



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Análisis de la producción de antimicrobianos, resistencia a antibióticos y virulencia de bacterias aisladas del Golfo de México”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Luis Emmanuel Romero González

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Liliana Pardo López
Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Centro de Investigación en Biotecnología, UAEM

Cuernavaca, Morelos. Diciembre, 2023.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo de investigación se realizó en el departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán y como parte del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la misma Universidad.

El Comité Tutorial estuvo integrado por:

Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán
(Instituto de Biotecnología, UNAM)

Dra. Liliana Pardo López
(Instituto de Biotecnología, UNAM)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
(Centro de Investigación en Biotecnología, UAEM)

El jurado designado estuvo integrado por:

Dra. Katy Juárez López
(Instituto de Biotecnología, UNAM)

Dr. Miguel Cocotl Yañez
(Facultad de Medicina, UNAM)

Dr. Sabino Pacheco Guillen
(Instituto de Biotecnología, UNAM)

Dr. Rafael Peña Miller
(Centro de Ciencias Genómicas, UNAM)

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch
(Facultad de Química, UNAM)

Para la realización de esta investigación, el alumno recibió una beca CONACyT (No. CVU 818121). Este estudio fue financiado con el donativo CONACYT - Problemas Nacionales no. 2017-01-5182.

A mis padres Juanita y Alberto, que iluminan lugares oscuros y son quienes hicieron posible todo el camino.

A Mariela, que es demasiado paciente, demasiado amable y demasiado maravillosa para expresarlo en palabras. Gracias por no abandonarme cuando la presión me convertía en un monstruo insufrible.

A la gente cuyo trabajo trasciende las ideas para forjar realidad.

Agradecimientos

Al programa de Apoyo y Estudios del Posgrado (PAEP), por el apoyo económico para la asistencia al XXXIII Congreso Nacional de Bioquímica de la Sociedad Mexicana de Bioquímica.

Agradezco profundamente al Dr. Víctor Bustamante, quien me brindó la oportunidad de integrarme a su equipo de trabajo y de emprender este proyecto bajo su dirección. Su orientación ha sido un faro en mi camino. Mi gratitud por su guía y enseñanzas durante estos años es inmensurable.

A la Dra. Liliana Pardo y el Dr. Alexandre Taketa, cuya participación en este proyecto ha sido invaluable. Sus consejos y observaciones han sido una fuente de enriquecimiento para este trabajo, aportando una profundidad y perspectiva que de otra manera no habría sido posible.

A los miembros del jurado de tesis, la Dra. Katy Juárez, el Dr. Miguel Cocotl, el Dr. Sabino Pacheco, el Dr. Rafael Peña y la Dra. Maricarmen Quirasco. Sus comentarios y críticas permitieron el enriquecimiento de este proyecto.

A todos mis compañeros de laboratorio por su apoyo y por brindarme siempre su amistad.

A mis amigos, Benjamín, Miguel, Fernando, Archivaldo, Pame, Ginebra y Erick, cuya amistad trasciende la distancia. Este logro no es solo mío, sino también de ustedes.

