó secar el tubo invertido sobre una toalla de papel. Se resuspendió la pastilla en 40 µl de agua grado biología molecular (GBM), se cuantificó la concentración de ADN, las analizó los valores de las relaciones 260/280 y 260/230 en el nanodrop 2000. Se corrieron 5 µl de ADN con 5 µl de buffer de carga Orange G, se incluyó un carril con marcador de peso molecular GeneRuler DNA Ladder Mix[®] en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (6µl de bromuro a 10 mg/ml por cada 100 ml de agarosa) durante 1 hora a 100 v y 400 mAmp. El gel se visualizó en el fotodocumentador BIO-RAD Gel Doc XR[®] con el software Image Lab[®]. Las muestras de ADN purificado se almacenaron a -20°C.

6.2.12 Amplificación del gen 16s ARN

Se ajustaron las muestras de ADN a 25ng/µl con agua GBM. Se hicieron 2 reacciones de PCR por muestra a un volumen de 25 µl cada una, para esto primero se hizo un mix para 18 muestras con los reactivos para la PCR añadiendo 45 µl de buffer DreamTaq₂, 5.4 µl de dNTPs, 9 µl del cebador forward (AGRGTTTGATCMTGGCTCAG) y reverse (GGTTACCTTGTTACGACTT) para en gen 16s (Bello-López, et al. 2015), 5.4 µl de polimerasa DreamTaq[®], 160.2 µl de agua GBM. En microtubos para PCR se añadió 13 µl del mix y 12 µl de muestra de ADN a una concentración de 25ng/µl. En el termociclador BIO-RAD T100 thermal cycler[®] se realizó la reacción con el siguiente programa: la desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos seguido de la fase de amplificación que consistió en 34 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 62°C y 1.5 min a 72°C, seguido de los 34 ciclos se hizo una extensión final a 72°C durante 5 minutos. Se corrieron 4µl de producto de PCR de cada muestra con 4 µl de buffer de carga Orange G, también se cargó 6 µl de marcador de peso molecular GeneRuler DNA Ladder Mix[®] en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio durante 80 minutos a 100 v y 400 mAmp. El gel se visualizó en el fotodocumentador BIO-RAD Gel Doc XR[®] con el software Image Lab[®]. El resto de los productos de PCR se resguardo a -20°C para su secuenciación.

6.2.13 Secuenciación y análisis filogenético

Se purificaron los productos de PCR utilizando el zymoclean DNA recovery kit[®]. Se incubó el producto de PCR con 250 µl de buffer ADB durante 5 minutos, seguido se pasó a una columna con un microtubo de 1.5ml donde se centrifugó a 12,000 rpm por 5 segundos. Se colocaron 200 µl de buffer de lavado y se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 segundos, repitiéndose el proceso 2 veces. Se añadió a la columna 20 µl de buffer de elución precalentado a 60°C, seguido se incubó a 50°C por 2 minutos. Se centrifugó la columna a 12,000 rpm durante 5 segundos con el tubo donde se resguardo la muestra, seguido se repite el paso del buffer de elución y este paso. Se cuantificó la

concentración de ADN en el Nanodrop, se corrieron 4µl de producto de PCR purificado de cada muestra con 4 µl de buffer de carga Orange G, y 6 µl de marcador de peso molecular GeneRuler DNA Ladder Mix® en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio durante 80 minutos a 100 v y 400 mA. El gel se visualizó en el fotodocumentador BIO-RAD Gel Doc XR® con el software Image Lab®. Las muestras se conservaron a -20°C hasta el momento de ser transportadas a Langebio Unidad Irapuato del CINVESTAV para su secuenciación por el método Sanger. La edición de electroferograma, empalme de las secuencias forward y reverse, y la obtención de una secuencia consenso se realizó con el programa PhyDE (<http://www.phyde.de/>). La identificación de las secuencias consenso se realizó analizándolas con el programa BLASTn del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), buscando en bases de datos de 16s rARN. Se realizó el alineamiento múltiple de las secuencias más parecidas con las secuencias obtenidas, utilizando el algoritmo UPGMA y se determinó el árbol filogenético por el método de Neighbor joining y se realizó un análisis de bootstrap (100 repeticiones), utilizando el programa MEGAX (<https://www.megasoftware.net/>). El árbol filogenético obtenido fue editado con el software FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

6.2.14 Pruebas bioquímicas complementarias a la identificación molecular

Para confirmar que las bacterias identificadas pertenecían al género *Serratia* se les realizaron la prueba bioquímica Citrato de Simmons, rojo de metilo, gelatinasa, lisina descarboxilasa y desaminasa, y voges-proskauer de acuerdo al Bergey's Manual of Bacteriology. Además, se crecieron en Agar peptona glicerol (extracto de levadura 10 g/L, glicerol 20 ml/L, peptona 20 g/L y agar 20 g/L), se incubaron a 37°C por 4 días para inducir la producción de prodigiosina.

6.2.15 Prueba de citotoxicidad en levaduras

Para determinar el efecto citotóxico de los antibióticos en un organismo eucariota, éstos se probaron en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* BY4742; MatΔ; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ sexo α y sexo alfa donadas por el Dr. Alexander de la Luna de Langebio Unidad Irapuato del CINVESTAV y *Saccharomyces cerevisiae* CJM294 Mat-alfa, ade2, leu2, his2, trp1, ura3. Tps2::URA3 (mutante en el gen de la trehalosa fosfato fosfatasa, donado por el Dr. Gancedo del Instituto de Investigaciones Biomédicas; España) y *C. albicans* CI 2011 y *C. albicans* ATCC 10231. Se tomó una pequeña cantidad de las cepas sembradas en agar YPD para inocular en 5 ml de caldo YPD con 5 µl de ampicilina (100mg/ml) y se incubó a 28°C durante 24 hrs. Se contaron la cantidad de células en la cámara de Neubauer y se preparó 1 ml de YPD con ampicilina con 1x10⁷ células, posteriormente se le hizo una dilución 1:10 para ajustar a 1x10⁶ células. Se hicieron 3 tratamientos como se indica en

la Tabla 2 y se dejaron incubaron durante 18 hrs, 28°C a 150 rpm. Se sacaron los microcultivos con los tratamientos y se hizo una dilución hasta 1:10,000 con agua destilada y se sembraron 10 µl de cada dilución de los tratamientos en cajas de agar YPD y se incubaron a 28°C por 24 hrs. Para observar la viabilidad celular de las células tratadas se tomaron 20 µl del microcultivo de los tratamientos y se les añadió azul de tripano de la marca AMRESCO® en una proporción 1:1, se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Se tomaron 10 µl de la muestra y se cargó en la cámara de Neubauer para contar las células viables y posteriormente calcular el porcentaje de viabilidad. Después se probó el mismo experimento en las cepas de *C. albicans*, pero solamente con el control, el solvente y 40 µl de los antibióticos combinados.

Tabla 2. Tratamientos para determinar citotoxicidad en levaduras

Tratamientos	Descripción de los tratamientos			
Control	220µl de levaduras ^a	270 µl de YPD ^b	10 µl de ampicilina ^c	
Metanol al 30%	220µl de levaduras ^a	240 µl de YPD ^b	10 µl de ampicilina ^c	30µl de metanol al 30%
EO del aislado M2AN18-1 extraído con HEX	220µl de levaduras ^a	240 µl de YPD ^b	10 µl de ampicilina ^c	30µl de EO
EO del aislado M3LB50-2 extraído con AE	220µl de levaduras ^a	240 µl de YPD ^b	10 µl de ampicilina ^c	30µl de EO

a) levadura a 1×10^6 células/ml, b) YPD con ampicilina c) ampicilina a 100mg/ml.

7. Resultados

7.1 Descripción ambiental de los sitios de colecta y cantidad de bacterias aisladas

Las muestras se obtuvieron de una milpa en la cual se sembraba calabaza y maíz, el suelo de esa milpa es del tipo molisoles. De la muestra de suelo M1 se aislaron 50 bacterias en agar LB y 21 en agar nutritivo, en la muestra de suelo M2 se aislaron 47 bacterias en agar LB y 28 en agar nutritivo, por último, en la muestra de suelo M3 se aislaron 50 bacterias en agar LB y 24 en agar nutritivo (Anexo 1). La muestra en la cual se aisló un mayor número de bacterias fue en la muestra M2 con un total de 75, mientras que la muestra donde se aisló un menor número de bacterias fue en la M1 con un total de 71. En total se obtuvieron 220 bacterias (Figura 6). Para darle identidad a cada una de las bacterias, se les asignó un nombre único el cual está compuesto por el acrónimo de la muestra de la cual proviene, un acrónimo del medio de cultivo del cual se aisló (AN para agar nutritivo o LB para el medio Luria-Bertani) y por último el número de la cuadrícula en la cual se sembró la bacteria (Figura 7).

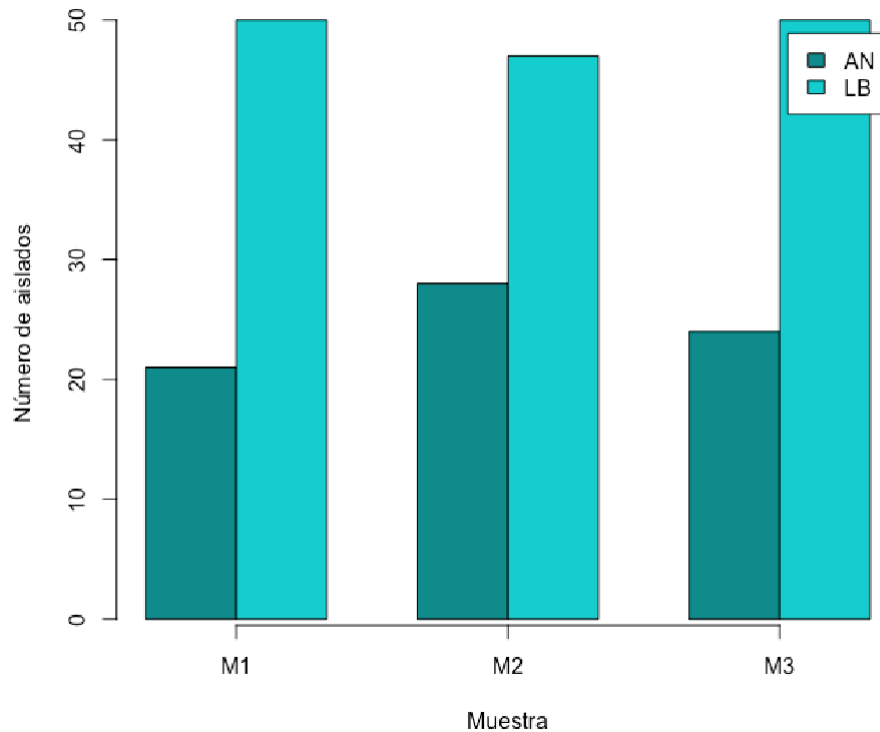


Figura 6. Número de aislados obtenidos de cada muestra de tierra sembrada en agar LB y AN

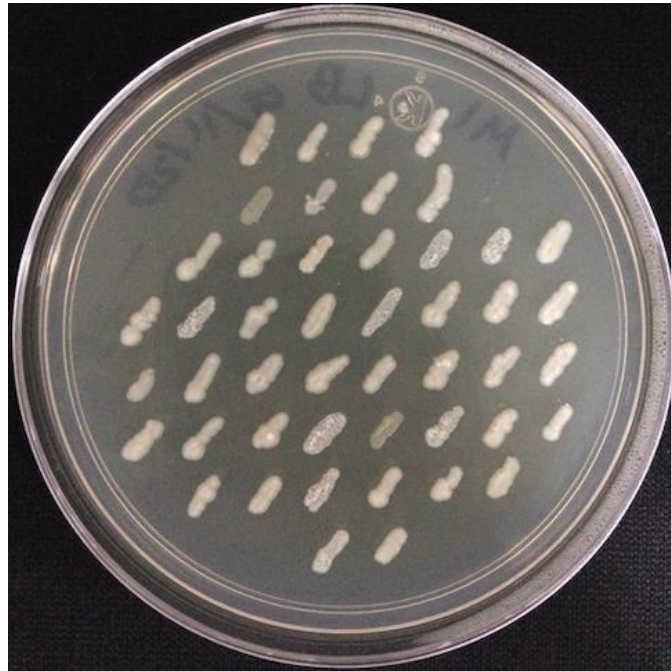


Figura 7. Ejemplo de la siembra de los aislados

7.2 Bacterias productoras de antibiótico identificadas por estría cruzada y Patch-Patch

Se logró obtener aislados bacterianos con un efecto inhibitorio contra las ESKAPEsPS *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas putida*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli* y *Staphylococcus epidermidis* (Figura 8) y el número total de bacterias con una actividad antimicrobiana identificadas por el método de estría cruzada fueron 98 de 220 bacterias aisladas. La muestra de la cual se aislaron un mayor número de bacterias con actividad antimicrobiana fue de la muestra M3 con un total de 42 bacterias, 7 obtenidas a partir de AN y 35 que provenían de agar LB. Mientras que la muestra de la cual se obtuvieron un menor número de aislados con actividad antimicrobiana fue la M1 con solamente 18 aislados. En general el medio de cultivo en el cual se aisló un mayor número de bacterias con actividad antimicrobiana fue el agar LB (Figura 9). De los 98 aislados con capacidad antimicrobiana, 21 son los que inhibieron un mayor número de ESKAPEsPS puesto que fueron capaces de inhibir de 3 a 4 (Tabla 3), los cuales fueron seleccionados para sembrar por agotamiento para obtener al menos 2 colonias aisladas de cada uno y ser utilizadas en los siguientes experimentos. Para diferenciar entre las dos colonias seleccionadas se les añadió un número 1 o 2 seguido de su número de identificación por ejemplo de las 2 colonias obtenidas del aislado M2AN18 una será M2AN18-1 y M2AN18-2.

Se logró observar el efecto inhibitorio de algunos aislados por el método Patch-Patch (Figura 10). Las bacterias aisladas por estriado por agotamiento más prometedoras que inhibieron de 3 a 4 bacterias por el método de Patch-Patch fueron 7 (Tabla 4), mientras que unos aislados inhiben de 1 a 2 ESKAPEsPS solamente 1 no mostró nuevamente su actividad antimicrobiana (Anexo 4 y 6).

También se observó que algunas bacterias que no inhibieron a algunas bacterias por estría cruzada por el método de Patch-Patch si mostraron efectividad, por ejemplo, el aislado M2AN18 (Tabla 3 y 4). Estas bacterias que inhibieron más ESKAPEsPS se seleccionaron para realizar la extracción de sus antibióticos, antibiograma e identificación molecular.



Figura 8. Ejemplo del efecto inhibitorio por estría cruzada

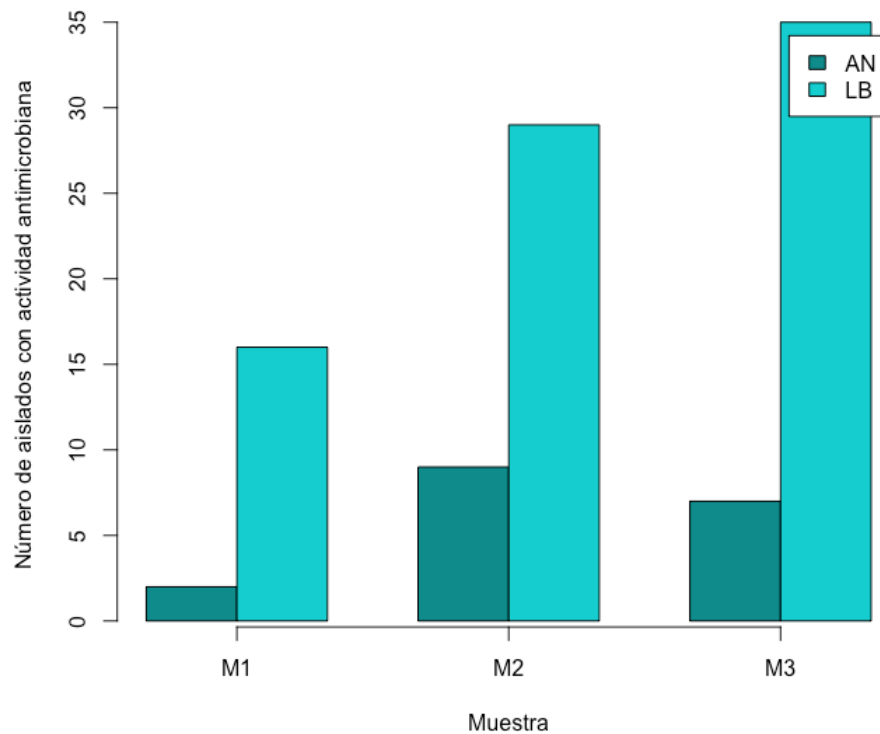


Figura 9. Número de aislados con actividad antimicrobiana contra alguna ESKAPEsPS en cada muestra por estría cruzada

Tabla 3. Aislados que inhibieron de 3 a 4 ESKAPEsPS por estría cruzada

Aislado	<i>E. aerogenes</i>	<i>P. putida</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>
M2AN18			X		X	X
M2AN28	X	X				X
M1LB7	X		X	X		X
M1LB17			X		X	X
M1LB20			X		X	X
M1LB27			X		X	X
M1LB38	X		X		X	X
M1LB40	X	X	X			X
M1LB45	X		X			X
M2LB4	X			X	X	
M2LB13	X	X		X		
M2LB16	X	X		X		X
M3LB4		X		X	X	
M3LB10	X			X		X
M3LB32	X	X		X		
M3LB34		X		X		X
M3LB42	X			X		X
M3LB43	X	X		X		
M3LB44	X		X			X
M3LB45	X	X		X		
M3LB50	X	X				X

Tabla 4. Aislados que inhibieron de 3 a 4 ESKAPEsPS por el método de Patch-Patch.

Aislado	<i>E. aerogenes</i>	<i>P. putida</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>
M2AN18-1	X	X	X		X	
M2AN18-2	X	X	X		X	
M1LB17-2	X		X	X	X	
M1LB45-1	X	X				X
M2LB16-1	X			X		X
M3LB50-1	X			X		X
M3LB50-2	X			X		X



Figura 10. Ejemplo del efecto inhibitorio por el método Patch-Patch. Aislado M2AN18-1 contra la bacteria *P. putida*.

7.3 Morfología, características bioquímicas, perfil de resistencia a antibióticos de las bacterias productoras de antibiótico

Se seleccionaron los 21 aislados que inhiben un mayor número de ESKAPEsPS (de 3 a 4) y se hizo un estriado por agotamiento de cada aislado, se utilizaron dos colonias aisladas obteniendo así un total de 42 cepas a las cuales se les caracterizó bioquímicamente (Tabla 5). La mayoría de las bacterias utilizadas compartieron el mismo patrón en las pruebas bioquímicas, como lo es en la prueba de DNAsa, ureasa, movilidad, lisina desaminasa, ornitina descarboxilasa, producción de indol y producción de SH₂. Mientras que en la fermentación de algunos carbohidratos si hubo más diferencias en los resultados, incluso algunas cepas provenientes de un mismo aislado inicial tuvieron diferentes resultados en la fermentación de carbohidratos, por ejemplo, la M1LB20-1 y la M1LB20-2 que provenían del mismo aislado inicial la primera fermentó lactosa mientras que la segunda no. Las cepas M2LB13-1 y M3LB13-2 tenían características bioquímicas diferentes con respecto a la mayoría de los aislados, debido a que fermentan manitol, producen gas en medio TSI y agar Kligler mientras que los demás aislados no mostraron dichas características; además de que fueron las únicas que dieron negativo a la prueba de DNAsa. Respecto a la morfología microscópica se observó en la tinción de Gram que todos los aislados son Gram negativos (Figura 11).