Índice general

| | |
|--|-----|
| Índice general..... | i |
| Índice de figuras..... | iv |
| Índice de tablas..... | vi |
| Lista de abreviaturas..... | vii |
| RESUMEN..... | ix |
| ABSTRACT..... | x |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1. Crisis mundial de antibióticos..... | 1 |
| 1.2. Aparición de la resistencia a antibióticos..... | 2 |
| 1.3. Resistencia intrínseca y resistencia adquirida..... | 3 |
| 1.4. Resistencia a antibióticos en ambientes naturales..... | 4 |
| 1.5. Causas de la crisis y RA en la actualidad..... | 5 |
| 1.6. COVID-19 y RA..... | 9 |
| 1.7. Búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos..... | 10 |
| 1.8. Estrategias de búsqueda de nuevos antibióticos..... | 11 |
| 1.9. Ambiente marino como una fuente de nuevos compuestos con actividad biológica..... | 12 |
| 1.10. El Golfo de México como fuente de biodiversidad..... | 13 |
| 1.11. Género <i>Pseudomonas</i> | 14 |
| 1.12. <i>P. aeruginosa</i> | 15 |
| 1.13. <i>S. aureus</i> resistente a metilina..... | 18 |
| 1.14. <i>Galleria mellonella</i> | 19 |
| 1.15. Antecedentes..... | 19 |
| 2. HIPÓTESIS..... | 21 |
| 3. OBJETIVOS..... | 22 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 23 |
| 4.1. Diagrama general de trabajo..... | 23 |
| 4.2. Cepas bacterianas utilizadas..... | 23 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.3. | Declaración de ética..... | 25 |
| 4.4. | Medios de cultivo utilizados..... | 25 |
| 4.5. | Susceptibilidad a antibióticos de las cepas de <i>S. aureus</i> | 26 |
| 4.6. | Búsqueda de actividad antibacteriana en las cepas aisladas del GoM..... | 27 |
| 4.7. | Extracción orgánica del sobrenadante de cultivo..... | 28 |
| 4.8. | Determinación de la actividad antibacteriana | 28 |
| 4.9. | Cromatografía en capa fina | 29 |
| 4.10. | Cuantificación de la producción de pirocianina..... | 30 |
| 4.11. | Cuantificación de la formación de biopelícula..... | 30 |
| 4.12. | Ensayos de proteasas..... | 31 |
| 4.13. | Ensayos de patogenicidad | 32 |
| 4.14. | Producción de ramnolípidos | 33 |
| 4.15. | Secreción y detección de ExoS y ExoU | 34 |
| 4.16. | Determinación de la susceptibilidad a antibióticos..... | 35 |
| 4.17. | Identificación de aislados bacterianos mediante el análisis de la secuencia del gen rRNA 16S..... | 36 |
| 4.18. | Secuenciación del genoma de la cepa de <i>Pseudomonas</i> sp. GOM7..... | 37 |
| 4.19. | Ensamblaje, anotación y análisis del genoma de <i>Pseudomonas</i> sp. GOM7... .. | 38 |
| 4.20. | Identificación taxonómica y filogenia de la cepa <i>Pseudomonas</i> sp. GOM7 | 38 |
| 4.21. | Identificación de integrones clase 1..... | 39 |
| 4.22. | Análisis estadístico..... | 40 |
| 5. | RESULTADOS | 41 |
| 5.1. | Identificación de bacterias productoras de antibacterianos | 41 |
| 5.2. | Identificación taxonómica de las cepas marinas con actividad antibacteriana mediante secuenciación del gen rRNA 16S | 42 |
| 5.3. | Selección de la cepa LP18 como candidata para caracterización | 43 |
| 5.4. | <i>Pseudomonas</i> sp. GOM7 muestra actividad inhibitoria contra cepas de <i>S. aureus</i> resistentes a antibióticos. | 44 |
| 5.5. | Secuenciación y anotación del genoma de <i>Pseudomonas</i> sp. GOM7..... | 49 |
| 5.6. | <i>Pseudomonas</i> sp. GOM7 es una nueva especie de <i>Pseudomonas</i> | 50 |
| 5.7. | Predicción de los compuestos antibacterianos en el genoma de <i>Pseudomonas</i> sp. GOM7..... | 54 |
| 5.8. | Caracterización parcial del compuesto con actividad antibacteriana | 57 |
| 5.9. | <i>Pseudomonas</i> sp. GOM7 no presentó propiedades de virulencia | 59 |
| 5.10. | Las cepas marinas y clínicas de <i>P. aeruginosa</i> son virulentas en el modelo de <i>G. mellonella</i> | 61 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 5.11. | Las cepas marinas y clínicas de <i>P. aeruginosa</i> son capaces de formar biopelícula. | 63 |
| 5.12. | Las cepas marinas y clínicas de <i>P. aeruginosa</i> expresan factores asociados a virulencia. | 64 |
| 5.13. | Las cepas marinas presentan mayor susceptibilidad a antibióticos que las cepas clínicas de <i>P. aeruginosa</i> | 67 |
| 5.14. | Análisis del impacto antropogénico sobre las cepas marinas y clínicas de <i>P. aeruginosa</i> | 68 |
| 6. | DISCUSIÓN..... | 70 |
| 7. | CONCLUSIONES | 78 |
| 8. | PERSPECTIVAS | 79 |
| 9. | BIBLIOGRAFÍA..... | 80 |
| 10. | ANEXOS..... | 100 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura. 1. Mecanismos de resistencia a antibióticos. | 3 |
| Figura. 2. Diagrama general de trabajo. | 23 |
| Figura. 3. Identificación de bacterias productoras de antibacterianos. | 41 |
| Figura. 4. Producción de piocianina de las bacterias aisladas del GoM en agar cetrimida. | 44 |
| Figura. 5. Actividad antibacteriana de la cepa <i>Pseudomonas</i> sp. GOM7. | 47 |
| Figura. 6. El extracto de acetato de etilo de <i>Pseudomonas</i> sp. GOM7 reduce la supervivencia de <i>S. aureus</i> | 48 |
| Figura. 7. Representación circular del genoma de <i>Pseudomonas</i> sp. GOM7. | 49 |
| Figura. 8. Especies de <i>Pseudomonas</i> filogenéticamente más cercanas a <i>Pseudomonas</i> sp. GOM7. | 51 |
| Figura. 9. Análisis de las familias de genes y comparación de bloques de alineamiento múltiple entre genomas de <i>Pseudomonas</i> sp.. | 54 |
| Figura. 10. Genes requeridos para la síntesis de piocianina en <i>P. aeruginosa</i> | 55 |
| Figura. 11. Grupos de genes biosintéticos predichos en el genoma de <i>Pseudomonas</i> sp. GOM7 y su comparación con los BGCs de otras bacterias. | 57 |
| Figura. 12. Caracterización parcial del compuesto antimicrobiano de <i>Pseudomonas</i> sp. GOM7. | 58 |
| Figura. 13. Supervivencia de <i>G. mellonella</i> infectada con diferentes dosis de <i>Pseudomonas</i> sp. GOM7. | 60 |
| Figura. 14. Comparación de las propiedades de virulencia de <i>Pseudomonas</i> sp. GOM7, <i>P. aeruginosa</i> (patogénica) y <i>E. coli</i> DH5 α (no patogénica).. | 61 |
| Figura. 15. Aislados marinos y clínicos de <i>P. aeruginosa</i> exhiben una virulencia similar en el modelo de <i>G. mellonella</i> | 62 |
| Figura. 16. Los aislados marinos y clínicos de <i>P. aeruginosa</i> forman biopelícula. | 63 |
| Figura. 17. Detección de las toxinas ExoS y ExoU producidas por los aislados de <i>P. aeruginosa</i> | 64 |
| Figura. 18. Producción de piocianina y elastasa por aislados marinos y clínicos de <i>P. aeruginosa</i> | 65 |

| | |
|---|----|
| Figura. 19. Producción de ramnolípidos por cepas marinas y clínicas de <i>P. aeruginosa</i> | 66 |
| Figura. 20. Susceptibilidad a antibióticos de cepas marinas y clínicas de <i>P. aeruginosa</i> | 68 |
| Figura. 21. Detección del gen <i>int1</i> en las cepas marinas y clínicas de <i>P. aeruginosa</i> .. | 69 |