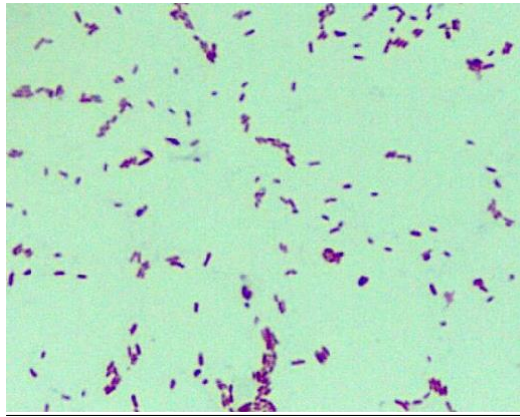


Figura 11. Tinción de Gram de una de las bacterias productoras de antibiótico. Aislado M2LB13-1.

Tabla 5. Características bioquímicas de los aislados bacterianos seleccionados a partir de la prueba Patch-Patch.

Aislado	F. Glu	F. lac	F. sac	F. man	Gas	P. SH ₂	Lys desc	Lys desa	Orni desc	indol	mov	DNA	Urea	Hemólisis
M2AN18-1	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
M2AN18-2	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
M2AN28-1	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
M2AN28-2	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
M1LB7-1	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
M1LB7-2	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
M1LB17-1	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
M1LB17-2	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
M1LB20-1	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
M1LB20-2	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
M1LB27-1	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
M1LB27-2	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
M1LB38-1	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
M1LB38-2	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
M1LB40-1	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
M1LB40-2	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
M1LB45-1	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
M1LB45-2	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
M2LB4-1	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
M2LB4-2	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
M2LB13-1	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
M2LB13-2	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
M2LB16-1	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
M2LB16-2	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
M3LB4-1	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
M3LB4-1	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
M3LB10-1	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
M3LB10-2	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
M3LB32-1	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
M3LB32-2	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
M3LB34-1	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
M3LB34-2	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
M3LB42-1	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
M3LB42-2	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
M3LB43-1	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
M3LB43-2	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
M3LB44-1	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
M3LB44-2	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
M3LB45-1	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
M3LB45-2	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+

M3LB50 -1	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
M3LB50 -2	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+

F. Glu=fermentación de glucosa, F. lac=fermentación de lactosa, F. sac=fermentación de sacarosa, F. man= Fermentación de manitol, Gas=producción de gas, P. SH₂=producción de ácido sulfhídrico, Lys desc=lisina descarboxilasa, Lys desa: lisina desaminasa, orni desc=ornitina descarboxilasa, indol=producción de indol, mov=movilidad, DNA=producción de ADN asa, Urea=producción de ureasa.

Posterior a realizar las pruebas bioquímicas se acotó el número de bacterias a 7, a éstas se les determinó el perfil de resistencia a antibióticos. Para ello se utilizó la prueba de Kirby Bauer, para ello se utilizaron los siguientes antibióticos: kanamicina (30µg), estreptomina (10µg), ceftriaxona (10µg), gentamicina (10µg), tetraciclina (30µg), ampicilina (10µg) y cloranfenicol (30µg). Todos los aislados mostraron resistencia a los antibióticos utilizados, de acuerdo al manual M100-S25 del CLSI del 2015, aunque se observó variación entre el diámetro del halo de inhibición de los distintos aislados (Tabla 6).

Tabla 6. Antibiograma de los aislados seleccionados por el método Patch-Patch.

Aislado	Kan	Estr	Cef	Gen	Tet	Amp	Clor
M2AN18-1	R (9mm)	R (3mm)	R (11mm)	R (9mm)	R (4mm)	R (0mm)	R (6mm)
M2AN18-2	R (9mm)	R (0mm)	R (12mm)	R (8mm)	R (4mm)	R (0mm)	R (8mm)
M1LB17-2	R (9mm)	R (0mm)	R (11mm)	R (9mm)	R (4mm)	R (0mm)	R (7mm)
M1LB45-1	R (9mm)	R (3mm)	R (11mm)	R (8mm)	R (0mm)	R (0mm)	R (7mm)
M2LB16-1	R (8mm)	R (3mm)	R (10mm)	R (8mm)	R (4mm)	R (0mm)	R (4mm)
M3LB50-1	R (9mm)	R (0mm)	R (11mm)	R (8mm)	R (5mm)	R (0mm)	R (6mm)
M3LB50-2	R (8mm)	R (0mm)	R (10mm)	R (6mm)	R (4mm)	R (0mm)	R (5mm)

Estr= estreptomina, Kan= kanamicina, Tet= tetraciclina Gen= gentamicina, Cef= ceftriaxona, Clor=cloranfenicol, Amp= ampicilina. Entre paréntesis se indica el halo de inhibición en mm.

7.4 Efecto antimicrobiano de los extractos orgánicos

Utilizando hexano (HEX) y acetato de etilo (AE) se obtuvieron los EO de las siete cepas seleccionadas: M2AN18-1, M2AN18-2, M1LB17-2, M1LB45-1, M3LB50-1, M3LB50-2 y M2LB16-1. Una vez obtenidos los EO se determinó el rendimiento, el cual osciló en el orden de 12 hasta casi 150 mg: este se disolvió utilizando 10 µl de metanol al 30% por mg obtenido de EO. Se analizó el efecto del solvente y se comparó con el control el cual solo era un cultivo de la bacteria sin ningún tratamiento y se observó que el solvente disminuyó el crecimiento con respecto al control, pero no demasiado con respecto a los tratamientos con los EO, por lo que podemos considerarlo despreciable su efecto en el crecimiento de *E. coli* y *S. aureus*. El AE fue el solvente con el que se obtuvieron mayor cantidad de EO con respecto al HEX en todos los aislados, por ejemplo en la cepa M3LB50-2 se obtuvieron 146.8 mg (Anexo 8), mientras que en esta misma cepa pero utilizando como solvente el HEX se obtuvieron solamente 48.4 mg, siendo esta una diferencia de 3 veces más.

La efectividad antimicrobiana de los EO extraídos con AE se ensayó en *E. coli* TOP 10 y *S. aureus*. Los que mostraron un mayor efecto antimicrobiano contra *E. coli* con respecto al control fueron los

antibióticos producidos por la cepa M3LB50-2 y M1LB45-1, mientras que los que mostraron menor efecto antimicrobiano fueron los extraídos de la cepa M2AN18-2 y la M2LB16-1 (Figura 12). Por otro lado, los EO con mayor efecto antimicrobiano contra *S. aureus* fueron los extraídos de la cepa M2AN18-2 Y M1LB17-2, mientras que los que mostraron menor efecto antimicrobiano con respecto a los otros tratamientos y el control son los extraídos de la cepa M1LB45-1 y M2LB16-1 (Figura 14). El resultado de la ANOVA mostró, que los EO obtenidos con AE fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$) y al hacer la prueba de Tukey mostró que cada uno de los tratamientos comparados con el control son efectivos reduciendo las UFCs (Anexo 9 y 10). La efectividad antimicrobiana de los EO extraídos con HEX también se probaron en *E. coli* TOP 10 y *S. aureus*. Los antibióticos extraídos con HEX tuvieron un mejor efecto antimicrobiano contra *S. aureus* a comparación de *E. coli* en el cual solo los EO del aislado M2AN18-1, M2 AN18-2 y M2LB16-1 si tuvieron un efecto antimicrobiano más notable con respecto al solvente y el control (Figura 13). Los EO extraídos con HEX con mejor efecto antimicrobiano contra *S. aureus* fue EL M1LB17-2 y M2AN18-2 (Figura 15).

Se observó que algunos de los EO extraídos de las cepas no tenían la misma capacidad inhibitoria cuando se extraían con HEX, aunque aún existía un efecto significativo en la disminución del crecimiento bacteriano por algunos antibióticos ($p < 0.05$, anexo 9). Por ejemplo, los EO producidos por la cepa M3LB50-2 y extraídos con AE tenían una potente actividad antimicrobiana, mientras que el EO extraído de la misma cepa, pero con HEX mostró un menor efecto. Además de que se observó que los EO de algunas cepas que no inhiben algún ESKAPEsPS por estría cruzada o Patch-Patch, si inhiben a *E. coli* o *S. aureus* al utilizarse su antibiótico extraído. Por ejemplo, la cepa M1LB45-1 no mostró un efecto antimicrobiano contra *E. coli* pero al utilizar sus EO, éstos si mostraron efecto antimicrobiano. En el caso de la cepa M3LB50-1 que por los métodos basados en cultivo no mostró efecto contra *S. aureus* pero sus antibióticos extraídos si afectaron su crecimiento (Figura 12, 13 y Tabla 3 y 4) y lo mismo se observó con la cepa M2LB16-1.

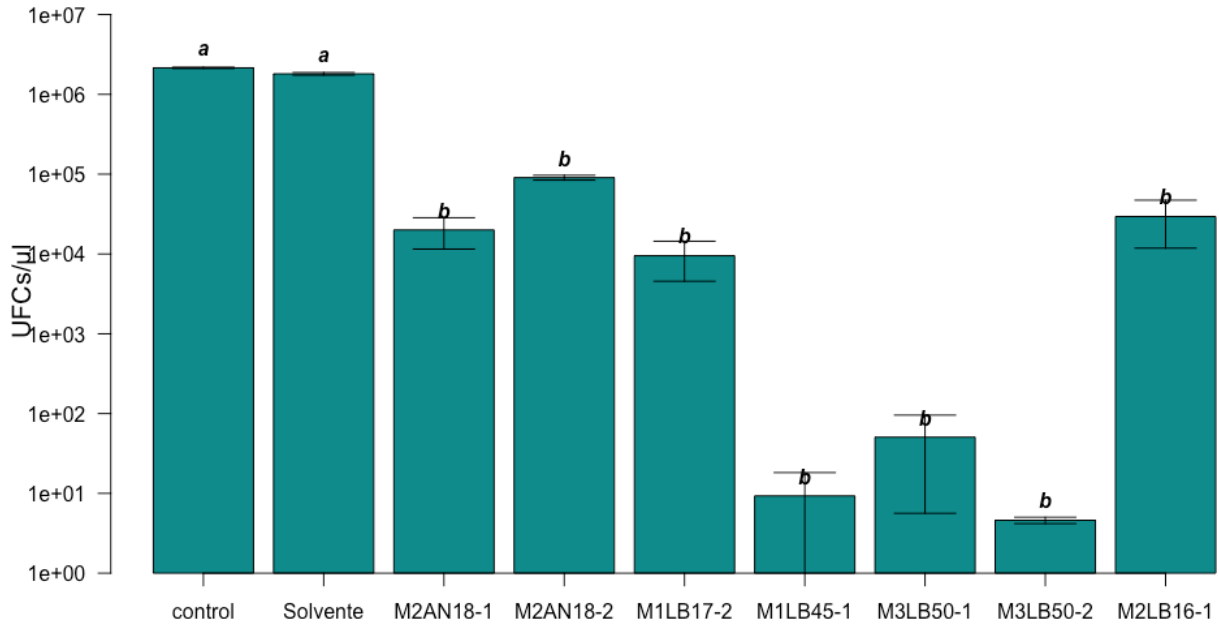


Figura 12. Efecto antimicrobiano de los extractos orgánicos extraídos con acetato de etilo de los aislados bacterianos con actividad antimicrobiana en *E. coli* Top 10

Control: células de *E. coli* Top 10 sin ningún tratamiento, el solvente eran células tratadas con una solución de metanol al 30% y M2AN18-1, M2AN18-2, M1LB17-2, M1LB45-1, M3LB50-1, M3LB50-2 y M2LB16-1 son las células de tratadas con los EO obtenidos con AE de cada uno de los aislados seleccionados. Las líneas en cada una de las barras indican la desviación estándar y las letras (a-b) las diferencias significativas con respecto al control. El experimento se hizo por duplicado para cada tratamiento con un valor de $p < 0.05$.

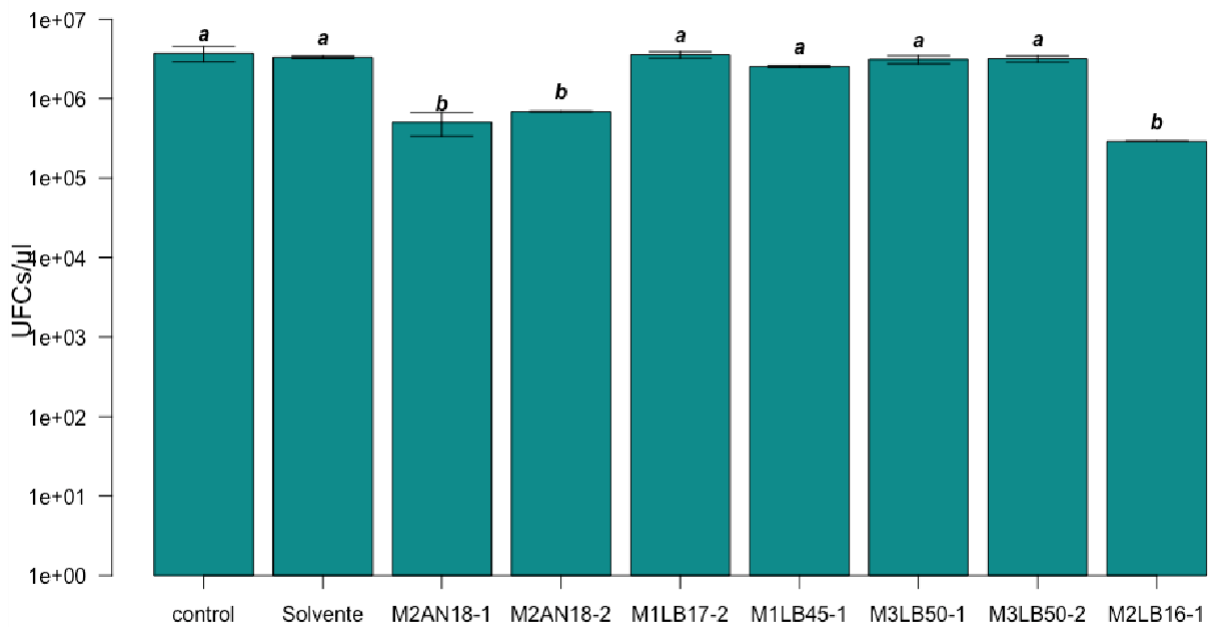


Figura 13. Efecto antimicrobiano de los extractos orgánicos extraídos con hexano de los aislados bacterianos con actividad antimicrobiana en *E. coli* Top 10

El control eran células de *E. coli* Top 10 sin ningún tratamiento, el solvente eran células tratadas con una solución de metanol al 30% y M2AN18-1, M2AN18-2, M1LB17-2, M1LB45-1, M3LB50-1, M3LB50-2 y M2LB16-1 son las células de tratadas con los EO obtenidos con HEX de cada uno de los aislados seleccionados. Las líneas en cada una de las barras indican la desviación estándar y las letras (a-b) las diferencias significativas con respecto al control. El experimento se hizo por duplicado para cada tratamiento con un valor de $p < 0.05$.

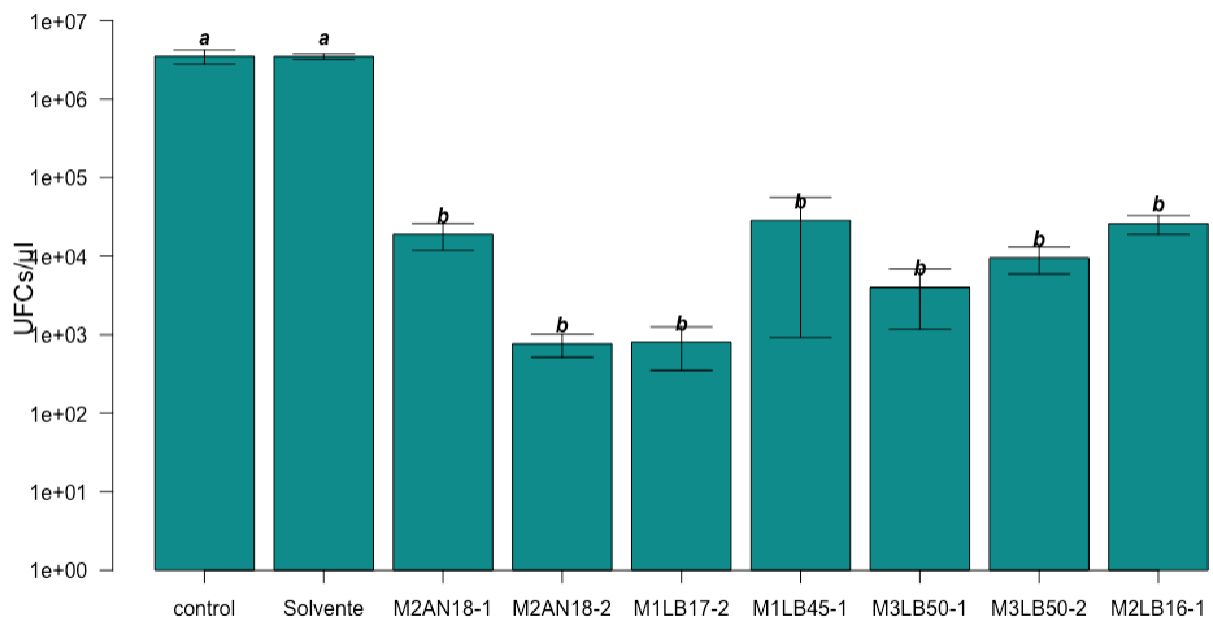


Figura 14. Efecto antimicrobiano de los extractos orgánicos extraídos con acetato de etilo de los aislados bacterianos con actividad antimicrobiana en *S. aureus*

El control eran células de *S. aureus* sin ningún tratamiento, el solvente eran células tratadas con una solución de metanol al 30% y M2AN18-1, M2AN18-2, M1LB17-2, M1LB45-1, M3LB50-1, M3LB50-2 y M2LB16-1 son las células de tratadas con los EO obtenidos con AE de cada uno de los aislados seleccionados. Las líneas en cada una de las barras indican la desviación estándar y las letras (a-b) las diferencias significativas con respecto al control. El experimento se hizo por duplicado para cada tratamiento con un valor de $p < 0.05$.

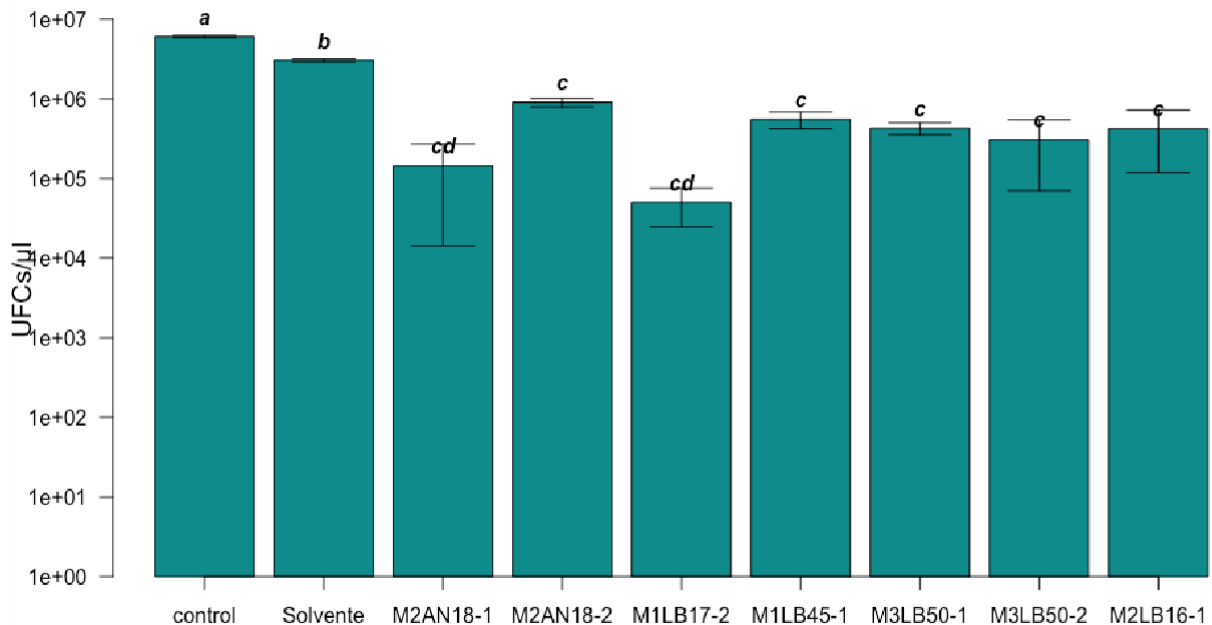


Figura 15. Efecto antimicrobiano de los extractos orgánicos extraídos con hexano de los aislados bacterianos con actividad antimicrobiana en *S. aureus*

El control eran células de *S. aureus* sin ningún tratamiento, el solvente eran células tratadas con una solución de metanol al 30% y M2AN18-1, M2AN18-2, M1LB17-2, M1LB45-1, M3LB50-1, M3LB50-2 y M2LB16-1 son las células de tratadas con los EO obtenidos con HEX de cada uno de los aislados seleccionados. Las líneas en cada una de las barras indican la desviación estándar y las letras (a-d) las diferencias significativas con respecto al control. El experimento se hizo por duplicado para cada tratamiento con un valor de $p < 0.05$.

7.5 Identificación molecular de las bacterias seleccionadas

Se extrajo el ADN de los 7 aislados con los que se obtuvo su extracto orgánico y que mostraron efectividad para inhibir el crecimiento de *E. coli* y *S. aureus*. se realizó la PCR para amplificar un fragmento de 1500pb del gen 16S (Figura 16). Los amplicones obtenidos mostraron un tamaño de 1500 pb. Solamente la cepa M2AN18-2 fue la única en la que no se obtuvo producto de amplificación. Las secuencias obtenidas en el Langebio-Cinvestav Irapuato, se editaron y se analizaron en BLASTn el dato obtenido indicó que todas pertenecen al género *Serratia* (Tabla 7). Todas las secuencias pertenecen a la especie *nematodiphila* excepto la cepa M1LB17-2 que corresponde a una *S. marcescens*. Para determinar si existe una relación entre las secuencias obtenidas y pertenecen al género se compararon con las secuencias del genbank que eran más parecidas y se determinó la filogenia; se observó que si existe una relación entre las cepas que son *S. nematodiphila* y la que es *S. marcescens* (Figura 17).

Para corroborar la identidad de las bacterias secuenciadas se realizaron pruebas bioquímicas complementarias a su identificación molecular, estas pruebas también se realizaron en la cepa

M2AN18-2 que no se fue posible identificar por secuenciación del ADN. Se observó que su perfil bioquímico corresponde al género *Serratia* (Tabla 8 y Figura 18).

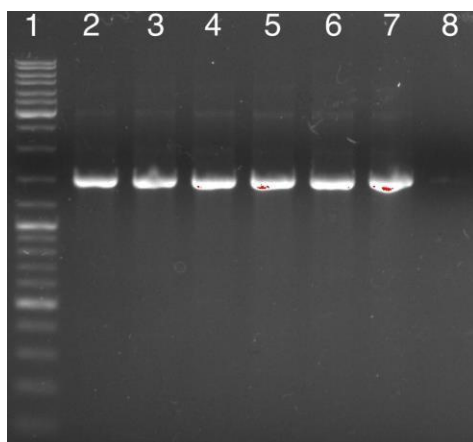


Figura 16. Producto de amplificación obtenido a partir del gen 16S.

Carril 1: marcador de peso molecular de 100-10,000 pb, 2: M1LB17-2 1500 pb, 3: M3LB50-2 1500 pb, 4: M3LB50-1 1500 pb, 5: M1LB45-1 1500 pb, 6: M2AN18-1 1500 pb, 7: M2LB16-1 1500 pb y 8: M2AN18-2 1500 pb.

Tabla 7. BLASTn más cercano a las secuencias editadas de la secuenciación.

Aislado	Número de identificación del GeneBank	Match más cercano en el BLASTn	Porcentaje De Identidad
M2AN18-1	NR_044385.1	<i>Serratia nematodiphila</i> <i>DZ0503SBS1</i>	99.86
M1LB17-2	NR_114043.1	<i>Serratia marcescens</i>	99.72
M1LB45-1	NR_044385.1	<i>Serratia nematodiphila</i> <i>DZ0503SBS1</i>	99.65
M2LB16-1	NR_044385.1	<i>Serratia nematodiphila</i> <i>DZ0503SBS1</i>	99.93
M3LB50-1	NR_044385.1	<i>Serratia nematodiphila</i> <i>DZ0503SBS1</i>	99.86
M3LB50-2	NR_044385.1	<i>Serratia nematodiphila</i> <i>DZ0503SBS1</i>	99.79

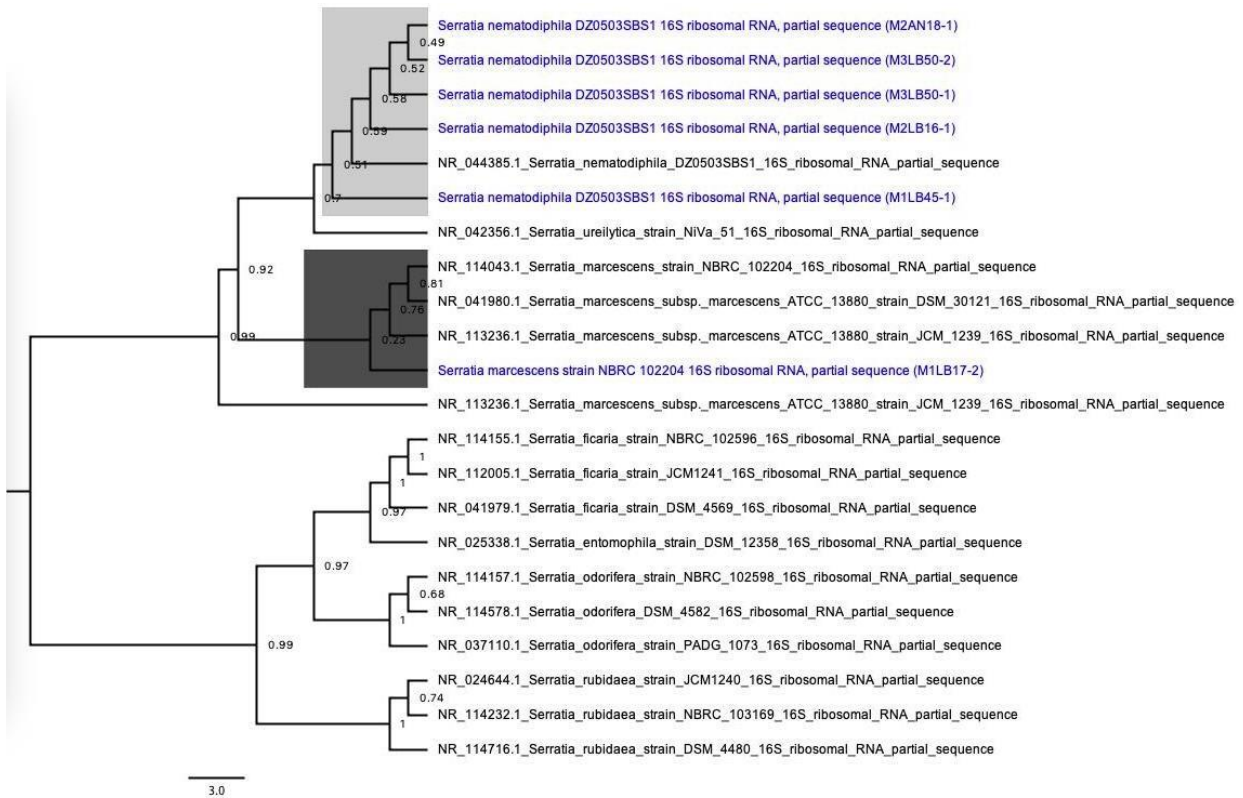


Figura 17. Análisis filogenético de las cepas secuenciadas.

En los nodos se muestra el valor del bootstrap por el método de Neighbor joining. En gris claro se resaltan las ramas de los taxones pertenecientes a la especie *nematodiphila* y en gris oscuro los taxones que pertenecen a la especie *marcescens*. Los taxones terminales resaltados en azul son las bacterias secuenciadas y los taxones en negro corresponden a secuencias de 16s de *Serratia* obtenidas del GeneBank.

Tabla 8. Resultados de las pruebas bioquímicas complementarias a la identificación molecular.

Aislado	Match más cercano en el BLASTn	Cit	Lis desc	Lis des	VP	RM	Prodi	Gel
M2AN18-1	<i>Serratia nematodiphila</i> DZ0503SBS1	+	+	-	+	-	+	+
M2AN18-2	ND	+	+	-	+	-	+	+
M1LB17-2	<i>Serratia marcescens</i> NBRC 102204	+	+	-	+	-	+	+
M1LB45-1	<i>Serratia nematodiphila</i> DZ0503SBS1	+	+	-	+	-	+	+
M2LB16-1	<i>Serratia nematodiphila</i> DZ0503SBS1	+	+	-	+	-	+	+
M3LB50-1	<i>Serratia nematodiphila</i> DZ0503SBS1	+	+	-	+	-	+	+
M3LB50-2	<i>Serratia nematodiphila</i> DZ0503SBS1	+	+	-	+	-	+	+

Cit= citrato, Lis desc= lisina descarboxilasa, Lis des= lisina desaminasa, VP= voges proskauer, RM= rojo de metilo, Prodi= producción de prodigiosina, Gel=producción de gelatinasa

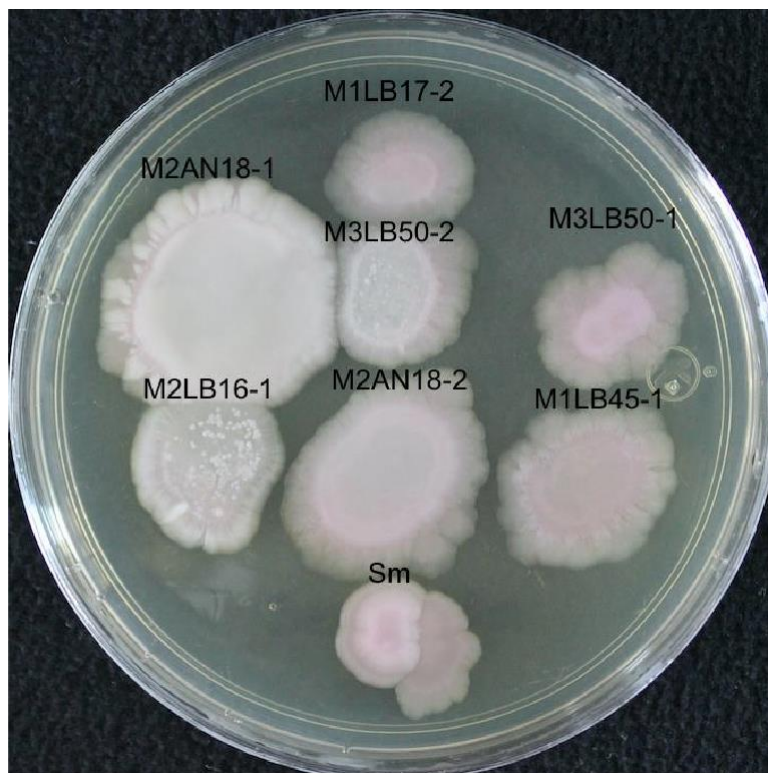


Figura 18. Resultados de la producción de prodigiosina.

Las cepas se sembraron en medio peptona-glicerol y se incubaron durante 4 días a 28°C. Con letras negras se indica identidad del aislado bacteriano. Se usó a *Serratia marcescens* (Sm) como control positivo.

7.6 Efecto citotóxico de los EO en *S. cerevisiae*

Dado a que se observó un claro efecto antibacteriano en *S. aureus* y *E. coli* se determinó el efecto de los EO en levaduras. Para ello se seleccionaron el EO del aislado M2AN18-1 extraído con HEX y del aislado M3LB50-2 extraído con AE y retamos células de *S. cerevisiae*. Observamos un efecto antifúngico en las cepas de *S. cerevisiae* y el tratamiento con un mejor efecto fue en la cepa *S. cerevisiae* CJM294, la cual fue más sensible al EO obtenido de el aislado M3LB50-2 extraído con AE, al observarse un menor crecimiento de la levadura en la caja de agar YPD. Posterior al tratamiento, en menor medida fue sensible al EO obtenido del aislado M2AN18-1 (Figura 19a). Por otro lado, la cepa *S. cerevisiae* BY4742, ambos sexos mostraron mayor sensibilidad al EO del aislado M3LB50-2, resultado tener mejor efecto con los tres fondos genéticos analizados (Figura 19b y 19c).

Una vez sembradas las diluciones, se procedió a realizar el experimento con azul de tripano y se observó que todas las levaduras mantenían un porcentaje de viabilidad del 100% (Tabla 9). También se observó que disminuye el número de levaduras con respecto a el control y las células tratadas con el solvente, al ser tratados con alguno de los dos EO en ambas cepas, aunque en la caja de agar no se apreciaba algún efecto de los tratamientos al contar las levaduras si se podía observar que había un efecto. Además, en el conteo de levaduras se aprecia de igual manera la disminución

del crecimiento en la *S. cerevisiae* CJM294 con tan solo 1.5×10^6 mientras que el control se contaron 1.63×10^9 .

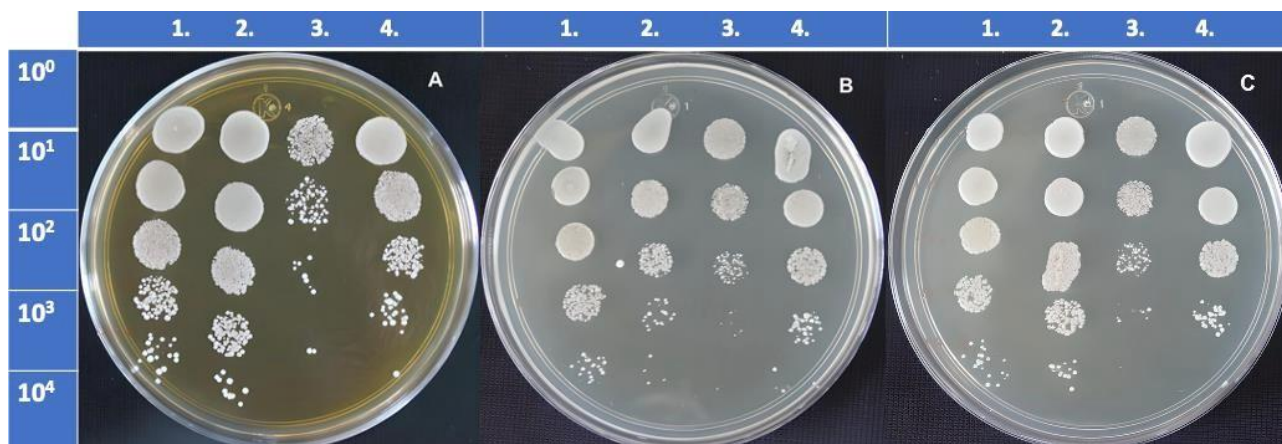


Figura 19. Efecto antifúngico en cepas de *S. cerevisiae* tratadas con los EO de los aislados M2AN18-1 Y M3LB50-2.

1) control sin tratamiento 2) tratamiento con metanol al 30% 3) EO de la cepa M3LB50-2 extraído con AE 4) EO de la cepa M2AN18-1 extraído con HEX. Del lado izquierda se indica la dilución sembrada de cada tratamiento posterior a la incubación. A) cepa CJM294 B) cepa BY4742 sexo alfa C) cepa BY4742 sexo a. Posterior a la aplicación de los tratamientos indicados, las cepas se incubaron por 18 hrs en agitación constante a 28°C. Posteriormente se realizaron diluciones que se sembraron en medio YPD, se incubaron por 48 hrs. a 28°C.

Tabla 9. Porcentaje de viabilidad celular de células de *S. cerevisiae* y número de células contadas después de ser tratadas con los de los EO de los aislados M2AN18-1 Y M3LB50-2.

Cepa	Tratamiento	% de viabilidad	Número total de células	
			vivas	Muertas
<i>S. cerevisiae</i> CJM294	Control	100%	1.63×10^9	0
	Solvente	100%	1.29×10^9	0
	M3LB50-2 AE	100%	1.5×10^6	0
	M2AN18-1 HEX	100%	6.4×10^8	0
<i>S. cerevisiae</i> BY4742; sexo alfa	Control	100%	8.75×10^8	0
	Solvente	100%	8.84×10^7	0
	M3LB50-2 AE	100%	4.93×10^7	0
	M2AN18-1 HEX	100%	2.26×10^8	0
<i>S. cerevisiae</i> BY4742; sexo a	Control	100%	1.11×10^9	0
	Solvente	100%	5.6×10^8	0
	M3LB50-2 AE	100%	2.14×10^7	0
	M2AN18-1 HEX	100%	1.63×10^8	0

7.7 Efecto citotóxico de los EO en *C. albicans*

Al observar que los EO tienen un efecto citotóxico en las células de *S. cerevisiae*, se realizó el mismo experimento para analizar el efecto en la levadura patógena de humanos de interés clínico como lo es *Candida albicans*. Al inocular las diluciones de las células tratadas con los EO del aislado M2AN18-1 extraído con HEX y del aislado M3LB50-2 extraído con AE en agar YPD, se observó que en *C. albicans* ATCC 10231 fue ligeramente sensible al antibiótico extraído con AE del aislado M3LB50-2, esto al compararse con el crecimiento de las células tratadas con el antibiótico del aislado M2AN18-1 HEX, el solvente y el control (Figura 20a). Mientras que la otra cepa de *C. albicans*

analizado su crecimiento no se apreció alguna disminución en su crecimiento que pudiera ser considerada significativo (Figura 20b).

Todas las células de *C. albicans* al ser tratadas con los antibióticos tuvieron una viabilidad del 100% al realizarse la tinción con azul de tripano. Se observó que la cepa de *C. albicans* ATCC 10231 que fue sensible al antibiótico M3LB50-2 AE, al ser tratada habían solo 2.91×10^9 células lo cual fue menor con respecto al control y las tratadas con el solvente (Tabla 10). También se observó que el antibiótico M2AN18-1 HEX disminuye el crecimiento de la *C. albicans* con respecto a el control y las tratadas con el solvente, efecto que no fue muy apreciable en la caja de agar YPD.