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla. 1. Cepas bacterianas no marinas utilizadas en este proyecto. | 24 |
| Tabla. 2. Perfiles de susceptibilidad a antibióticos de las cepas de <i>S. aureus</i> | 26 |
| Tabla. 3. Criterio de clasificación de formación de biopelícula..... | 31 |
| Tabla. 4. Oligonucleótidos utilizados para la identificación de cepas bacterianas. | 37 |
| Tabla. 5. Oligonucleótidos utilizados para la identificación de integrones clase 1. | 39 |
| Tabla. 6. Espectro de actividad antibacteriana de cepas marinas contra cepas de referencia de bacterias patógenas. | 42 |
| Tabla. 7. Identificación de las cepas productoras de antibacterianos mediante la secuenciación y análisis del gen rRNA 16S. | 43 |
| Tabla. 8. Espectro de actividad antibacteriana de <i>Pseudomonas</i> sp. GOM7. | 45 |
| Tabla. 9. Criterios filogenómicos para identificar taxonómicamente la especie de <i>Pseudomonas</i> sp. GOM7. | 52 |

Lista de abreviaturas

| | |
|-------------------|---|
| RA | Resistencia a antibióticos |
| MDR | Multidrogo resistente |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| HGT | Transferencia horizontal de genes |
| CDC | Centro para el control y prevención de enfermedades |
| PUCRA | Plan de acción para controlar la resistencia a los antimicrobianos |
| SARS-CoV-2 | Coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo |
| GoM | Golfo de México |
| CIGoM | Consortio de Investigación del Golfo de México |
| INR | Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| MRSA | <i>S. aureus</i> resistente a meticilina |
| LB | Medio de lisogenia |
| MH | Medio Mueller-Hinton |
| CIP | Ciprofloxacino |
| FOS | Fosfomicina |
| TRS | Trimetroprim/Sulfametoxazol |
| P | Penicilina |
| VAN | Vancomicina |
| TET | Tetraciclina |
| ERY | Eritromicina |
| CLI | Clindamicina |
| GEN | Gentamicina |
| CEF | Cefalotina |
| OXA | Oxacilina |
| MIC | Concentración Mínima Inhibitoria |
| CAMHB | Medio Muller-Hinton ajustado con cationes |
| DO ₆₀₀ | Densidad óptica a 600 nm |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |

| | |
|-------------------|--|
| TLC | Cromatografía en capa fina |
| BAW | Butanol-Ácido acético- Agua |
| EFAW | Acetato de etilo-Ácido fórmico-Ácido acético-Agua |
| UFC | Unidades formadoras de colonia |
| PBS | Buffer de fosfatos |
| DO ₅₇₀ | Densidad óptica a 570 nm |
| DO _c | Valor de corte para biopelícula |
| WB | Western-Blot |
| CAZ | Ceftazidima |
| PIP | Piperacilina |
| MER | Meropenem |
| NOR | Norfloxacino |
| CIP | Ciprofloxacino |
| IPM | Imipenem |
| AMK | Amikacina |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| ANOVA | Análisis de varianza de una vía |
| BGC | Grupo de genes biosintéticos |
| RiPPs | Péptidos sintetizados por el ribosoma y modificados post traduccionalmente |
| NRPs | Péptidos no ribosomales |

RESUMEN

La resistencia a antibióticos es una grave amenaza global, por lo que es urgente desarrollar nuevos fármacos contra bacterias resistentes. Además de los microorganismos terrestres, el entorno marino también alberga un potencial desconocido para descubrir nuevos antibióticos. En este estudio, examinamos 82 cepas bacterianas marinas del Golfo de México (GoM) como posibles fuentes de nuevos antibióticos. Identificamos ocho cepas con actividad inhibitoria contra bacterias patógenas, incluyendo una nueva especie de *Pseudomonas*, *Pseudomonas* sp. GOM7, que mostró actividad antibacteriana contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, incluyendo cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes al antibiótico meticilina; *S. aureus* resistente a meticilina es uno de los patógenos prioritarios establecidos por la Organización Mundial de la Salud para el desarrollo de nuevos antibióticos. Determinamos que los compuestos anti-*S. aureus* de *Pseudomonas* sp. GOM7 pueden extraerse con acetato de etilo. Para complementar el estudio de *Pseudomonas* sp. GOM7, se realizó la secuenciación completa de su genoma; el análisis bioinformático del mismo reveló la presencia de seis grupos de genes que codifican para posibles compuestos antimicrobianos.

Las 7 cepas marinas restantes que presentaron actividad antibacteriana fueron identificadas como *P. aeruginosa*, la cual es una bacteria patógena oportunista que se encuentra en diversos nichos hospitalarios y ambientales. El análisis de las propiedades de virulencia y la resistencia a antibióticos de los patógenos ambientales es de gran interés desde la perspectiva de "Una Salud", este es un concepto que resalta la interconexión entre la salud humana, animal y ambiental. En nuestro estudio determinamos que las cepas marinas de *P. aeruginosa* aisladas del GoM presentan propiedades de virulencia similares a las cepas clínicas, como la expresión de varios factores involucrados en virulencia de esta bacteria y la capacidad de matar a larvas de *Galleria mellonella*. En contraste, las cepas marinas de *P. aeruginosa* aisladas del GoM mostraron mayor sensibilidad a antibióticos que las cepas clínicas. Adicionalmente, encontramos una mayor presencia de integrones de clase 1 en las cepas clínicas que en las cepas marinas; la presencia de estos integrones se utiliza como marcadores de impacto antropogénico.

Nuestros resultados muestran el potencial del Golfo de México, y en particular el de la cepa *Pseudomonas* sp. GOM7, como una fuente con potencial para la identificación de nuevos antibióticos. Además, nuestros resultados indican que las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de este ambiente marino presentan propiedades de virulencia similares a las de cepas clínicas de esta bacteria, pero su nivel de resistencia a antibióticos es bajo comparado con las cepas clínicas.

ABSTRACT

Antibiotic resistance is a serious global threat and there is an urgent need to develop new drugs against resistant bacteria. In addition to terrestrial microorganisms, the marine environment holds an unknown potential for the discovery of new antibiotics. In this study, we screened the antibacterial activity of 82 bacterial strains isolated from water samples collected in the Gulf of Mexico. We identified eight marine strains showing growth inhibitory activity against pathogenic bacteria, one of these marine strains is a new *Pseudomonas* species, *Pseudomonas* sp. GOM7, which was not pathogenic in *Galleria mellonella* larvae, a widely used model to test bacterial virulence. *Pseudomonas* sp. GOM7 showed antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, including strains of *Staphylococcus aureus* resistant to the antibiotic methicillin; methicillin-resistant *S. aureus* is one of the priority pathogens identified by the World Health Organization for the development of new antibiotics. We found that the anti-*S. aureus* compounds produced by *Pseudomonas* sp. GOM7 can be extracted with ethyl acetate. To complement the characterization of *Pseudomonas* sp. GOM7, its complete genome was sequenced; bioinformatic analysis of the genome revealed the presence of six clusters of genes encoding for potential antimicrobial compounds.

The remaining seven marine strains with antibacterial activity were identified as *P. aeruginosa*, an opportunistic pathogen found in both hospital and environmental settings. Analyzing the virulence characteristics and antibiotic resistance of environmental pathogens is important from a “One Health” perspective, which underscores the interconnectedness of human, animal, and environmental health. Our study revealed that *P. aeruginosa* strains from the Gulf of Mexico exhibited similar virulence characteristics to clinical strains, including the expression of several virulence factors and the ability to kill *G. mellonella* larvae. However, these marine-isolated strains showed greater antibiotic sensitivity compared to clinical strains. Furthermore, we observed a higher presence of class 1 integrons, markers of anthropogenic impact, in clinical strains than in marine strains.

Our results demonstrate the potential of the Gulf of Mexico, and in particular that of *Pseudomonas* sp. GOM7, as a potential source for the identification of new antibiotics. Furthermore, our results indicate that *P. aeruginosa* strains isolated from this marine environment have virulence properties similar to clinical strains of this bacterium, but their level of antibiotic resistance is low compared to clinical strains.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Crisis mundial de antibióticos

La resistencia a antibióticos (RA) es un fenómeno en el cual los microorganismos desarrollan la capacidad de resistir los efectos de los antibióticos. Esta resistencia se debe a cambios genéticos en las bacterias que les permiten neutralizar, destruir o evitar los efectos de los antibióticos. La aparición, diseminación y persistencia de bacterias resistentes a uno o varios antibióticos, las cuales se denominan multidrogo resistentes (MDR), se ha convertido en un grave problema de salud pública a nivel mundial. La RA reduce la efectividad de los tratamientos antimicrobianos y puede llevar a infecciones más difíciles de controlar y tratar [1].

La importancia de la RA es tal que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha declarado que esta problemática es una de las 10 principales amenazas para la salud pública a las que se enfrenta la humanidad. Para tratar de combatir esta situación, la OMS ha implementado un plan de acción mundial para el control de la RA, cuyo objetivo principal es garantizar el tratamiento de enfermedades infecciosas mediante el uso responsable de antibióticos y el desarrollo de nuevos antimicrobianos [2,3].

Esta crisis tiene múltiples dimensiones y los datos disponibles sobre esto son alarmantes. Estudios recientes sugieren que, si no se realizan cambios significativos en el uso de antibióticos, para el año 2050 podrían morir alrededor de 10 millones de personas anualmente debido a infecciones causadas por bacterias resistentes a múltiples fármacos, con pérdidas económicas estimadas en 100 trillones de dólares [4]. Además, en 2019 se estimó que la RA en bacterias estuvo relacionada con más de 4.5 millones de muertes, de las cuales alrededor de 1.2 millones fueron directamente atribuidas a la RA [5]. Por lo tanto, resulta urgente la implementación de políticas que modifiquen los patrones actuales de uso de antibióticos y el desarrollo de nuevas estrategias de búsqueda para la identificación y descubrimiento de nuevas moléculas con actividad antibacteriana.

En 2017, la OMS publicó una lista de 12 bacterias de bacterias resistentes a antibióticos denominadas patógenos prioritarios, las cual incluye patógenos que

representan un grave riesgo para la salud humana y para los cuales es necesario promover la búsqueda y desarrollo de nuevos antibióticos. Estos patógenos fueron clasificados como de prioridad crítica, alta y media, según la necesidad del desarrollo de nuevos antimicrobianos que los combatan, así como por la alta incidencia en infecciones y el grado de RA [6]. En esta lista se encuentran bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella* spp., entre otras. Esta lista prioritaria de patógenos se considera como un indicador para la priorización de incentivos y fondos para investigación y desarrollo destinados al descubrimiento de nuevos antibióticos.

1.2. Aparición de la resistencia a antibióticos

La RA es un aspecto particular de la evolución natural de las bacterias que se ha desarrollado a lo largo de millones de años de evolución, como parte de su capacidad para adaptarse y sobrevivir en ambientes hostiles. A pesar de que este fenómeno se relaciona principalmente con el uso clínico de los antibióticos, múltiples estudios apuntan a que este tipo de moléculas pueden tener otro tipo de rol ecológico mostrando efectos no letales en niveles de concentración más bajos [7,8].