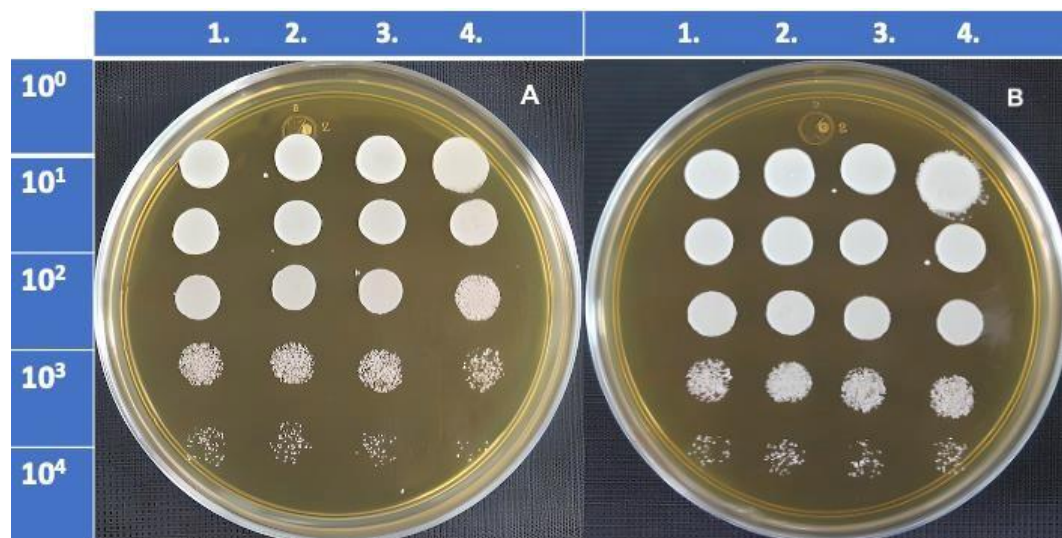


Figura 20. Efecto antifúngico en cepas de *C. albicans* tratadas con los EO de los aislados M2AN18-1 Y M3LB50-2.

1) control 2) solvente en el que están disueltos los antibióticos 3) EO de la cepa M2AN18-1 extraído con HEX 4) EO de la cepa M3LB50-2 extraído con AE. Del lado izquierda se indica la dilución sembrada de cada tratamiento posterior a la incubación. A) *C. albicans* ATCC 10231 B) *C. albicans*. Posterior a la aplicación de los tratamientos indicados, las cepas se incubaron por 18 hrs en agitación constante a 28°C. Posteriormente se realizaron diluciones que se sembraron en medio YPD, se incubaron por 48 hrs. a 28°C.

Tabla 10. Porcentaje de viabilidad celular de células de *C. albicans* y número de células contadas después de ser tratadas con los EO de los aislados M2AN18-1 Y M3LB50-2.

Cepa	Tratamiento	% de viabilidad	Número total de células	
			Vivas	Muertas
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	Control	100%	1.478×10^{10}	0
	Solvente	100%	7.47×10^9	0
	M3LB50-2 AE	100%	2.91×10^9	0
	M2AN18-1 HEX	100%	7.16×10^9	0
<i>C. albicans</i>	Control	100%	6.62×10^9	0
	Solvente	100%	6.10×10^9	0
	M3LB50-2 AE	100%	6.81×10^9	0
	M2AN18-1-1 HEX	100%	5.13×10^9	0

Debido a este efecto reducido observados con estos EO realizamos un experimento en el que se utilizaron los EO de manera conjunta para determinar si existe un efecto de tipo adyuvante en *C. albicans* y determinar un posible efecto mayor en la inhibición del crecimiento en esta levadura. Sin

embargo, el resultado obtenido indicó que no se observó que tuviera un mayor efecto en el crecimiento con respecto a los antibióticos por separado.

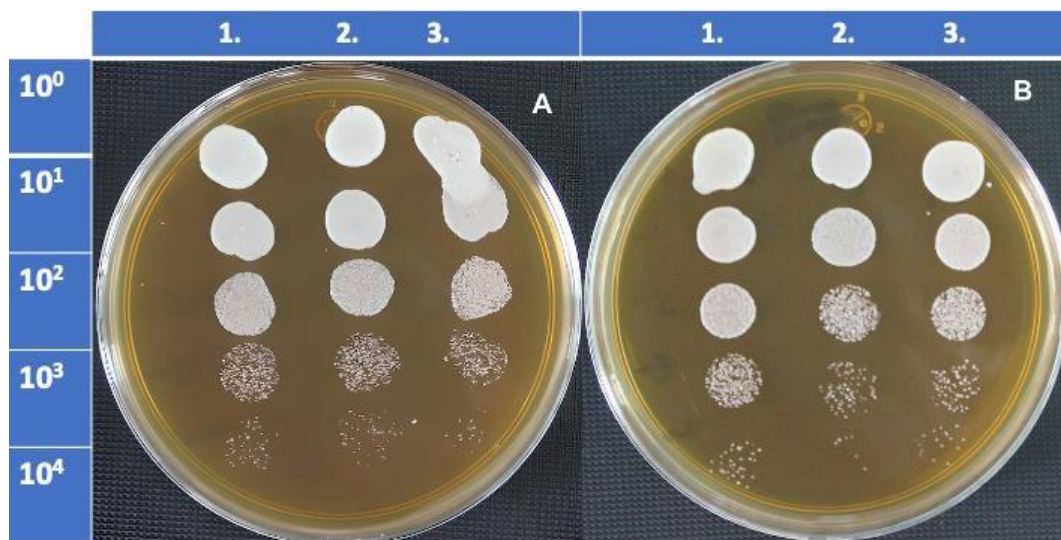


Figura 21. Efecto antifúngico en cepas de *C. albicans* tratadas con los EO de los aislados M2AN18-1 Y M3LB50-2 combinados.

1) Control 2) solvente en el que están disueltos los antibióticos 3) EO combinados. Del lado izquierda se indica la dilución sembrada de cada tratamiento posterior a la incubación. A) *C. albicans* ATCC 10231 B) *C. albicans*. Posterior a la aplicación de los tratamientos indicados, las cepas se incubaron por 18 hrs en agitación constante a 28°C. Posteriormente se realizaron diluciones que se sembraron en medio YPD, se incubaron por 48 hrs. a 28°C.

Tabla 11. Porcentaje de viabilidad celular de células de *C. albicans* y número de células contadas después de ser tratadas con los EO de los aislados M2AN18-1 Y M3LB50-2 en conjunto.

Cepa	Tratamiento	% de viabilidad	Número total de células	
			Vivas	Muertas
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	Control	100%	3.57x10 ⁹	0
	Solvente	100%	3.11x10 ⁹	0
	Antibióticos combinados	100%	2.03x10 ⁹	0
<i>C. albicans</i>	Control	100%	2.24x10 ⁹	0
	Solvente	100%	8.8x10 ⁸	0
	Antibióticos combinados	100%	1x10 ⁹	0

8. Discusión

8.1 Bacterias aisladas del suelo con actividad antimicrobiana

Al momento de sembrar las bacterias aisladas de las muestras de suelo en el agar se observó que no hubo diversidad en la morfología colonial, esto posiblemente porque predominó más el género *Serratia* al momento de hacer el cultivo en medio líquido de las muestras, además de que posiblemente también es el género que predominaba en las muestras de suelo al momento de ser colectadas. Los phyla más abundantes que se han encontrado en el agrosistema de la milpa son Proteobacteria, acidobacteria, actinobacteria bacteroidetes, cloroflexi, planctomycetes, verrucomicrobia y gemmatimonadetes, siendo el proteobacteria el más abundante. Mientras que los menos abundantes son las cianobacterias, nitrospira y firmicutes (Aguirre-von-Wobeser, et al. 2018; Moreno-Espíndola, et al. 2018), esto apoya que no existiera una gran diversidad en la morfología colonial debido a que hay phyla que predominan más que otros en la milpa, y que se observó al momento de secuenciar las bacterias seleccionadas que todas son *Serratias* (Tabla 7) pertenecientes al phyla más abundante que es proteobacteria. Aunado a ello, todas presentaron prácticamente el mismo perfil bioquímico lo cual puede ser indicio de su poca diversidad en morfología colonial (Anexo 1). Otro factor importante que pudo ser determinante en la diversidad de la morfología colonial fue el tiempo de incubación debido a que algunas especies de bacterias toman más tiempo en crecer y mucho más si se encuentran junto a otras que igual compiten por nutrientes; además de que el medio de cultivo también es un factor importante que determina qué especies se aíslan en función de su requerimiento de nutrientes, de tal manera que una especie de crecimiento rápido podrá desplazar o enmascarar la presencia de bacterias de crecimiento lento (Davis, et al. 2005; Kurm, et al. 2019; Pham and Kim 2012).

El medio en el cual se aisló un mayor número de bacterias productoras de antibiótico fue en el medio LB, era algo de esperarse porque fue donde se obtuvieron una mayor cantidad de aislados de las muestras de suelo (Figura 6). Anteriormente se han aislados bacterias productoras de antibiótico provenientes del suelo en AN y LB (Sethi, et al. 2013), incluso en el ecosistema de la milpa se han aislado algunas bacterias con actividad antimicrobiana, nuestros resultados muestran correlación debido a que los suelos de la milpa poseen una gran diversidad de microorganismos compitiendo por recursos o requiriendo infectar alguna de las plantas del ecosistema, pero a la vez se ven disminuidas por otros microorganismos patógenos o no patógenos que producen metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana (Cabrera, et al. 2020; Chávez-Ramírez, et al. 2020). Se observó que algunos aislados que inhiben a algún ESKAPEsPS por el método de estría cruzada ya no inhibe al mismo ESKAPEsPS por el método de Patch-Patch y viceversa (Anexo 5 y 6), posiblemente esto se debió a que en el caso de la estría cruzada al estar más estrechamente cercana la cepa a inhibir y el aislado del suelo, este último era capaz de sintetizar los compuestos

antimicrobianos de inmediato; mientras que en el caso del método Patch-Patch la cepa a inhibir y el aislado estaban más alejados y el aislado no requería producir el compuesto antimicrobianos de inmediato y tampoco llegaba aún a una concentración suficiente del compuestos para producir el efecto inhibitorio. Así mismo esta regulación de la síntesis de moléculas antimicrobianas podría estar involucrado el efecto de Quorum Sensing, como se ha observado en el caso de *Serratia sp.* ATCC 39006, esta bacteria regula la síntesis del antibiótico carbapenem y de prodigiosina. Los genes *carA-H* y *pigA-O* tienen una baja transcripción cuando hay una densidad celular baja debido a *SmaR* y al aumentar la densidad celular aumentan las moléculas señalizadores N-butanoil-L-homoserin lactona y N-hexanoil-L-homoserin lactona el cual disminuye la represión por *SmaR* lo cual provoca un aumento en la transcripción de los genes responsables en la síntesis de prodigiosina y el antibiótico carbapenem (Fineran, et al. 2005).

8.2 Perfil de resistencia a antimicrobianos y características bioquímicas de las cepas productoras de antibiótico

La mayoría de los aislados a los cuales se les realizó el perfil de pruebas bioquímicas mostraron las mismas características bioquímicas exceptuando por M2LB13-1 y M2LB13-2 (Tabla 5) además de que las bacterias, al ser Gram negativas se tenía la sospecha de que se trataban de enterobacterias. Comparando las pruebas bioquímicas con el Manual de Bergey's "Manual of systematic Bacteriology" se infirió que pudiera tratarse de enterobacterias además de que el phyla proteobacteria al ser el más abundante en las milpas correlaciona con dichos microorganismos (Aguirre-von-Wobeser, et al. 2018; Brenner, et al. 2005; Moreno-Espíndola, et al. 2018). Se encontró que todos los aislados producían hemólisis completa en agar sangre, lo cual se ha descrito anteriormente en bacterias del género *Serratia*. Se ha descrito que en *S. marcescens* la hemólisis es debido a una serratiamolida la cual es un compuesto biosurfactante, la cual funciona como una hemolisina e incluso como molécula antimicrobiana y anticancerígena (Shanks et al., 2012).

La RA está ampliamente distribuida entre las bacterias que provienen de tierras de cultivo (Palacios, et al. 2017; Torres-Cortés, et al. 2011). La resistencia a los β -lactámicos se ha observado que se encuentra ampliamente distribuida entre el género *Serratia* ya sea que de manera inherente en su genoma o en plásmidos poseen genes que codifican para beta lactamasas, mientras que la resistencia a los aminoglucósidos, cefalosporinas de tercera generación, tetraciclinas y cloranfenicol es menos común en el género aunque puede presentarse en algunas especies (Sandner-Miranda, et al. 2018), esto explica la resistencia observada en los aislados analizados (Tabla 6). Se ha observado que en las bacterias que producen compuestos antimicrobianos, en sus CGBs pueden tener GRA que ayudan a que la bacteria no sea dañada por sus propios antibióticos y lo mismo se ha observado en *Serratia plymuthica* (Davies and Davies 2010; Fatiah, et al. 2021; Mak, et al. 2014;

Peterson and Kaur 2018) por lo que es factible teorizar que la resistencia presente en los aislados posiblemente se deba a un gen asociado a su CGBs para evitar ser destruida por sus propios antibióticos y que los GR que posea les ayuden a resistir los antibióticos producidos por las bacterias del suelo del cual fueron aisladas.

8.3 Identificación de las cepas productoras de antibiótico

Al realizar el análisis filogenéticos con las secuencias de los aislados secuenciados el resultado arrojó que los seis pertenecen al género *Serratia* (Tabla 7), el árbol filogenético indicó que entre ellas y con otras secuencias están relacionadas filogenéticamente entre sus respectivas especies confirmando que son pertenecientes al género *Serratia* (Figura 17). Se ha observado que se pueden aislar bacterias del género *Serratia* proveniente de muestras del suelo utilizando el medio LB con algunas modificaciones en su composición (Pham and Kim 2016). Para confirmar que en efecto las bacterias pertenecían a este género se realizaron pruebas bioquímicas complementarias propias del género (Tabla 8), los resultados mostraron que efecto, estas bacterias pertenecen al género *Serratia* dado a que todas dieron el resultado esperado para la producción de prodigiosina, fermentación del citrato, voges-proskauer, lisina desaminasa, lisina descarboxilasa, rojo de metilo y gelatinasa (Brenner, et al., 2005). Cabe mencionar en relación a la prodigiosina que incluso uno de los EO con AE de la cepa M2AN18-1, se obtuvo un pigmento que podría ser prodigiosina puesto que el EO es de color rojo, y en conjunto con los demás metabolitos presentes puede tener un papel antimicrobiano como se a observado anteriormente la cual tiene propiedades antifúngicas, antibacterianas, algicidas, antiprotozoarios he incluso efecto en la disminución de la reproducción de malaria y actividad anticancerígena (Ji and Kim 2019). Se observó que la producción de prodigiosina en el agar peptona glicerol no fue muy intensa debido a que no se veía tan pigmentada la colonia, posiblemente esto se debió a que hay nutrientes que favorecen más a la producción de dicho pigmento como la lactosa o la presencia de algunos iones metálicos como el uranilo acetato, el agregar estos compuestos se podría potenciar la síntesis de prodigiosina (Gondil, et al. 2017).

También se ha observado que el phyla proteobacteria al que pertenecen las bacterias del género *Serratia*, es el phylum que se mantiene más abundante a lo largo del tiempo independientemente de la época de cosecha y de humedad en las milpas; además es el segundo género más abundante después de *kaistobacter* (Romero-Salas, et al. 2021), esto se relaciona con las bacterias productoras de antibiótico que prevalecieron en este estudio pertenecen al género *Serratia*. Además, es posible que predominaron las *Serratias* debido a que al momento de encontrarse todas las bacterias del suelo creciendo en el medio líquido algunas bacterias productoras de antibiótico empezaran a producir y secretar antibióticos que inhibieron a bacterias susceptibles presentes en la muestra, por lo que en teoría prevalecieron bacterias con resistencia a los antibióticos producidos y/o las bacterias

productoras de antibióticos. Esto se ha observado en cocultivos en los cuales bacterias productoras de bacteriocinas o antibióticos inhiben el crecimiento de otras bacterias presentes en el medio de cultivo (Vartoukian, et al. 2010). En el caso de *Serratia marcescens* Db10 se ha observado que tiene un sistema de secreción tipo VI que está asociado a efectos antibacterianos en cocultivos (Murdoch, et al. 2011).

8.4 Actividad antibacteriana de las cepas aisladas del género *Serratia*

En el presente trabajo se encontraron dos cepas de *Serratia* con actividad antimicrobiana por aproximaciones basadas en cultivo y por la obtención de un EO con diferentes solventes que mostraron una actividad antimicrobiana contra *E. coli* y *S. aureus* (Figura 12, 13, 14 y 15). Anteriormente se ha descrito que las bacterias del género *Serratia* producen una gran cantidad de compuestos antibacterianos, por ejemplo la cepa *Serratia sp.* 39006 de la colección de cultivos americana produce β -lactámicos y carbapenémicos (Mai, 2018; Soenens and Imperial 2020). En la bacteria *Serratia sp.* PDGS¹²⁰⁹¹⁵ productora de prodigiosina, este compuesto inhibe a algunas bacterias asociadas a enfermedades gastrointestinales transmitidas por alimentos como lo son *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* por mencionar algunos (Ji and Kim 2019).

En el presente trabajo se observó que 5 de las 6 cepas productoras de antibiótico secuenciadas, son la bacteria *S. nematodiphila* DZ0503SBS1 (Tabla 7) y aunque se ha descrito la actividad antibacteriana de otras cepas de *S. nematodiphila* es la primera vez que se describe la actividad antimicrobiana de esta cepa aislada de una milpa. Anteriormente, se han aislado en diferentes suelos como por ejemplo suelo contaminado por la industria farmacéutica y textil en China, suelo de la región de Lahul en la India y de nematodos (Basharat, et al. 2018; Gondil, et al. 2017; Kwak, et al. 2015). En la cepa de *Serratia nematodiphila* MB307 se han predicho CGBs para producción de péptidos no ribosomales como lo son la enterobactina, ravidomicina, prodigiosina, turnebactin y xantolipina,; además de que también se han predicho operones que regulan la síntesis de precursores de penicilina y cefalosporinas (Basharat, et al. 2018). También se ha observado que la prodigiosina producida por *Serratia nematodiphila* RL2 tiene un efecto antimicrobiano contra los patógenos *Listeria sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Yersinia sp.*, y *Shigella sp.* (Gondil, et al. 2017). Por otro lado, por análisis *in-silico* se ha predicho la presencia del gen *swrW* en *S. nematodiphila* DZ0503SBS1 cepa DSM 21420 y este gen codifica para una serrawatenina que es un péptido no ribosomal con actividad antibacteriana, antifúngica e incluso antitumoral en células Hela (Marques-Pereira, et al., 2020). Se puede sugerir que las cepas DZ0503SBS1 aisladas podrían producir alguno de estos antibióticos que anteriormente se han descrito.

En el presente trabajo se observó que una de las 6 cepas con actividad antimicrobiana secuenciadas, es la bacteria *Serratia marcescens* NBRC 102204 y aunque se han encontrado otras cepas con actividad antibacteriana nunca antes se había descrito que esta cepa aislada de las milpas tenga dicha actividad (Tabla 6). Lo que sí se han aislado son otras cepas de *S. marcescens* con actividad antimicrobiana. Un ejemplo es *Serratia marcescens* NSK-1 y IBBPo15 que producen lipopéptidos y serrawettinas que tienen una potente acción antibacteriana (Mai 2018). También se aisló una *Serratia marcescens* UENF-22GI proveniente de vermicomposta la cual tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de *Fusarium oxysporum* y promover el crecimiento de plantas de maíz; además el análisis de la secuencia de genoma y se encontró que tiene una isla genómica con genes para la síntesis de péptidos antimicrobianos (Matteoli, et al. 2018).