La resistencia a los antibióticos no es un fenómeno reciente, cada vez más estudios apoyan que la exposición ambiental a diferentes moléculas ha generado diversos mecanismos de resistencia a éstos, incluso antes del uso clínico de los antibióticos. Por ejemplo, estudios han demostrado la presencia de bacterias resistentes a β -lactámicos, tetraciclinas y glicopéptidos en diferentes tipos de suelo, así como en una región aislada de una cueva con aproximadamente 4 millones de años de antigüedad [9,10]. Además, mediante análisis metagenómicos se han detectado genes de resistencia en muestras de permafrost en Alaska con una antigüedad aproximada de 30,000 años [11]. Estos hallazgos respaldan la idea de que la resistencia a los antibióticos es un fenómeno natural, antiguo y estrechamente relacionado con la evolución bacteriana.

Diversas investigaciones muestran la rápida progresión de la resistencia bacteriana a los antibióticos alrededor del mundo [12]. Esta resistencia puede ser intrínseca, provenir de mutaciones, o bien originarse por transferencia horizontal de genes. En los siguientes puntos abundaremos un poco sobre los diferentes mecanismos de resistencia antibióticos presentes en las bacterias.

1.3. Resistencia intrínseca y resistencia adquirida

La resistencia intrínseca en bacterias se refiere a las características inherentes a cada familia, especie o grupo bacteriano que generan un fenotipo de resistencia, independientemente de la presencia de una presión de selección (Fig. 1). Esta resistencia suele estar codificada en el genoma del organismo y no se adquiere por factores externos como la transferencia horizontal de genes (HGT por sus siglas en inglés) [13]. Las bacterias pueden tener varias formas de resistencia intrínseca, un ejemplo es la membrana externa en bacterias Gram-negativas, que es impermeable a ciertos antibióticos y actúa como barrera. Otro ejemplo es la presencia de bombas de eflujo y porinas, que expulsan moléculas tóxicas como antibióticos, antisépticos y metales pesados [14,15].

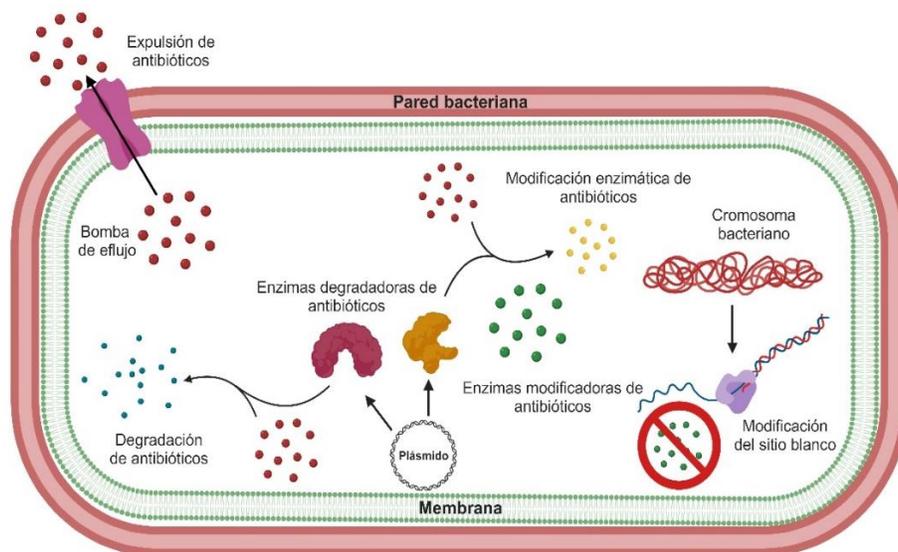


Figura. 1. Mecanismos de resistencia a antibióticos. Se muestran diferentes mecanismos de resistencia a antibióticos, incluyendo la expulsión de antibióticos mediante bombas de eflujo, la modificación enzimática y degradación de antibióticos, así como la modificación del sitio blanco. Modificado de Aslam et al., 2018. Imagen Creada con Biorender.com.

Por otro lado, la resistencia adquirida abarca diversos mecanismos que permiten a las bacterias sobrevivir ante la presencia de compuestos tóxicos, especialmente como respuesta a la exposición constante a antibióticos. Estos mecanismos pueden surgir tanto en ambientes clínicos como en entornos naturales, debido a la presión selectiva ejercida por la exposición a los antibióticos y permite que las bacterias sobrevivan a la actividad de los antibióticos mediante cambios genéticos específicos como la generación de mutaciones o la adquisición de genes de resistencia de otras bacterias mediante HGT [16,17].

Existen tres principales mecanismos utilizados para la HGT: la conjugación, la transformación y la transducción; la conjugación implica contacto directo entre bacterias, la transformación involucra la internalización de material genético exógeno y la transducción media la transferencia de genes a través de fagos [18]. En el contexto de la resistencia a los antibióticos, la HGT desempeña un papel crucial en la diseminación de genes de resistencia entre las bacterias. Permite que una bacteria previamente susceptible adquiera resistencia al recibir genes de resistencia de otra bacteria. Este proceso acelera la propagación de la resistencia a los antibióticos entre diversas poblaciones bacterianas, lo que representa un desafío significativo en el control de las enfermedades infecciosas.

En el caso de la resistencia adquirida mediante mutaciones, uno de los mecanismos más extendidos implica la modificación del sitio blanco de acción, mediante el cual se altera el blanco molecular del antibiótico, disminuyendo su afinidad por el mismo y evitando su efecto [19].

1.4. Resistencia a antibióticos en ambientes naturales

La RA es un fenómeno dinámico y en constante evolución. No se limita exclusivamente a los entornos clínicos, donde el uso excesivo e indiscriminado de antibióticos es una práctica común, sino que también se ha detectado en ambientes naturales como suelos y cuerpos de agua. Aunque el uso excesivo e inadecuado de antibióticos ha acelerado la aparición y propagación de la RA, existen otros factores relacionados con el origen de este problema. Por ejemplo, la presencia de

moléculas antimicrobianas en el ambiente, producidas por microorganismos o como contaminantes liberados en el ambiente, proporciona una fuente adicional de presión selectiva que podría favorecer la aparición de RA [20].

Se ha demostrado que las moléculas antibióticas presentes en el ambiente pueden cumplir diferentes funciones, como la activación transcripcional de rutas de respuesta a estrés o la modulación de interacciones dentro de comunidades bacterianas [21,22]. Además, la "hipótesis del productor" sugiere que los microorganismos ambientales que producen antibióticos deben poseer genes de resistencia para evitar la actividad inhibitoria de los compuestos antimicrobianos que producen. Estos genes de resistencia podrían ser transferidos horizontalmente a microorganismos de importancia clínica [23].

Esto sugiere que los ambientes naturales actúan como un reservorio de genes de resistencia. Además, cada vez hay más evidencia que respalda la idea de que la resistencia a antibióticos tiene su origen en las bacterias ambientales [24,25]. Por lo tanto, comprender mejor el papel ecológico de los antibióticos y la resistencia a antibióticos en entornos naturales puede ser clave para predecir y combatir la aparición y evolución de la resistencia a antibióticos en las bacterias patógenas.

1.5. Causas de la crisis y RA en la actualidad

Desde el descubrimiento de la penicilina en 1929 y la posterior introducción de los antibióticos en la práctica clínica en la década de 1940, estos medicamentos han sido fundamentales para salvar millones de vidas. Sin embargo, su uso excesivo e innecesario ha contribuido significativamente a la evolución de la resistencia a los antibióticos. Por ejemplo, estudios han reportado que el consumo mundial de estos compuestos ha aumentado aproximadamente un 46% entre los años 2000 y 2018, de acuerdo al Centro para el control y prevención de enfermedades (CDC), en Estados Unidos la RA incrementó un 15% entre 2019 y 2020 [26,27].

Además de su uso en el ámbito clínico, los antibióticos también se emplean ampliamente como promotores de crecimiento en animales de granja a nivel global

[28,29]. Según el Departamento de Agricultura de Estados Unidos, en el año 2011 un 73% de los ganaderos administraron al menos un antibiótico al ganado con el fin de estimular su crecimiento o como medida profiláctica. Además, se estima que más de 14,788 toneladas de antibióticos fueron vendidos para su uso en animales entre los años 2009 y 2013, el total de antibióticos clínicamente importantes vendidos o distribuidos para su uso en animales destinados a la producción de alimentos aumentó un 20% en ese período [30].

Otra de las causas que podría explicar la crisis de la resistencia a los antibióticos en los últimos años es el desinterés de la industria farmacéutica en el desarrollo de nuevos compuestos. En 1998 se introdujeron en el mercado mundial 20 nuevos antibióticos, pero para el año 2011 este número se redujo significativamente a solo 4. En la actualidad, se encuentran en desarrollo clínico 42 antibióticos, de los cuales solo 11 tienen el potencial para tratar infecciones causadas por patógenos prioritarios listados por la OMS [31,32]. Varias compañías farmacéuticas, como Abbot, Merck y Roche, han abandonado el campo del desarrollo de nuevos antibióticos, dejando solamente 5 laboratorios (Astra-Seneca, Glaxo-Smith Kline, Novartis, Sanofi-Aventis y Schering-Plow) trabajando en la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos [33]. La principal razón detrás de este desinterés en la industria farmacéutica es la baja rentabilidad de la inversión en el desarrollo de nuevas moléculas antimicrobianas. El proceso para crear nuevos antibióticos es complejo y costoso, con un porcentaje de éxito de aproximadamente el 5%. Además, el tiempo que transcurre desde la aparición de un nuevo antibiótico hasta que las bacterias desarrollan resistencia a él puede ser de menos de dos años [31,34].

Como resultado de la falta de desarrollo de nuevos antibióticos, sumado a las prácticas inadecuadas y el uso extensivo de estos compuestos en el ámbito clínico y la producción animal, nos enfrentamos a un problema urgente de salud pública, con la disminución de opciones de tratamiento efectivas para las infecciones bacterianas resistentes a los antibióticos.

Para abordar la problemática de la RA, la OMS desarrolló un plan de acción que fue ratificado internacionalmente durante la Asamblea Mundial de la Salud en 2015. El plan de la OMS busca promover la conciencia y la responsabilidad en el uso de antibióticos, garantizando su uso sólo cuando sea necesario y bajo prescripción médica adecuada. Además, enfatiza en la importancia de mejorar la vigilancia y recopilación de datos y destaca la necesidad de invertir en investigación y desarrollo para encontrar nuevas alternativas terapéuticas y métodos de diagnóstico más efectivos. En general, este plan de acción global de la OMS es un esfuerzo integral para combatir la resistencia a los antibióticos y preservar la eficacia de estos medicamentos para el futuro [2,35].

Dada la complejidad de la RA, se ha propuesto un enfoque colaborativo para abordar esta problemática desde dos perspectivas principales: "Una Salud" (One Health) y "Salud Mundial" (Global Health) [36,37]. La primera enfatiza en las interacciones que existen entre seres humanos, animales y ecosistemas para alcanzar un bienestar máximo. En el contexto de la RA, cada uno de estos tres componentes está vinculado debido al uso irresponsable y excesivo de antimicrobianos en diferentes sectores como la agricultura, ganadería y la medicina humana. Bajo esta perspectiva, agentes infecciosos como bacterias, virus o parásitos adquieren relevancia al cruzar con facilidad barreras inter-especie. El ambiente también juega un papel crucial, ya que los cambios en los ecosistemas debido al impacto antropogénico pueden condicionar y modificar las diferentes poblaciones de microorganismos que habitan dichos ecosistemas. Por lo tanto, analizar a los patógenos, incluyendo las bacterias ambientales, desde este punto de vista proporciona un mejor entendimiento de su origen, transmisión y amenaza potencial para la salud [38].