Se observó que el número de UFC de *E. coli* y *S. aureus* obtenidas posterior al tratamiento con los EO de los aislados M2AN18-1, M2AN18-2, M1LB17-2, M1LB45-1, M3LB50-1, M3LB50-2 y M2LB16-1, se afectó dependiendo del solvente utilizado para la obtención del EO de los aislados y se observó que los EO extraídos con HEX mostraron un menor efecto antimicrobiano con respecto al AE, esto demuestra que la naturaleza de los metabolitos recuperados con el solvente son distintos en función de la polaridad (Figura 12, 13, 14 y 15). Un resultado similar se observó en el porcentaje de crecimiento del hongo *Rhizoctonia solani* al ser tratado con los EO obtenidos de la bacteria *Streptomyces albidoflavus* C247, puesto que hay un efecto inhibitorio mayor en el crecimiento del hongo con los metabolitos extraídos con AE en comparación a los extraídos con HEX (Islam et al. 2009). Lo mismo se ha observado con los EO de la bacteria *Streptomyces lydicus* A2, donde la inhibición en mm es nula cuando se utilizó el HEX para la extracción mientras que con metanol y AE existe una inhibición de 17 mm y 16mm respectivamente en la bacteria *S. aureus* (Lertcanawanichakul, et al. 2015). Dado que se usó el AE y el HEX al ser los solventes con los cual se obtuvieron los EO que mostraron un efecto antimicrobiano, se puede inferir que los metabolitos producidos por los aislados bacterianos presentes en el EO son moléculas no polares o poco polares (Hernandez, Simon et al. 2019). También se puede inferir que los metabolitos presentes en el EO extraídos con AE que mostraron un mejor efecto antimicrobiano son más polares con respecto a los extraídos con HEX; esto de acuerdo a un parámetro conocido como P^* el cual entre mayor sea más polar es el solvente y en este caso el HEX tiene un valor de 0.0 y mientras que el AE tiene un valor de 4.3 (Snyder 1974).

Además, se observó que existe una mayor diferencia entre tratamientos al utilizarse el HEX como solvente para obtener los EO con actividad antimicrobiana, mientras que en AE no hubo tanta diferencia entre los tratamientos, puede pasar que los CGBs que codifican para compuestos antimicrobianos que son solubles en HEX son diferentes entre las bacterias aunque sean la misma cepa por lo tanto sus antibióticos también son diferentes, al menos los que son solubles en HEX.

8.5 Actividad antifúngica de las serratias aisladas

Anteriormente se han aislado bacterias del suelo con una actividad dual antibacteriana y antifúngica. En una milpa del Boxo en el estado de Hidalgo México se aisló la actinobacteria *Amycolatopsis* BX17, con la capacidad de producir metabolitos secundarios con actividad antibacteriana contra *S. aureus* y antifúngica contra *Fusarium graminearum* (Cabrera, et al. 2020). Lo mismo se ha observado en cepas aisladas de *Bacillus subtilis*, por ejemplo, la molécula 7-O-malonil-microlactina A tiene actividad antibacteriana contra *S. aureus*, *R. solanacearum*, *E. fecalis* y antifúngica contra *F. oxysporum* (Caulier, et al. 2019). También se ha observado que la bacteria *Streptomyces violaceroruber* que tiene una acción antibacteriana contra *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. aureus* y *P. fluorescens* y actividad antifúngica contra *C. albicans* y *S. cerevisiae* (Mohamed, et al. 2017).

Se realizó una prueba de citotoxicidad en *S. cerevisiae* para estudiar si los compuestos antimicrobianos presentes en los EO obtenido podrían ser tóxicos en algún organismo eucariota y los resultados mostraron que disminuye el número de levaduras en un cultivo líquido. Por lo que también se probó si potencialmente funcionan contra levaduras patógenas de humanos y se observó que la cepa *S. nematodiphila* DZ0503SBS1 además de tener una acción antibacteriana tiene una acción antifúngica contra la levadura *S. cerevisiae* (Tabla 8) y en menor medida contra *C. albicans* (Tabla 9 y 10). Anteriormente se aisló una cepa de *Streptomyces* sp. PJ90 de suelo de un bosque en Tailandia, la cual mostró actividad antibacteriana contra *S. aureus*, *S. epidermidis* y *B. subtilis*, además de tener una acción inhibitoria contra las levaduras *C. tropicalis*, *C. albicans* y *S. cerevisiae* (Chanhasena and Nantapong 2016). También se ha descrito la capacidad antifúngica de *Serratia* sp.. Una *Serratia* sp. que se aisló de la rizósfera de *Bacopa monnieri* productora de prodigiosina se demostró su efecto antifúngico contra *Pythium myriotylum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* (John Jimtha, et al. 2017). En una *S. nematodiphila* aislada de suelo contaminado con aceite en Bangalore en la India se observó que tiene actividad antifúngica contra *Candida tropicalis* (Panjiar et al. 2020). Por otro lado esta la capacidad antibacteriana y antifúngica de *S. marcescens* NCIM 50161 con capacidad antimicrobiana contra *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *C. albicans* y *C. utilis* (Pore, et al. 2016). Aunque anteriormente se han identificado cepas del género *Serratia* con actividad tanto antibacteriana como antifúngica no se ha descrito dicha actividad en *S. nematodiphila* DZ0503SBS1. Por lo que realizar experimentos de actividad antibacteriana como antifúngica, será de gran interés para estos aislados bacterianos. Sobre todo, en hongos fitopatógenos debido al nicho del cual se aislaron, así como también hacer experimentos en bacterias resistentes a antibióticos.

9. Conclusiones

En el presente trabajo se demostró que en el suelo de la milpa muestreada se encuentran bacterias productoras de metabolitos con acción antimicrobiana, que potencialmente pueden tener una aplicación en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias e incluso el tratamiento de infecciones por levaduras. Se encontraron dos cepas de *Serratia* con dicha actividad antimicrobiana las cuales son *S. nematodiphila* DZ0503SBS1 (5 especímenes) y *Serratia marcescens* NBRC 102204, las cuales tienen una actividad antimicrobiana contra bacterias ESKAPEsPS y potencialmente podrían utilizarse sus antibióticos en un futuro para el tratamiento de infecciones bacterianas. Los solventes orgánicos utilizados, el método de extracción de metabolitos y su aplicación son adecuados para determinar el efecto antimicrobiano de la colección de bacterias analizadas. Los EO extraídos de los aislados M2AN18-1 y M3LB50-2 mostraron una acción antifúngica contra *S. cerevisiae* y *C. albicans* por lo que también podría tener una aplicación en el tratamiento de micosis. Los EO utilizados en combinación no mostraron un efecto aditivo para controlar el crecimiento de levaduras.

10. Perspectivas

Determinar la efectividad de los EO obtenidos en otras bacterias ESKAPEsPS o incluso probarse en alguna bacteria con RA o multiresistente para conocer más sobre su potencial en el tratamiento de infecciones bacterianas.

Amplificar, secuenciar y hacer predicciones de sus CGB para conocer los genes involucrados en la síntesis de los compuestos antimicrobianos extraídos y comparar con los CGB de otras especies de *Serratias*.

Realizar la caracterización por técnicas analíticas como lo es el HPLC, para conocer que metabolitos secundarios están presentes en el EO y conocer su estructura molecular. Además de analizar las moléculas para predecir sus propiedades farmacológicas y conocer al menos de manera *in-silico* que efectos podrían tener en algunos modelos animales o en el humano.

Incrementar la cantidad de antibiótico utilizada para determinar un mayor efecto en bacterias y/o levaduras.

Analizar diferentes condiciones de cultivo para promover la mayor producción de metabolitos que ejerzan actividad antifúngica.

Dado a el sitio en el cual se aislaron las bacterias, su potencial antimicrobiano y lo descrito en la literatura sobre las cepas de *Serratias* aisladas de suelo y más específico de las milpas es importante investigar el potencial de estas bacterias para el biocontrol de patógenos y como promotoras del crecimiento en planta

11. Literatura citada

Aguirre-von-Wobeser, Eneas, Jorge Rocha-Estrada, Lori R. Shapiro, and Mayra de la Torre. 2018. "Enrichment of verrucomicrobia, actinobacteria and burkholderiales drives selection of bacterial community from soil by maize roots in a traditional milpa agroecosystem" ed. Lorenzo Brusetti. PLOS ONE 13(12): e0208852.

Akrami, Fariba, Mahdi Rajabnia, and Iman VazifeSizari. 2019. "Resistance integrons. mini review." Caspian Journal of Internal Medicine 10(4). <https://doi.org/10.22088/cjim.10.4.370>.

Babakhani, Sajad, and Mana Oloomi. 2018. "Transposons: the agents of antibiotic resistance in bacteria." Journal of Basic Microbiology 58(11): 905–17.

Baptista Pedro V., McCusker Matthew P., Carvalho A., Ferreira Daniela A., Mohan Niamh M., Martins M., Fernandes Alexandra R. 2018. "Nano-strategies to fight multidrug resistant bacteria battle of the titans." Frontiers in Microbiology 9: 1441.

Basharat Zarrin., Tanveer Faouzia., Yasmin Azra., Shinwari Zabta K., He Tongtong., Tong Yigang. 2018. "Genome of Serratia Nematodiphila MB307 Offers Unique Insights into Its Diverse Traits" ed. W. Hao. Genome 61(7): 469–76.

Bello-López, Juan Manuel, Jorge Noguerón-Silva, Jorge Ismael Castañeda-Sánchez, and Julieta Rojo-Medina. 2015. "Molecular Characterization of Microbial Contaminants Isolated from Umbilical Cord Blood Units for Transplant." The Brazilian Journal of Infectious Diseases 19(6): 571–77.

Blair, Jessica M., Webber Mark A., Baylay David O., Piddock, Laura J.V. 2015. "Molecular mechanisms of antibiotic resistance." Nature Reviews Microbiology 13(1): 42–51.

Blaskovich Mark A T, Mark S Butler, and Matthew A Cooper. 2017. "Polishing the tarnished silver bullet: the quest for new antibiotics." Essays in biochemistry 61(1): 103–14.

Brenner Don J., Krieg, Noel R., and Staley James T. 2005. 2 BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology, Volume Two The Proteobacteria. Second edition. United States of America: Springer International Publishing.

Cabrera, R., García-López H., Aguirre-von-Wobeser E., Orozco-Avitia J.A., Gutiérrez-Saldaña A.H. 2020. "Amycolatopsis BX17: an actinobacterial strain isolated from soil of a traditional milpa agroecosystem with potential biocontrol against fusarium graminearum." Biological Control 147: 104285.

Canizalez-Roman A., Velazquez-Roman J., Valdez-Flores M.A., Flores-Villaseñor H., Vidal J.E., Muro-Amador S., Guadrón-Llanos A.M., Gonzales-Nuñez E., Medina-Serrano J., Tapia-Pastrana G., León-Sicairos N. 2019. "Detection of antimicrobial-resistance diarrheagenic escherichia coli strains in surface water used to irrigate food products in the northwest of Mexico." *International Journal of Food Microbiology* 304: 1–10.

Castañeda-Ruelas, Gloria Marisol, and Maribel Jiménez-Edeza. 2018. "Evaluación de ríos del valle de Culiacán, México, como reservorios de serotipos de salmonella resistentes a antibióticos." *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 34(2): 191–201.

Caulier S., Nannan C., Gillis A., Licciardi F., Bragard C., Mahillon J. 2019. "Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the bacillus subtilis group." *Frontiers in Microbiology* 10: 302.

Center for Disease Control and Prevention (2019). Sitio web oficial: www.cdc.gov. Sitio web consultado: www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf. Antibiotic Resistance Threats in the United States. Consultado el 15 de diciembre del 2021.

Chanhasena, Panjamaphon, and Nawarat Nantapong. 2016. "Antimicrobial activity of streptomyces sp. Pj90 isolated from soil in northeast Thailand." *Jurnal Teknologi* 78(5–5). <https://journals.utm.my/index.php/jurnalteknologi/article/view/8574>.

Chávez-Ramírez B., Kerber-Díaz J.C., Acotzi-Conde M.C., Ibarra J.A., Vásquez-Murrieta M.S., Estrada-de los Santos P. 2020. "Inhibition of rhizoctonia solani rhch-14 and pythium ultimum pyfr-14 by paenibacillus polymyxa nma1017 and burkholderia cenocepacia cacua-24: a proposal for biocontrol of phytopathogenic fungi." *Microbiological Research* 230: 126347.

Chiang Yin Ning, José R. Penadés, and John Chen. 2019. "Genetic transduction by phages and chromosomal islands: the new and noncanonical" ed. Kimberly A. Kline. *PLOS Pathogens* 15(8): e1007878.

Cole, M. 1982. "Biochemistry and action of clavulanic acid." *Scottish Medical Journal* 27(1_suppl): S10–16.

Davies, J., Davies, D. 2010. "Origins and Evolution of Antibiotic resistance." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74(3): 417–33.

Davis, Kathryn E. R., Shayne J. Joseph, and Peter H. Janssen. 2005. "Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria." *Applied and Environmental Microbiology* 71(2): 826–34.

D'Costa, Vanessa M. et al. 2011. "Antibiotic resistance is ancient." *Nature* 477(7365): 457–61.

Diario oficial de la federación (2018). Acuerdo por el que se declara la obligatoriedad de la Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos.

Du D., Wang-Kan X., Neuberger A., Van Veen H.W., Pos K.M., Piddock L.J., Luisi B.F. 2018. "Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation." *Nature Reviews Microbiology* 16(9): 523–39.

Durand G., Raoult D., Dubourg. 2019. "Antibiotic discovery: history, methods and perspectives." *International Journal of Antimicrobial Agents* 53(4): 371–82.

Durão, Paulo, Roberto Balbontín, and Isabel Gordo. 2018. "Evolutionary mechanisms shaping the maintenance of antibiotic resistance." *Trends in Microbiology* 26(8): 677–91.

Fatiah, R, I Sulianyah, D H Tjong, and J Jamsari. 2021. "Comparative genomic of biosynthetic gene cluster of andrimid antibiotic from *serratia plymuthica* ubcf_13." *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 741(1): 012037.

Fineran P.C., Slater H., Everson L., Hughes K., Salmond G.C. 2005. "Biosynthesis of Tripyrrole and β -Lactam Secondary Metabolites in *Serratia*: Integration of Quorum Sensing with Multiple New Regulatory Components in the Control of Prodigiosin and Carbapenem Antibiotic Production." *Molecular Microbiology* 56(6): 1495–1517.

Fleming A. 1945. Nobel Lecture: Penicillin.

García A., Martínez C, Isela-Juárez R., Téllez R., Paredes M.A., Herrera M., Giono S. 2019. "Resistencia a la metilina y producción de biopelícula en aislamientos clínicos de *staphylococcus aureus* y *staphylococcus coagulasa* negativa en México." *Biomédica* 39(3): 513–23.

Garza-González, Elvira et al. 2019. "A snapshot of antimicrobial resistance in Mexico. results from 47 centers from 20 states during a six-month period" ed. William M Shafer. *PLOS ONE* 14(3): e0209865.

- Ghafourian Sobhan, Sadeghifard Nourkhoda, Soheili Sara, and Sekawi Zamberi. 2015. "Extended spectrum beta-lactamases: definition, classification and epidemiology." *Current Issues in Molecular Biology*. <https://www.caister.com/cimb/abstracts/v17/11.html>.
- Gondil, Vijay Singh, Mohammad Asif, and Tek Chand Bhalla. 2017. "Optimization of Physicochemical Parameters Influencing the Production of Prodigiosin from *Serratia Nematodiphila* RL2 and Exploring Its Antibacterial Activity." *3 Biotech* 7(5): 338.
- Gutiérrez-Jiménez J., Mendoza-Orozco M.I., Vicente-Serrano A., Luna-Cazás M., Feliciano-Guzmán J.M., Girón-Hernández J.A., Vidal J.E. 2018. "Virulence genes and resistance to antibiotics of beta-hemolytic streptococci isolated from children in Chiapas, Mexico." *The Journal of Infection in Developing Countries* 12(02): 80–88.
- Hernandez, Simon et al. 2019. *Tiny earth, a research guide to studentsourcing antibiotic discovery*. second. United States of America.
- Hughes, Diarmaid, and Dan I. Andersson. 2017. "Evolutionary trajectories to antibiotic resistance." *Annual Review of Microbiology* 71(1): 579–96.
- Isaías-Camacho, Jorge O, Erika Salinas-Lezama, Federico Leopoldo Rodríguez-Weber, and Enrique Díaz-Greene. 2018. "Prescripción racional de antibióticos: una conducta urgente." *Medicina Interna de México*: 9.
- Islam R., Jeong Y.T., Ryu Y.J., Song C.H., Lee Y.S. 2009. "Isolation, identification and optimal culture conditions of *Streptomyces albidoflavus* c247 producing antifungal agents against *Rhizoctonia solani* ag2-2." *Mycobiology* 37(2): 114–20.
- Ji, Keunho, and Young Tae Kim. 2019. "Antimicrobial activity of prodigiosin from *Serratia* sp. pdgs120915 against intestinal pathogenic bacteria." *Microbiology and Biotechnology Letters* 47(3): 459–64.
- John Jimtha C, Pishma P., Sreelekha S., Chitra S., Radhakrishnan E.K. 2017. "Antifungal properties of prodigiosin producing rhizospheric *Serratia* sp." *Rhizosphere* 3: 105–8.
- Kwak Yunyoung, Abdur Rahim Khan, and Jae-Ho Shin. 2015. "Genome Sequence of *Serratia Nematodiphila* DSM 21420T, a Symbiotic Bacterium from Entomopathogenic Nematode." *Journal of Biotechnology* 193: 1–2.

Kurm Viola, Wim H. van der Putten, and W. H. Gera Hol. 2019. "Cultivation-success of rare soil bacteria is not influenced by incubation time and growth medium" ed. Hauke Smidt. PLOS ONE 14(1): e0210073.

Lertcanawanichakul, Monthon, Kanchanat Pondet, and Jutaporn Kwantep. 2015. "In vitro antimicrobial and antioxidant activities of bioactive compounds (secondary metabolites) extracted from streptomyces lydicus a2." Journal of Applied Pharmaceutical Science: 017–021.

Lewis, Kim. 2013. "Platforms for antibiotic discovery." Nature Reviews Drug Discovery 12(5): 371–87.

Livermore David M. 2021. "Antibiotic Resistance during and beyond COVID-19." JAC-Antimicrobial Resistance 3(Supplement_1): i5–16.

Mai AL-Ghanem. 2018. "Serratia a novel source of secondary metabolites." Advances in Biotechnology & Microbiology 11(3). <https://juniperpublishers.com/aibm/AIBM.MS.ID.555814.php>.

Ma Liping, Li An-dong, Yin Xiao-Le, and Zhang Tong. 2017. "The prevalence of integrons as the carrier of antibiotic resistance genes in natural and man-made environments." Environmental Science: 29.

Ma, Stefanie, Ye Xu, and Justin R. Nodwell. 2014. "The expression of antibiotic resistance genes in antibiotic-producing bacteria: antibiotic resistance in antibiotic-producing bacteria." Molecular Microbiology 93(3): 391–402.

Marques-Pereira Catarina, Diogo Neves Proença, and Paula V. Morais. 2020. "Genome sequences of serratia strains revealed common genes in both serratomolides gene clusters." Biology 9(12): 482.

Martínez-Medina R.M., Montalvo-Sandoval F.D., Magaña-Aquino M., Terán-Figueroa Y., Pérez-Urizar J.T. 2020. "Prevalencia y caracterización genotípica de cepas de staphylococcus aureus resistente a meticilina aisladas en un hospital regional mexicano." Revista chilena de infectología 37(1): 37–44.

Matteoli F.P., Passarelli-Araujo H., Reis J.A., O da Rocha L., Souza E.M., Aravind L., Olivares F.L., Venancio T.M. 2018. "Genome sequencing and assessment of plant growth-promoting properties of a serratia marcescens strain isolated from vermicompost." BMC Genomics 19(1): 750.

Mingmongkolchai S., and W. Panbangred. 2018. "Bacillus probiotics: an alternative to antibiotics for livestock production." Journal of Applied Microbiology 124(6): 1334–46.

Mohamed H., Miloud B., Zohra F., García-Arenzana J.M., Veloso A., Rodríguez-Couto S.R. 2017. "Isolation and characterisation of actinobacteria from algerian sahara soils with antimicrobial activities." *International Journal of Molecular and Cellular Medicine* 6(2). <https://doi.org/10.22088/acadpub.BUMS.6.2.5>.

Moreno-Espíndola, Iván P. et al. 2018. "The bacterial community structure and microbial activity in a traditional organic milpa farming system under different soil moisture conditions." *Frontiers in Microbiology* 9: 2737.

Murdoch S.L., Trunk K., English G., Fritsch M.J., Pourkarimi E., Coulthrust S.J. 2011. "The opportunistic pathogen *Serratia marcescens* utilizes type VI secretion to target bacterial competitors." *Journal of Bacteriology* 193(21): 6057–69.

Naveed M., Chaudhry Z., Bukhari S.A., Meer B., Ashraf H. 2020. "Antibiotics resistance mechanism." In *Antibiotics and Antimicrobial Resistance Genes in the Environment*, Elsevier, 292–312. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012818882800019X>.

Olaitan, Abiola Olumuyiwa, and Jean-Marc Rolain. 2016. "Ancient resistome." In *Paleomicrobiology of Humans*, eds. Michel Drancourt and Didier Raoult. Washington, DC, USA: ASM Press, 75–80. <http://doi.wiley.com/10.1128/9781555819170.ch8>.

Palacios O.A., Contreras C.A., Muñoz-Castellanos L.N., González-Rangel M.O., Rubio-Arias H., Palacios-Espinosa A., Nevárez-Moorillón G.V. 2017. "Monitoring of indicator and multidrug resistant bacteria in agricultural soils under different irrigation patterns." *Agricultural Water Management* 184: 19–27.

Panjiar N., Mattam A.J., Jose S., Gadham S., Velankar H.R. 2020. "Valorization of xylose-rich hydrolysate from rice straw, an agroresidue, through biosurfactant production by the soil bacterium *Serratia nematodiphila*." *Science of The Total Environment* 729: 138933.

Pavlova, Anna, Jerry M. Parks, Adegboyega K. Oyelere, and James C. Gumbart. 2017. "Toward the rational design of macrolide antibiotics to combat resistance." *Chemical Biology & Drug Design* 90(5): 641–52.

Pećanac, Marija et al. 2013. "Burns treatment in ancient times." *Medicinski pregljed* 66: 263–67.

Perry Julie, Nicholas Waglechner, and Gerard Wright. 2016. "The prehistory of antibiotic resistance." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 6(6): a025197.

- Peterson, Elizabeth, and Parjit Kaur. 2018. "Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens." *Frontiers in Microbiology* 9: 2928.
- Pham, Van H.T., and Jaisoo Kim. 2012. "Cultivation of unculturable soil bacteria." *Trends in Biotechnology* 30(9): 475–84.
- Pore, Tejasvini S., Khanolkar, Ashwini B., and Nadaf, Naiem H. 2016. "Production, purification, identification of prodigiosin from *serratia* sp. and its antimicrobial activity." *Research Journal of Life Sciences, Bioinformatics, Pharmaceutical and Chemical Sciences* 1(6).
- Rodríguez-Rubio L., Gutiérrez D., Donovan D.M., Martínez B., Rodríguez A., García P. 2015. "Phage lytic proteins: biotechnological applications beyond clinical antimicrobials." *Critical Reviews in Biotechnology*: 1–11.
- Romero-Salas E.A., Navarro-Noya Y.E., Luna-Guido M., Verhulst N., Crossa J., Govaerts B., Dendooven L. 2021. "Changes in the bacterial community structure in soil under conventional and conservation practices throughout a complete maize (*zea mays* l.) crop cycle." *Applied Soil Ecology* 157: 103733.
- Sandner-Miranda, Luisa, Pablo Vinuesa, Alejandro Cravioto, and Rosario Morales-Espinosa. 2018. "The genomic basis of intrinsic and acquired antibiotic resistance in the genus *serratia*." *Frontiers in Microbiology* 9: 828.
- Schooley, Robert T. et al. 2017. "Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant *acinetobacter baumannii* infection." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61(10). <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.00954-17>.
- Sengupta, Saswati, Madhab K. Chattopadhyay, and Hans-Peter Grossart. 2013. "The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature." *Frontiers in Microbiology* 4. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2013.00047/abstract>.
- Sethi, Sonia, Kumar, Ravi, and Gupta, Saksham. 2013. "Antibiotic production by microbes isolated from soil." *International journal of pharmaceutical sciences and research* 4(8).
- Shanks R., Stella N., Lahr R., Wang S., Veverka T., Kowalski R., Liu X. 2012. Serratamolide is a Hemolytic Factor Produced by *Serratia marcescens*. *PLoS ONE* 7(5). doi:10.1371/journal.pone.0036398.




- Snyder, L.R. 1974. "Classification of the Solvent Properties of Common Liquids." *Journal of Chromatography A* 92(2): 223–30.
- Soenens, Amalia, and Juan Imperial. 2020. "Biocontrol capabilities of the genus *serratia*." *Phytochemistry Reviews* 19(3): 577–87.
- Stuart, Levy. 1982. "Microbial resistance to antibiotics an evolving and persistent problem." *The lancet*: 83–88.
- Sultan I., Rahman S., Jan A.T., Siddiqui M.T., Mondal A.H., Haq Q.M. 2018. "Antibiotics, resistome and resistance mechanisms: a bacterial perspective." *Frontiers in Microbiology* 9: 2066.
- Tan L., Li L., Ashbolt N., Wang X., Cui Y., Zhu X., Xu Y., Yang Y., Mao D., Luo Y. 2018. "Arctic antibiotic resistance gene contamination, a result of anthropogenic activities and natural origin." *Science of The Total Environment* 621: 1176–84.
- Torres-Cortés G., Millán V., Ramírez-Saad H.C., Nisa-Martínez R., Toro N., Martínez-Abarca F. 2011. "Characterization of novel antibiotic resistance genes identified by functional metagenomics on soil samples: novel antibiotic resistance genes from soil metagenome." *Environmental Microbiology* 13(4): 1101–14.
- Tran P.N., Yen M. Chiang C.Y., Lin H., Chen P. 2019. "Detecting and prioritizing biosynthetic gene clusters for bioactive compounds in bacteria and fungi." *Applied Microbiology and Biotechnology* 103(8): 3277–87.
- Tyc O., Song C., Dickschat J.S., Vos M., Garbeva P. 2017. "The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria." *Trends in Microbiology* 25(4): 280–92.
- Vartoukian Sonia R., Richard M. Palmer, and William G. Wade. 2010. "Strategies for culture of 'unculturable' bacteria: culturing the unculturable." *FEMS Microbiology Letters*.
- Velázquez-Acosta Consuelo, Patricia Cornejo-Juárez and Patricia Volkow-Fernández. 2018. "Cepas e-escape multidrogorresistentes aisladas en hemocultivos de pacientes con cáncer." *Salud Pública de México* 60(2,mar-abr): 151.
- Ventola C Lee. 2015. "The antibiotic resistance crisis." *A peer-reviewed Journal for Managed Care and Hospital Formulary Management*, 7.
- Waksman Selman. 1945. "Microbial antagonisms and antibiotic substances." *American Journal of Public Health and the Nations Health* 35(8): 868–69.

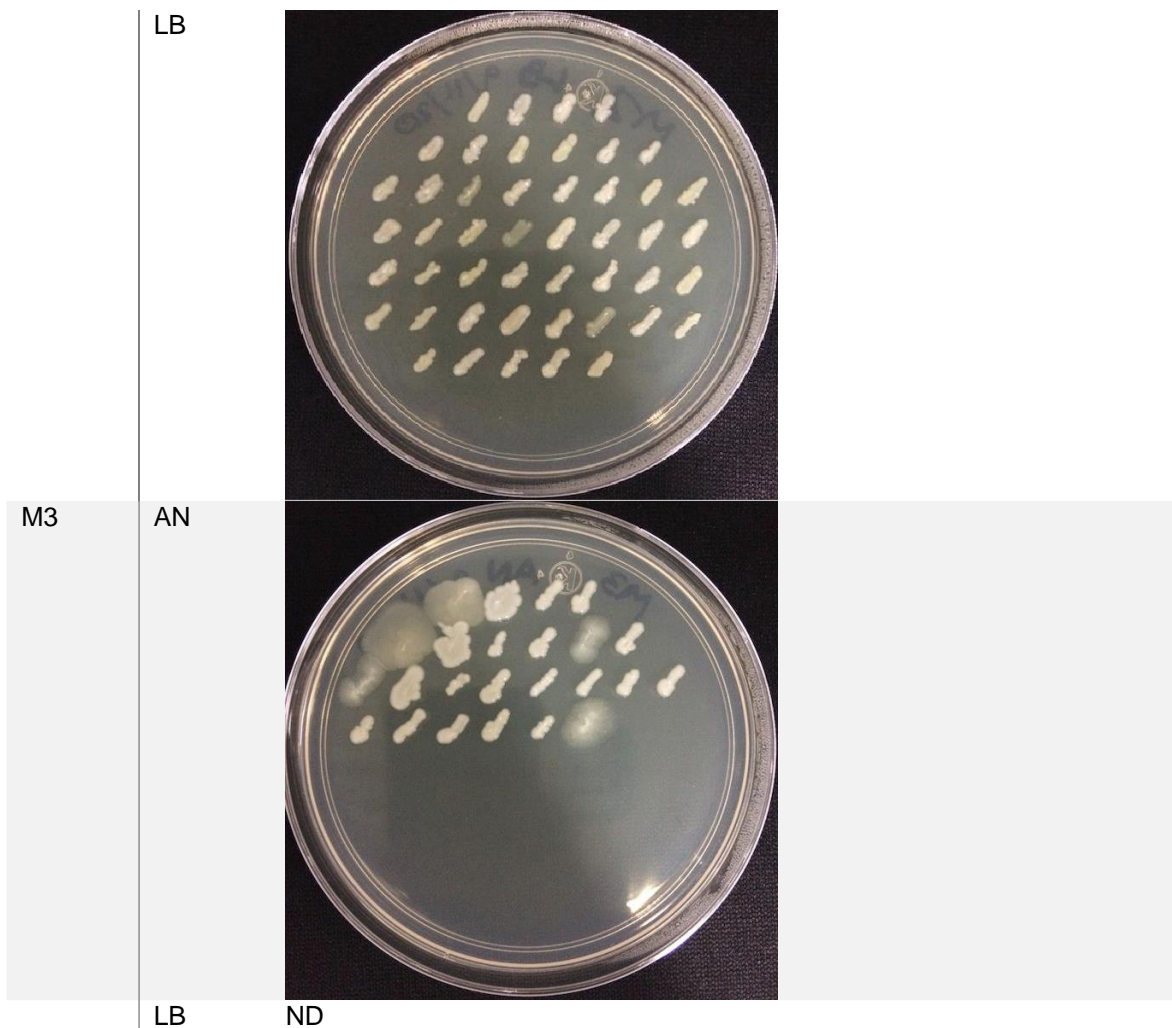
Williston Elizabeth H., Pari Zia-Walrath, and Guy P. Youmans. 1947. "Plate methods for testing antibiotic activity of actinomycetes against virulent human type tubercle bacilli." *Journal of Bacteriology* 54(5): 563–68.

Zhang Xi-Feng, Zhi-Guo Liu, Wei Shen, and Sangiliyandi Gurunathan. 2016. "Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches." *International Journal of Molecular Sciences* 17(9): 1534.

12. Anexos

Anexo 1. Fotografía de los aislados obtenidos en los medios agar LB y agar nutritivo.

Muestra	Medio	Imagen
M1	AN	
	LB	
M2	AN	



Anexo 2. Listado de bacterias con actividad antimicrobiana aisladas

Muestra	Medio de cultivo en el que se aisló	Nombre asignado
M1	AN	M1AN17
		M1AN21
	LB	M1LB7
		M1LB8
		M1LB9
		M1LB16
		M1LB17
		M1LB20
		M1LB23
		M1LB27
		M1LB38
		M1LB39
		M1LB40
		M1LB41
M1LB43		
M1LB45		
M1LB47		
M1LB49		
M2	AN	M2AN2
		M2AN3
		M2AN4
		M2AN5
		M2AN8
		M2AN9

		M2AN18
		M2AN22
		M2AN28
	LB	M2LB2
		M2LB3
		M2LB4
		M2LB5
		M2LB6
		M2LB10
		M2LB11
		M2LB12
		M2LB13
		M2LB14
		M2LB15
		M2LB16
		M2LB19
		M2LB25
		M2LB27
		M2LB29
		M2LB30
		M2LB32
		M2LB33
		M2LB36
		M2LB39
		M2LB40
		M2LB41
		M2LB43
		M2LB44
		M2LB45
		M2LB46
		M2LB47
		M2LB48
M3	AN	M3AN6
		M3AN7
		M3AN10
		M3AN19
		M3AN20
		M3AN21
		M3AN23
	LB	M3LB2
		M3LB3
		M3LB4
		M3LB5
		M3LB9
		M3LB10
		M3LB11
		M3LB15
		M3LB16
		M3LB17
		M3LB20
		M3LB22
		M3LB23
		M3LB24
		M3LB25
		M3LB26
		M3LB27
		M3LB28
		M3LB29
		M3LB32
		M3LB33

	M3LB34
	M3LB35
	M3LB36
	M3LB37
	M3LB38
	M3LB40
	M3LB42
	M3LB43
	M3LB44
	M3LB45
	M3LB46
	M3LB48
	M3LB49
	M3LB50

Anexo 3. Resultados completos del experimento de inhibición por estría cruzada

Aislado	<i>E. aerogenes</i>	<i>P. putida</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>
M1AN17			x			
M1AN21			x			
M1LB7	x		x	x		x
M1LB8			x			
M1LB9			x			
M1LB16		x			x	
M1LB17			x		x	x
M1LB20			x		x	x
M1LB23			x			x
M1LB27			x		x	x
M1LB38	x		x		x	x
M1LB39	x					
M1LB40	x	x	x			x
M1LB41	x					
M1LB43					x	
M1LB45	x					x
M1LB47					x	
M1LB49						x
M2AN2			x	x		
M2AN3		x	x			
M2AN4			x			
M2AN5			x			
M2AN8			x			
M2AN9			x			
M2AN18		x			x	x
M2AN22					x	
M2AN28	x	x				x
M2LB2	x			x		
M2LB3	x			x		
M2LB4	x			x	x	

M2LB5		x		x	
M2LB6	x			x	
M2LB10		x			
M2LB11		x			x
M2LB12		x			
M2LB13	x	x		x	
M2LB14		x			
M2LB15	x	x			
M2LB16	x	x		x	x
M2LB19		x			
M2LB25				x	
M2LB27				x	
M2LB29	x				
M2LB30				x	x
M2LB32				x	x
M2LB33				x	x
M2LB36	x				
M2LB39	x				x
M2LB40				x	
M2LB41		x			
M2LB43	x				
M2LB44				x	
M2LB45				x	
M2LB46				x	
M2LB47					x
M2LB48					x
M3AN6				x	
M3AN7				x	x
M3AN10					x
M3AN19		x		x	
M3AN20		x	x		
M3AN21		x			
M3AN23			x		
M3LB2		x		x	
M3LB3				x	
M3LB4		x		x	x
M3LB5				x	
M3LB9		x		x	
M3LB10	x			x	x
M3LB11		x			
M3LB15				x	
M3LB16		x		x	
M3LB17				x	


M3LB20				x		
M3LB22				x		
M3LB23				x		
M3LB24				x		
M3LB25				x		
M3LB26				x	x	
M3LB27					x	
M3LB28					x	
M3LB29					x	
M3LB32	x	x		x		
M3LB33		x		x		
M3LB34				x		x
M3LB35				x		
M3LB36				x		
M3LB37				x		
M3LB38				x	x	
M3LB40	x					x
M3LB42	x			x		x
M3LB43	x	x		x		
M3LB44	x		x			x
M3LB45	x	x		x		
M3LB46		x				
M3LB48					x	
M3LB49					x	
M3LB50	x	x				x

Anexo 4. Resultados completos del experimento de inhibición por Patch-Patch.

Aislado	<i>E. aerogenes</i>	<i>P. putida</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>
M2AN18-1	X	X	X		X	
M2AN18-2	X	X	X		X	
M1LB7-1				X		
M1LB7-2				X		
M1LB17-1					X	X
M1LB17-2	X		X	X	X	
M1LB20-1						X
M1LB20-2	X					
M1LB27-1					X	
M1LB27-2						
M1LB40-1					X	X
M1LB40-2			X			
M1LB45-1	X	X				X
M1LB45-2						X
M2LB4-1			x			X
M2LB4-2						X

M2LB13-1	X			X	
M2LB13-2	X				
M2LB16-1	x			X	X
M2LB16-2	X			x	
M3LB4-1				x	X
M3LB4-2					x
M3LB10-1	x		X		
M3LB10-2	x		X		
M3LB32-1	x				X
M3LB32-2				X	x
M3LB34-1	X				
M3LB34-2	x	x			
M3LB44-1					X
M3LB44-2					x
M3LB50-1	X			x	X
M3LB50-2	x			X	x

Anexo 5. Fotografías de los resultados de la prueba de inhibición por estría cruzada

Muestra	Medio	Bacteria a inhibir	Imagen
M1	AN	<i>E. aerogenes</i>	
		<i>P. putida</i>	