Por otro lado, la perspectiva de "Salud Mundial" se enfoca en las condiciones que facilitan la diseminación global de la resistencia a los antibióticos y en las acciones necesarias para controlarla a nivel mundial. Esto incluye el desarrollo y la implementación de políticas y estrategias coordinadas a nivel internacional, la

vigilancia y el seguimiento de la resistencia en diferentes regiones del mundo. Ambos enfoques son complementarios y se refuerzan mutuamente para abordar la RA de manera integral y efectiva [39].

En nuestro país, la evaluación de la RA sigue siendo irregular y no existe una red organizada de laboratorios que proporcione una visión integral de la situación. Aunque en 2018 se publicó en el Diario Oficial de la Federación el "Acuerdo por el que se declara la obligatoriedad de la Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos", aún no se cuenta con datos que reflejen el impacto directo de las bacterias resistentes a antibióticos en las tasas de mortalidad o en la economía. No obstante, se han realizado estudios que revelan una alta prevalencia de estas bacterias en el país [40]. Por ejemplo, se ha reportado que cepas de *A. baumannii* aisladas de pacientes en diferentes hospitales del país presentan resistencia a la mayoría de los antibióticos evaluados, incluyendo los carbapenémicos. De manera similar, se ha observado un incremento en la resistencia a aztreonam en cepas de *P. aeruginosa* [41]. Además, se ha detectado la presencia de 7 de los 12 patógenos prioritarios enlistados por la OMS en 47 centros hospitalarios mexicanos, y se ha observado un aumento en el porcentaje de aislados resistentes a los principales antibióticos utilizados entre 2010 y 2020 [42].

Sin embargo, debido a la falta de procedimientos claros, los datos sobre resistencia a los antibióticos en México son poco confiables. Ante esta situación, la UNAM ha propuesto, a través del Programa Universitario de Investigación en Salud, un plan de acción para controlar la resistencia a los antimicrobianos en el país (PUCRA) [43]. Estos esfuerzos se alinean con los principales puntos abarcados en el plan mundial de la OMS. A pesar de esto, hasta la fecha, ninguna de las acciones sugeridas en el acuerdo nacional ha visto avances significativos, y la crisis provocada por la pandemia de COVID-19 ha generado aún más problemas en el sistema de salud mexicano. Esta situación muestra la gravedad del problema de la RA en el país y resalta la necesidad de abordar esta problemática de manera urgente y efectiva.

1.6. COVID-19 y RA

La pandemia de COVID-19, causada por el SARS-CoV-2, ha impactado globalmente desde su aparición a finales de 2019. Para diciembre de 2020, había infectado a más de 97 millones de personas y causado más de 2 millones de muertes, afectando todos los aspectos de la sociedad y evidenciando las deficiencias en los sistemas de salud a nivel mundial [44].

En medio de esta crisis, la RA, otro de los problemas más alarmantes y urgentes a nivel mundial, ha quedado eclipsada. La ausencia de un tratamiento efectivo en las etapas iniciales de la pandemia condujo al uso excesivo e inadecuado de antibióticos en su tratamiento [45]. Además, la aparición de infecciones bacterianas en pacientes con COVID-19, el incremento de hospitalizaciones, incluyendo la necesidad de ventilación mecánica y la prolongación de la estancia hospitalaria, crearon un entorno que propició el aumento del consumo de antibióticos en los hospitales y elevó el riesgo de adquisición de infecciones nosocomiales causadas por bacterias MDR [46].

Varios estudios revelaron que alrededor del 71.9% de los pacientes con COVID-19 recibieron antibióticos [47,48]. Además, durante la crisis de COVID-19, se observó un aumento en el uso de productos desinfectantes, bactericidas, fungicidas y antivirales, así como detergentes, especialmente en los hospitales [49]. El uso excesivo de estos productos genera una presión de selección adicional en las bacterias expuestas a ellos. Además, puede resultar en la liberación involuntaria de moléculas con actividad antimicrobiana en el ambiente, lo que favorece el desarrollo de la RA. [50]. Sumado a esto, la investigación en áreas no relacionadas con la COVID-19, incluida la resistencia a los antibióticos, ha sido pospuesta, retrasada o cancelada. Los recursos económicos destinados a este tipo de proyectos se han reducido y el efecto a largo plazo en la investigación sobre la resistencia a los antibióticos aún es incierto.

La pandemia de COVID-19 ha tenido un impacto aún incierto en la lucha contra la RA. No obstante, la aparición de bacterias MDR no se detiene. La suma de estos factores, junto con los problemas preexistentes, podría propiciar la emergencia de

nuevas y más peligrosas “súper bacterias”. Esto podría tener consecuencias a largo plazo en la lucha contra la RA [51].

1.7. Búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos

Los microorganismos producen una amplia variedad de moléculas con diferentes actividades biológicas [52]. Alrededor del 70% de todos los antibióticos disponibles son compuestos provenientes del metabolismo secundario de microorganismos del suelo, mientras que los últimos antibióticos que han salido al mercado han sido obtenidos principalmente mediante modificación química de antibióticos naturales [53]. Con el surgimiento de la problemática ocasionada por la RA ha resurgido el interés de la comunidad científica por identificar nuevos antibióticos, principalmente productos naturales obtenidos de plantas, animales o microorganismos. Los productos naturales exhiben un amplio rango de farmacóforos con un alto grado de estereoquímica, esta característica contribuye con la capacidad de las moléculas de interactuar con diferentes blancos moleculares, presentando una ventaja contra los compuestos sintéticos [54].