S. aureus



B. subtilis



E. coli



S. epidermidis



LB

E. aerogenes



P. putida



S. aureus



B. subtilis



E. coli



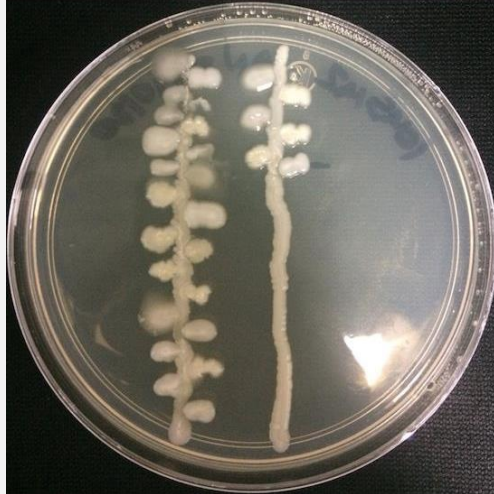
S. epidermidis



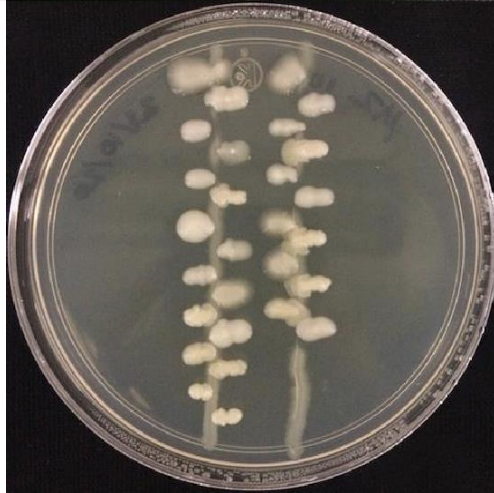
M2

AN

E. aerogenes



P. putida



S. aureus



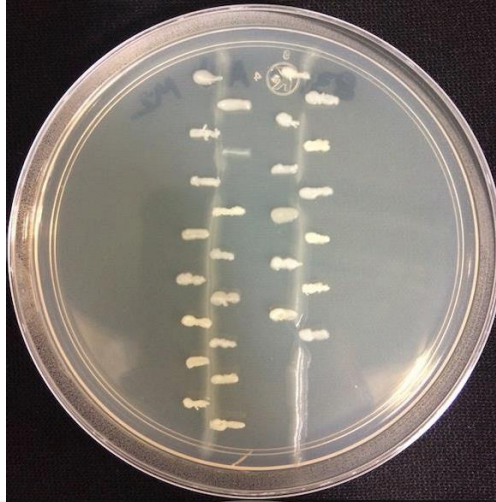
B. subtilis



E. coli



S. epidermidis

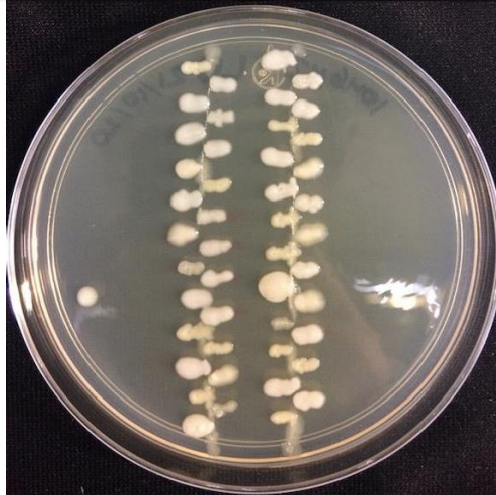


LB

E. aerogenes



P. putida



S. aureus



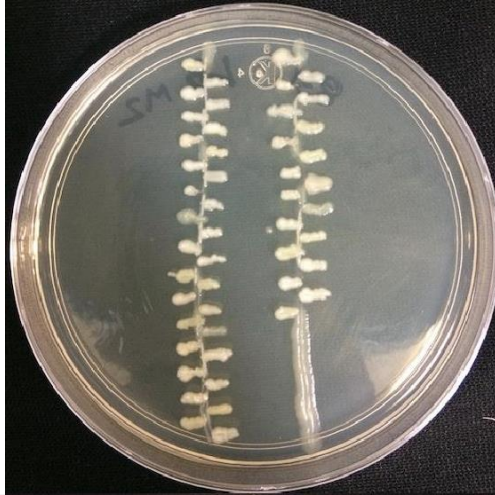
B. subtilis



E. coli



S. epidermidis



M3

AN

E. aerogenes



P. putida



S. aureus



B. subtilis



E. coli



S. epidermidis



LB

E. aerogenes



P. putida



S. aureus



B. subtilis



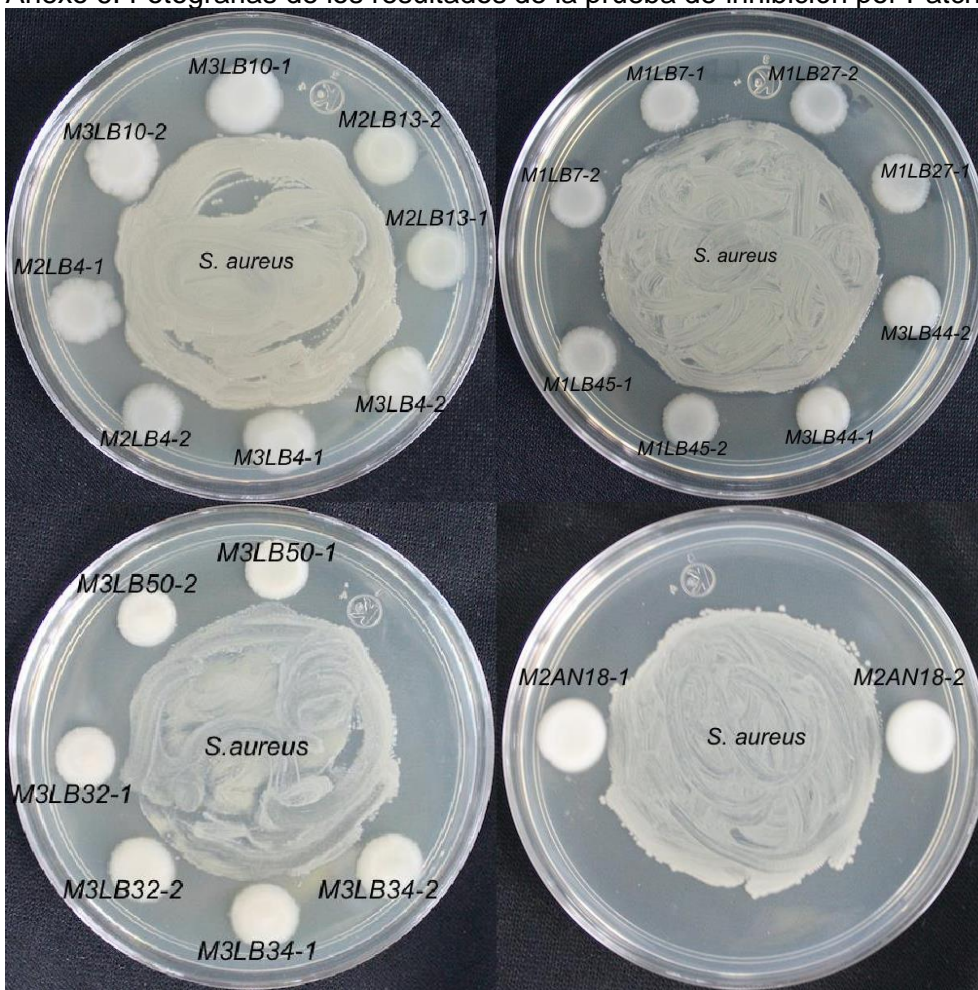
E. coli

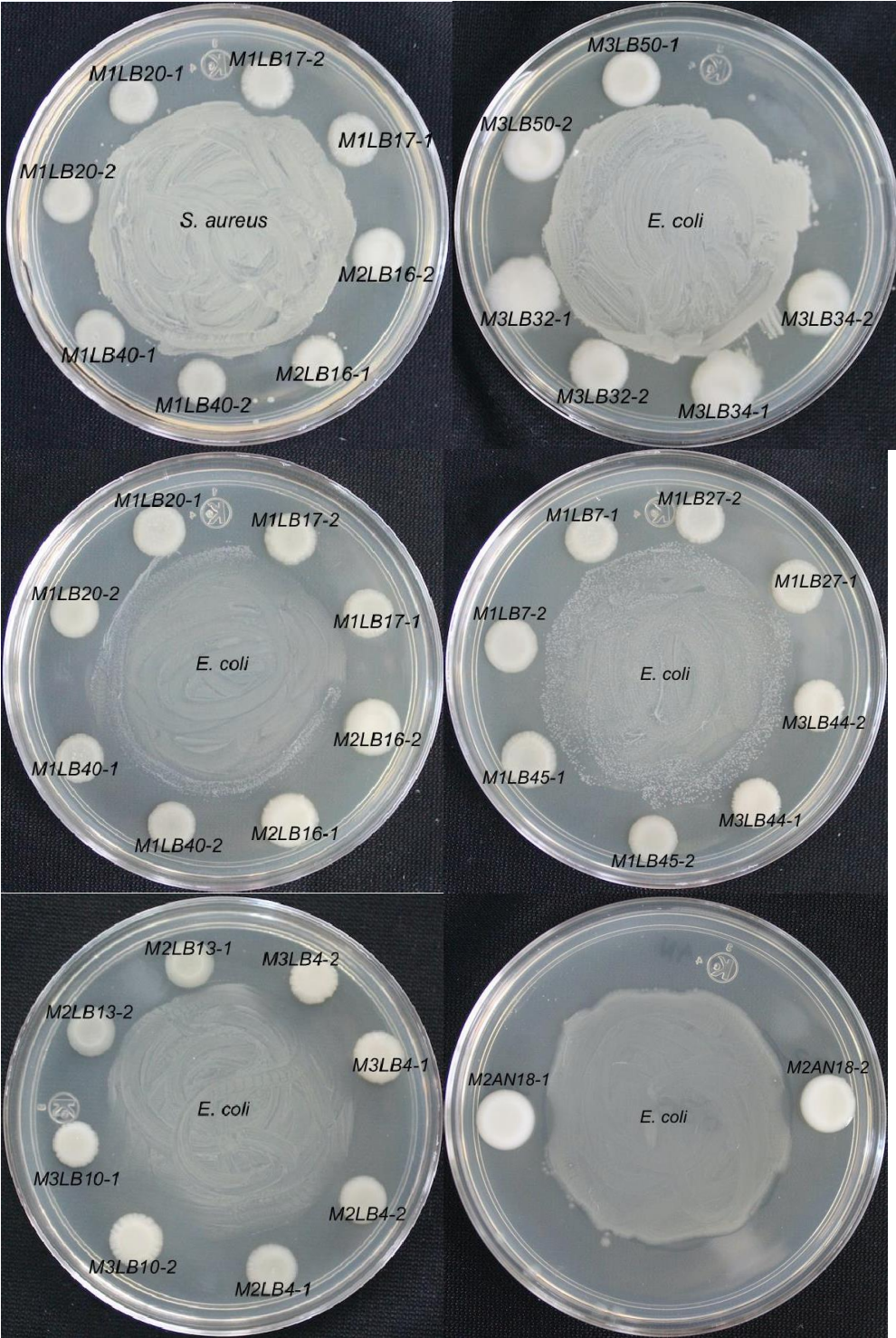


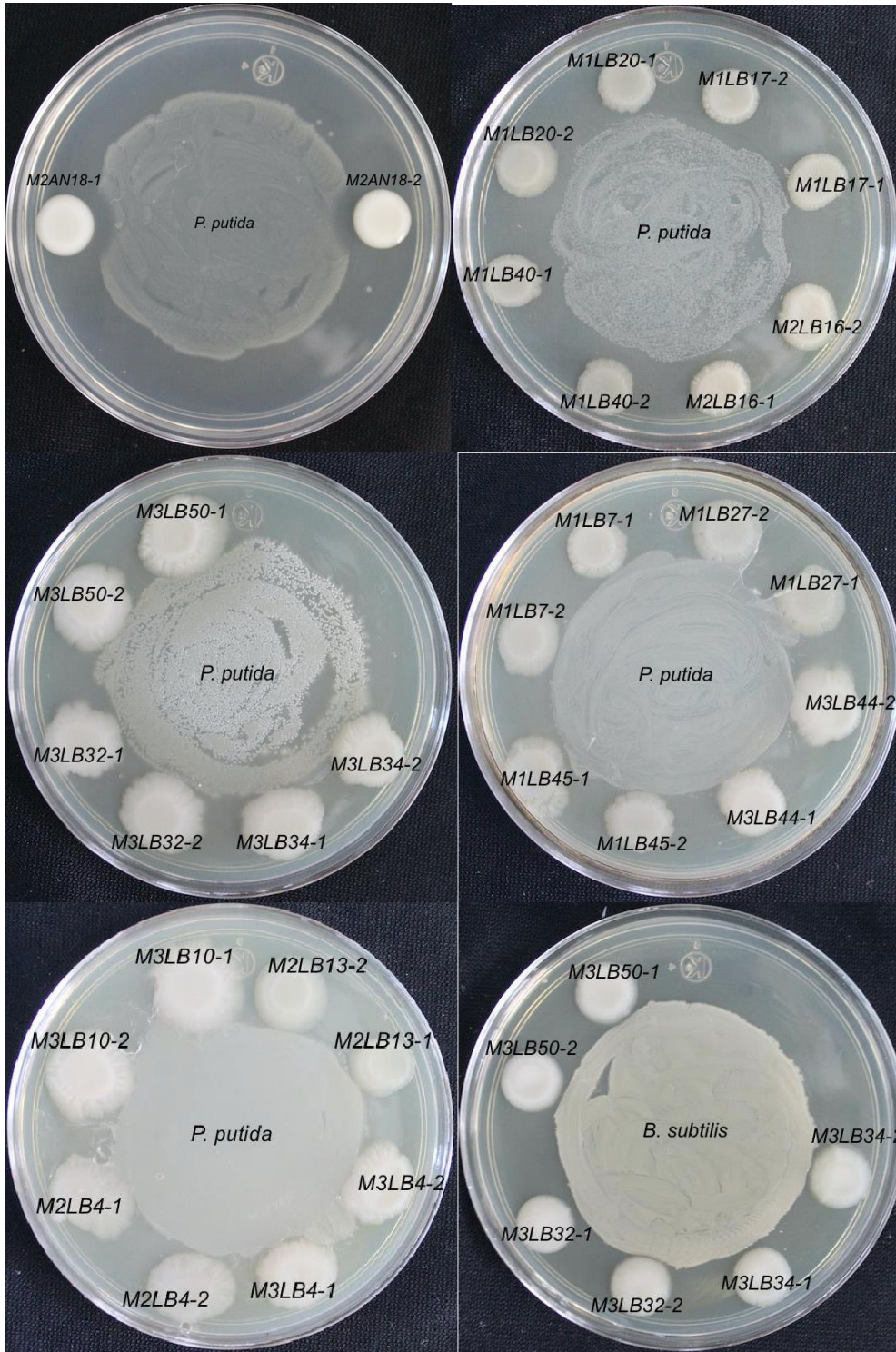
S. epidermidis

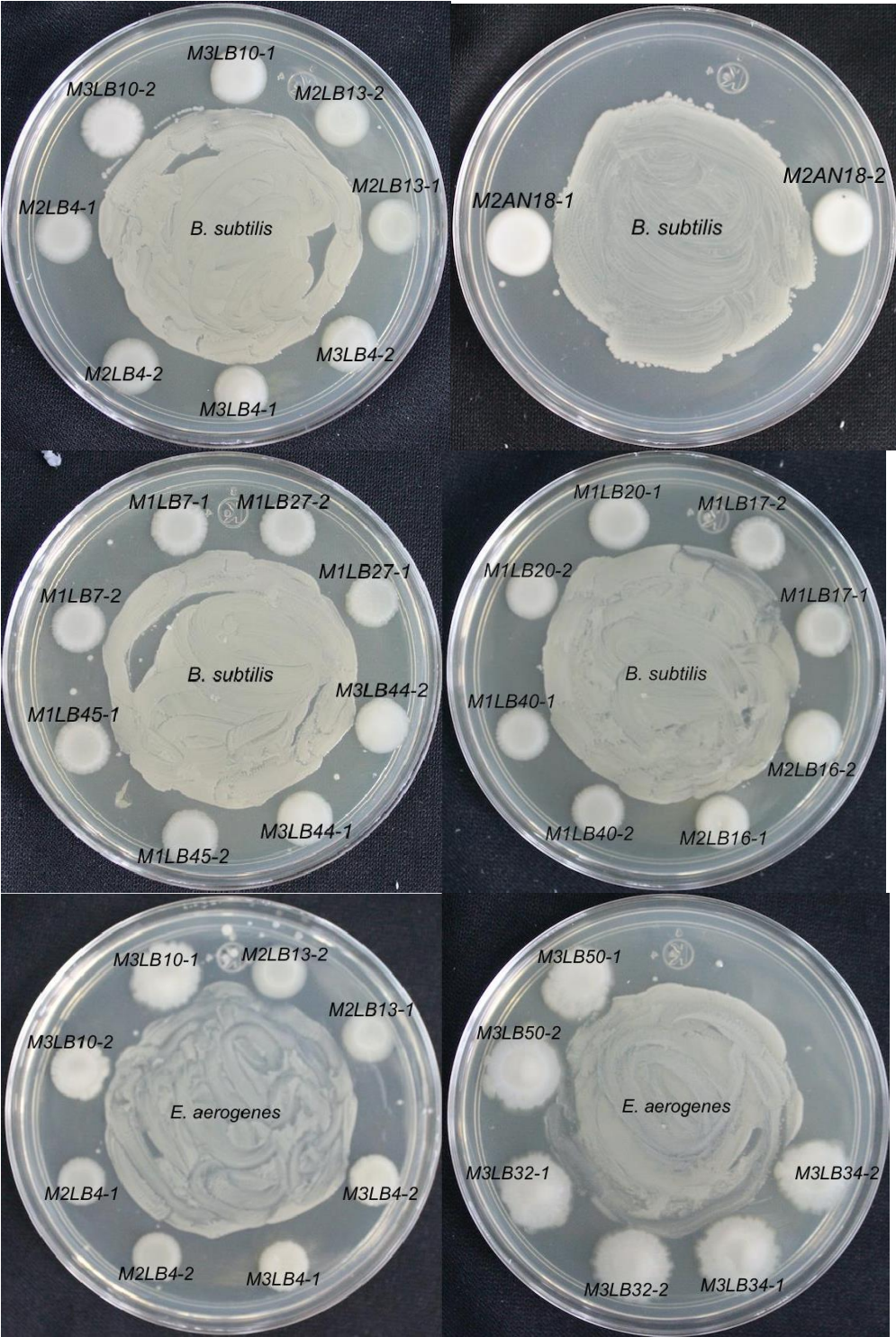


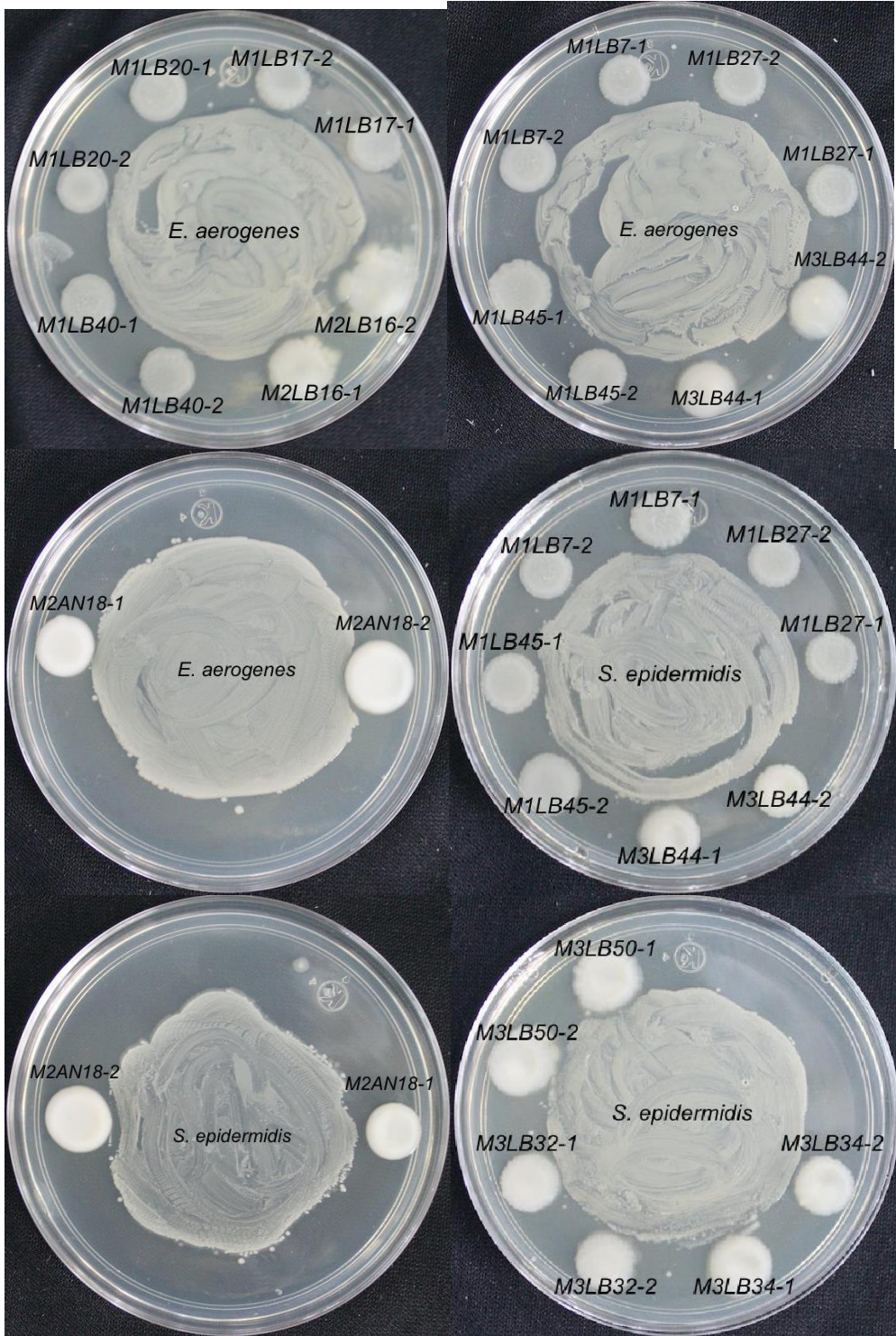
Anexo 6. Fotografías de los resultados de la prueba de inhibición por Patch-Patch









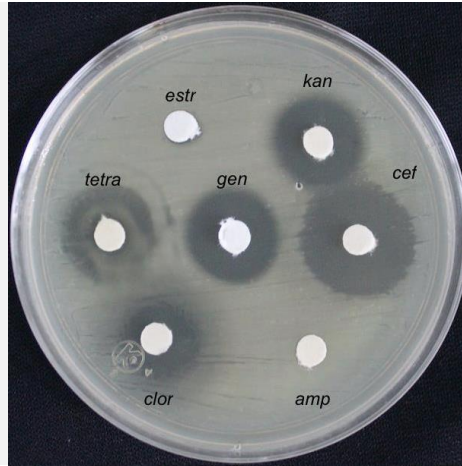




Anexo7. Fotografías de los antibiogramas a las siete bacterias seleccionadas
 Aislado Imagen

Aislado	Imagen	
M2AN18-1		
M2AN18-2		

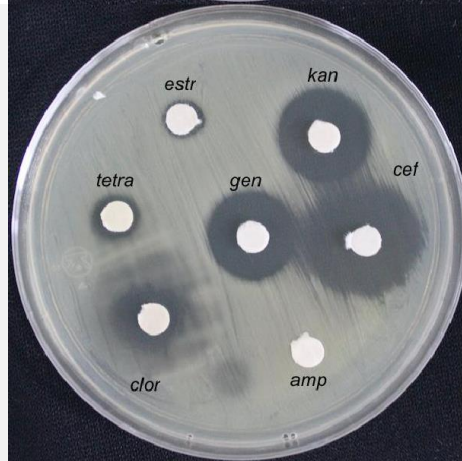
M1LB17-2



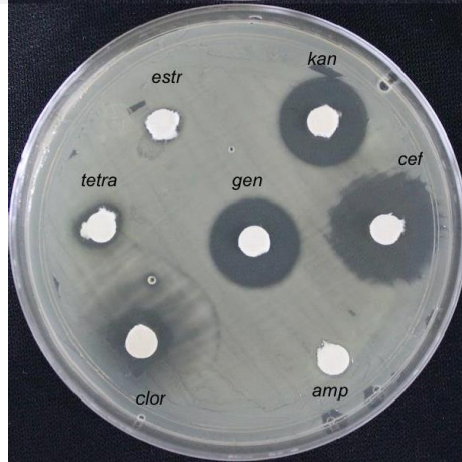
M1LB45-1



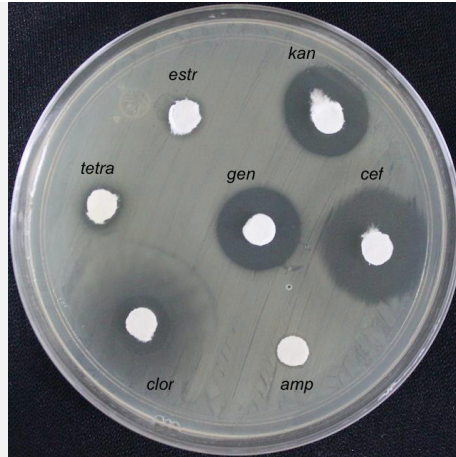
M2LB16-1



M3LB50-1



M3LB50-2



Estr= estreptomycin, kan= kanamicina, tetra= tetraciclina gen= gentamicina, cef= ceftriaxona, clor=cloranfenicol, amp= ampicilina.

Anexo 8. Cantidad de antibiótico obtenido con acetato de etilo y hexano

Solvente	Aislado	mg Obtenidos	µl de antibiótico
Acetato De Etilo	M2AN18-1	86.8	868
	M2AN18-2	109.2	1092
	M1LB17-2	118.6	1186
	M1LB45-1	136.8	1368
	M2LB16-1	30	300
	M3LB50-1	48.8	488
Hexano	M3LB50-2	146.8	1468
	M2AN18-1	52.8	528
	M2AN18-2	12.9	129
	M1LB17-2	17.2	172
	M1LB45-1	52.8	528
	M2LB16-1	36.4	364
	M3LB50-1	32.8	328
	M3LB50-2	48.4	484

Anexo 9. Resultados de la ANOVA del efecto antimicrobiano de los antibióticos extraídos

Tratamientos	Resumen de la anova			
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value Pr(>F)
<i>E. Coli</i> tratada con los antibióticos extraídos con acetato de etilo	ind	8 1.206e+13	1.508e+12	1872 1.42e-13 ***
	Residuals	9 7.250e+09	8.055e+08	
--- Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1				
<i>E. Coli</i> tratada con los antibióticos extraídos con hexano	ind	8 3.198e+13	3.997e+12	35.21 6.69e-06 ***
	Residuals	9 1.022e+12	1.135e+11	
--- Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1				
<i>S. Aureus</i> tratada con los antibióticos extraídos con acetato de etilo	ind	8 3.778e+13	4.723e+12	68.61 3.69e-07 ***
	Residuals	9 6.195e+11	6.884e+10	
--- Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1				
<i>S. Aureus</i> tratada con los antibióticos extraídos con hexano	ind	8 6.387e+13	7.984e+12	268.5 8.65e-10 ***
	Residuals	9 2.676e+11	2.973e+10	
--- Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1				

Anexo 10. Resultados de la prueba de TukeyHSD

Tratamientos

Resultado de la prueba estadística

E. Coli tratada con los antibióticos extraídos con acetato de etilo		Tukey multiple comparisons of means 95% family-wise confidence level			
Fit: aov(formula = values ~ ind, data = eAE)					
\$ind		diff	lwr	upr	p adj
Solvente-Control		-340000.0	-452278.24	-227721.76	0.0000159
M1LB45-1-Control		-2149990.7	-2262268.94	-2037712.46	0.0000000
M2LB16-1-Control		-2120500.0	-2232778.24	-2008221.76	0.0000000
M2AN18-1-Control		-2130000.0	-2242278.24	-2017721.76	0.0000000
M3LB50-1-Control		-2149949.4	-2262227.64	-2037671.16	0.0000000
M3LB50-2-Control		-2149995.4	-2262273.64	-2037717.16	0.0000000
M1LB17-2-Control		-2140500.0	-2252778.24	-2028221.76	0.0000000
M2AN18-2-Control		-2059500.0	-2171778.24	-1947221.76	0.0000000
M1LB45-1-Solvente		-1809990.7	-1922268.94	-1697712.46	0.0000000
M2LB16-1-Solvente		-1780500.0	-1892778.24	-1668221.76	0.0000000
M2AN18-1-Solvente		-1790000.0	-1902278.24	-1677721.76	0.0000000
M3LB50-1-Solvente		-1809949.4	-1922227.64	-1697671.16	0.0000000
M3LB50-2-Solvente		-1809995.4	-1922273.64	-1697717.16	0.0000000
M1LB17-2-Solvente		-1800500.0	-1912778.24	-1688221.76	0.0000000
M2AN18-2-Solvente		-1719500.0	-1831778.24	-1607221.76	0.0000000
M2LB16-1-M1LB45-1		29490.7	-82787.54	141768.94	0.9705634
M2AN18-1-M1LB45-1		19990.7	-92287.54	132268.94	0.9972991
M3LB50-1-M1LB45-1		41.3	-112236.94	112319.54	1.0000000
M3LB50-2-M1LB45-1		-4.7	-112282.94	112273.54	1.0000000
M1LB17-2-M1LB45-1		9490.7	-102787.54	121768.94	0.9999880
M2AN18-2-M1LB45-1		90490.7	-21787.54	202768.94	0.1413089
M2AN18-1-M2LB16-1		-9500.0	-121778.24	102778.24	0.9999879
M3LB50-1-M2LB16-1		-29449.4	-141727.64	82828.84	0.9707901
M3LB50-2-M2LB16-1		-29495.4	-141773.64	82782.84	0.9705375
M1LB17-2-M2LB16-1		-20000.0	-132278.24	92278.24	0.9972907
M2AN18-2-M2LB16-1		61000.0	-51278.24	173278.24	0.4985176
M3LB50-1-M2AN18-1		-19949.4	-132227.64	92328.84	0.9973362
M3LB50-2-M2AN18-1		-19995.4	-132273.64	92282.84	0.9972949
M1LB17-2-M2AN18-1		-10500.0	-122778.24	101778.24	0.9999741
M2AN18-2-M2AN18-1		70500.0	-41778.24	182778.24	0.3452554
M3LB50-2-M3LB50-1		-46.0	-112324.24	112232.24	1.0000000
M1LB17-2-M3LB50-1		9449.4	-102828.84	121727.64	0.9999884
M2AN18-2-M3LB50-1		90449.4	-21828.84	202727.64	0.1415834
M1LB17-2-M3LB50-2		9495.4	-102782.84	121773.64	0.9999880
M2AN18-2-M3LB50-2		90495.4	-21782.84	202773.64	0.1412777
M2AN18-2-M1LB17-2		81000.0	-31278.24	193278.24	0.2189756

E. Coli tratada con los
antibióticos extraídos con
hexano

Tukey multiple comparisons of means
95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = values ~ ind, data = ehex)

\$ind	diff	lwr	upr	p adj
Solvente-Control	-400000	-1732946.6	932946.6	0.9407268
M1LB45-1-Control	-1180000	-2512946.6	152946.6	0.0926188
M2LB16-1-Control	-3425500	-4758446.6	-2092553.4	0.0000628
M2AN18-1-Control	-3212000	-4544946.6	-1879053.4	0.0001063
M3LB50-1-Control	-590000	-1922946.6	742946.6	0.7089516
M3LB50-2-Control	-540000	-1872946.6	792946.6	0.7841533
M1LB17-2-Control	-155000	-1487946.6	1177946.6	0.9998674
M2AN18-2-Control	-3027500	-4360446.6	-1694553.4	0.0001715
M1LB45-1-Solvente	-780000	-2112946.6	552946.6	0.4183965
M2LB16-1-Solvente	-3025500	-4358446.6	-1692553.4	0.0001724
M2AN18-1-Solvente	-2812000	-4144946.6	-1479053.4	0.0003088
M3LB50-1-Solvente	-190000	-1522946.6	1142946.6	0.9994188
M3LB50-2-Solvente	-140000	-1472946.6	1192946.6	0.9999378
M1LB17-2-Solvente	245000	-1087946.6	1577946.6	0.9966634
M2AN18-2-Solvente	-2627500	-3960446.6	-1294553.4	0.0005253
M2LB16-1-M1LB45-1	-2245500	-3578446.6	-912553.4	0.0017249
M2AN18-1-M1LB45-1	-2032000	-3364946.6	-699053.4	0.0035485
M3LB50-1-M1LB45-1	590000	-742946.6	1922946.6	0.7089516
M3LB50-2-M1LB45-1	640000	-692946.6	1972946.6	0.6298505
M1LB17-2-M1LB45-1	1025000	-307946.6	2357946.6	0.1715228
M2AN18-2-M1LB45-1	-1847500	-3180446.6	-514553.4	0.0068502
M2AN18-1-M2LB16-1	213500	-1119446.6	1546446.6	0.9986837
M3LB50-1-M2LB16-1	2835500	1502553.4	4168446.6	0.0002892
M3LB50-2-M2LB16-1	2885500	1552553.4	4218446.6	0.0002518
M1LB17-2-M2LB16-1	3270500	1937553.4	4603446.6	0.0000918
M2AN18-2-M2LB16-1	398000	-934946.6	1730946.6	0.9421921
M3LB50-1-M2AN18-1	2622000	1289053.4	3954946.6	0.0005339
M3LB50-2-M2AN18-1	2672000	1339053.4	4004946.6	0.0004610
M1LB17-2-M2AN18-1	3057000	1724053.4	4389946.6	0.0001587
M2AN18-2-M2AN18-1	184500	-1148446.6	1517446.6	0.9995287
M3LB50-2-M3LB50-1	50000	-1282946.6	1382946.6	1.0000000
M1LB17-2-M3LB50-1	435000	-897946.6	1767946.6	0.9113228
M2AN18-2-M3LB50-1	-2437500	-3770446.6	-1104553.4	0.0009342
M1LB17-2-M3LB50-2	385000	-947946.6	1717946.6	0.9511554
M2AN18-2-M3LB50-2	-2487500	-3820446.6	-1154553.4	0.0008005
M2AN18-2-M1LB17-2	-2872500	-4205446.6	-1539553.4	0.0002609

S. Aureus tratada con los antibióticos extraídos con acetato de etilo

Tukey multiple comparisons of means
95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = values ~ ind, data = SAE)

\$ind	diff	lwr	upr	p adj
Solvente-Control	-15000	-1052942	1022942	1.0e+00
M1LB45-1-Control	-3476500	-4514442	-2438558	6.7e-06
M2LB16-1-Control	-3479000	-4516942	-2441058	6.7e-06
M2AN18-1-Control	-3486000	-4523942	-2448058	6.6e-06
M3LB50-1-Control	-3501000	-4538942	-2463058	6.3e-06
M3LB50-2-Control	-3495500	-4533442	-2457558	6.4e-06
M1LB17-2-Control	-3504197	-4542139	-2466255	6.3e-06
M2AN18-2-Control	-3504235	-4542177	-2466293	6.3e-06
M1LB45-1-Solvente	-3461500	-4499442	-2423558	7.0e-06
M2LB16-1-Solvente	-3464000	-4501942	-2426058	6.9e-06
M2AN18-1-Solvente	-3471000	-4508942	-2433058	6.8e-06
M3LB50-1-Solvente	-3486000	-4523942	-2448058	6.6e-06
M3LB50-2-Solvente	-3480500	-4518442	-2442558	6.7e-06
M1LB17-2-Solvente	-3489197	-4527139	-2451255	6.5e-06
M2AN18-2-Solvente	-3489235	-4527177	-2451293	6.5e-06
M2LB16-1-M1LB45-1	-2500	-1040442	1035442	1.0e+00
M2AN18-1-M1LB45-1	-9500	-1047442	1028442	1.0e+00
M3LB50-1-M1LB45-1	-24500	-1062442	1013442	1.0e+00
M3LB50-2-M1LB45-1	-19000	-1056942	1018942	1.0e+00
M1LB17-2-M1LB45-1	-27697	-1065639	1010245	1.0e+00
M2AN18-2-M1LB45-1	-27735	-1065677	1010207	1.0e+00
M2AN18-1-M2LB16-1	-7000	-1044942	1030942	1.0e+00
M3LB50-1-M2LB16-1	-22000	-1059942	1015942	1.0e+00
M3LB50-2-M2LB16-1	-16500	-1054442	1021442	1.0e+00
M1LB17-2-M2LB16-1	-25197	-1063139	1012745	1.0e+00
M2AN18-2-M2LB16-1	-25235	-1063177	1012707	1.0e+00
M3LB50-1-M2AN18-1	-15000	-1052942	1022942	1.0e+00
M3LB50-2-M2AN18-1	-9500	-1047442	1028442	1.0e+00
M1LB17-2-M2AN18-1	-18197	-1056139	1019745	1.0e+00
M2AN18-2-M2AN18-1	-18235	-1056177	1019707	1.0e+00
M3LB50-2-M3LB50-1	5500	-1032442	1043442	1.0e+00
M1LB17-2-M3LB50-1	-3197	-1041139	1034745	1.0e+00
M2AN18-2-M3LB50-1	-3235	-1041177	1034707	1.0e+00
M1LB17-2-M3LB50-2	-8697	-1046639	1029245	1.0e+00
M2AN18-2-M3LB50-2	-8735	-1046677	1029207	1.0e+00
M2AN18-2-M1LB17-2	-38	-1037980	1037904	1.0e+00

S. Aureus tratada con los antibióticos extraídos con hexano

Tukey multiple comparisons of means
95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = values ~ ind, data = shex)

\$ind	diff	lwr	upr	p adj
Solvente-Control	-3025000	-3707141.41	-2342858.6	0.0000007
M1LB45-1-Control	-5519000	-6201141.41	-4836858.6	0.0000000
M2LB16-1-Control	-5649500	-6331641.41	-4967358.6	0.0000000
M2AN18-1-Control	-5927000	-6609141.41	-5244858.6	0.0000000
M3LB50-1-Control	-5643500	-6325641.41	-4961358.6	0.0000000
M3LB50-2-Control	-5762500	-6444641.41	-5080358.6	0.0000000
M1LB17-2-Control	-6020000	-6702141.41	-5337858.6	0.0000000
M2AN18-2-Control	-5170000	-5852141.41	-4487858.6	0.0000000
M1LB45-1-Solvente	-2494000	-3176141.41	-1811858.6	0.0000032
M2LB16-1-Solvente	-2624500	-3306641.41	-1942358.6	0.0000021
M2AN18-1-Solvente	-2902000	-3584141.41	-2219858.6	0.0000009
M3LB50-1-Solvente	-2618500	-3300641.41	-1936358.6	0.0000022
M3LB50-2-Solvente	-2737500	-3419641.41	-2055358.6	0.0000015
M1LB17-2-Solvente	-2995000	-3677141.41	-2312858.6	0.0000007
M2AN18-2-Solvente	-2145000	-2827141.41	-1462858.6	0.0000115
M2LB16-1-M1LB45-1	-130500	-812641.41	551641.4	0.9956623
M2AN18-1-M1LB45-1	-408000	-1090141.41	274141.4	0.3952503
M3LB50-1-M1LB45-1	-124500	-806641.41	557641.4	0.9968152
M3LB50-2-M1LB45-1	-243500	-925641.41	438641.4	0.8682628
M1LB17-2-M1LB45-1	-501000	-1183141.41	181141.4	0.2049353
M2AN18-2-M1LB45-1	349000	-333141.41	1031141.4	0.5633626
M2AN18-1-M2LB16-1	-277500	-959641.41	404641.4	0.7809094
M3LB50-1-M2LB16-1	6000	-676141.41	688141.4	1.0000000
M3LB50-2-M2LB16-1	-113000	-795141.41	569141.4	0.9983413
M1LB17-2-M2LB16-1	-370500	-1052641.41	311641.4	0.4988187
M2AN18-2-M2LB16-1	479500	-202641.41	1161641.4	0.2403240
M3LB50-1-M2AN18-1	283500	-398641.41	965641.4	0.7637703
M3LB50-2-M2AN18-1	164500	-517641.41	846641.4	0.9818617
M1LB17-2-M2AN18-1	-93000	-775141.41	589141.4	0.9995771
M2AN18-2-M2AN18-1	757000	74858.59	1439141.4	0.0278842
M3LB50-2-M3LB50-1	-119000	-801141.41	563141.4	0.9976443
M1LB17-2-M3LB50-1	-376500	-1058641.41	305641.4	0.4813800
M2AN18-2-M3LB50-1	473500	-208641.41	1155641.4	0.2510858
M1LB17-2-M3LB50-2	-257500	-939641.41	424641.4	0.8345825
M2AN18-2-M3LB50-2	592500	-89641.41	1274641.4	0.1012711
M2AN18-2-M1LB17-2	850000	167858.59	1532141.4	0.0137532