En la era dorada del descubrimiento de antibióticos nuevas clases de antibióticos eran descubiertas regularmente, principalmente de bacterias del suelo; antibióticos como la actinomicina, estreptomycin, tetraciclinas, entre otros, fueron identificados principalmente de bacterias pertenecientes al género *Streptomyces* [53]. Sin embargo, actualmente es claro que debido a la explotación de este ambiente, la identificación de nuevos compuestos antibacterianos en este nicho es más compleja, a pesar de que solo una pequeña parte del suelo terrestre ha sido muestreado en la búsqueda de microorganismos productores de antibióticos. Por ese motivo, en los últimos años se ha empezado a realizar la búsqueda de este tipo de productores en una amplia variedad de nichos ecológicos, con la idea de que en nichos ecológicos poco explorados pueden habitar microorganismos raros con características metabólicas únicas que puedan producir compuestos naturales novedosos; por ejemplo, geiseres o ambientes marinos, antárticos, desérticos, entre otros [55,56]. Más aún, la exploración de ambientes previamente inaccesibles o

inexplorados, junto con el uso de nuevas tecnologías para el aislamiento y la búsqueda de compuestos bioactivos, proporcionan una nueva y multidisciplinaria perspectiva para descubrir nuevos antibióticos. Este enfoque es crucial para explotar la diversidad de compuestos naturales producidos por bacterias en estos ambientes [57].

1.8. Estrategias de búsqueda de nuevos antibióticos

El descubrimiento de antibióticos esenciales como los β -lactámicos, tetraciclinas y macrólidos marcó una era dorada, que ahora parece agotada. Este logro se basó principalmente en la utilización de la plataforma Waksman, un método que implica cultivar microorganismos ambientales para identificar posibles agentes antimicrobianos [58]. Sin embargo, su eficacia para descubrir nuevos antibióticos es limitada. Las técnicas microbiológicas convencionales, que se apoyan en la fisiología, bioquímica y genética bacterianas, enfrentan desafíos para identificar compuestos significativos, lo que a menudo resulta en descubrimientos redundantes o fracasos en la aplicación clínica de estas moléculas. Sin embargo, los avances en técnicas de cultivo, minería metagenómica y metabolómica, así como la identificación de reservorios microbianos no explotados, han revelado nuevas vías para expandir la búsqueda de nuevos y mejores antibióticos [59].

Algunas de estas nuevas estrategias para la búsqueda de antibióticos incluyen el cultivo de microorganismos “incultivables”, que son prevalentes en la naturaleza pero no crecen en condiciones de laboratorio convencionales. El cultivo in situ, que imita los entornos naturales, ha permitido el crecimiento de estas bacterias, conocidas como “materia oscura bacteriana”. Un ejemplo de éxito es la teixobactina, un antibiótico derivado de *Eleftheria terrae*, una bacteria Gram-negativa. El aislamiento de *E. terrae* se logró mediante la tecnología de “chip de aislamiento” (iChip), que utiliza compuestos naturales para promover el crecimiento en cámaras aisladas, similares a unidades de contención enterradas [60,61]. Esto facilita el crecimiento y aislamiento de nuevas especies en cultivos puros a través de una membrana semipermeable para la transferencia de nutrientes. Otra estrategia para

el descubrimiento de antibióticos implica el cultivo conjunto de microorganismos interrelacionados. Se utilizan cepas “auxiliares” para estimular el crecimiento mediante moléculas bioactivas, lo que activa las vías biosintéticas [62].

Otro enfoque para evitar la redundancia en el descubrimiento de antibióticos es el uso de métodos *in silico* para evaluar productores potenciales. La gran cantidad de genomas secuenciados en bases de datos públicas ha revelado numerosos grupos de genes biosintéticos (BGC) de metabolitos secundarios aún no caracterizados [63]. La minería genómica examina los genomas microbianos para identificar nuevos conjuntos de genes productores de antibióticos, utilizando herramientas como la espectrometría de masas y la informática para refinar las predicciones de programas de amplio espectro como antiSMASH. Adicionalmente, los análisis metagenómicos permiten analizar todos los microorganismos de un ambiente determinado, incluidos los no cultivables, lo que acelera el descubrimiento de nuevas moléculas bioactivas y vías biosintéticas en comparación con los métodos tradicionales [64].

El estudio con estas tecnologías innovadoras de hábitats no explorados podría revelar nuevas moléculas antimicrobianas de organismos desconocidos. Además, en sintonía con cambios regulatorios, iniciativas gubernamentales y modelos de innovación abierta, podrían acelerar el desarrollo de antimicrobianos novedosos para combatir el fenómeno de RA.

1.9. Ambiente marino como una fuente de nuevos compuestos con actividad biológica

La tecnología moderna amplía el acceso de los investigadores a los recursos naturales del planeta, revelando nuevos reservorios de microorganismos y sus singulares capacidades biosintéticas. Los microorganismos marinos representan una fuente amplia para la búsqueda de compuestos con diferentes actividades biológicas, entre ellos, antibióticos. El ambiente marino contiene aproximadamente la mitad de la biodiversidad del planeta, por lo cual representa una prometedora fuente para la búsqueda de nuevos compuestos antibacterianos [65]. Las bacterias

marinas están expuestas a variaciones en las condiciones ambientales, como la temperatura, la presión, la luz y la salinidad, algunos reportes demuestran que la producción de moléculas antibacterianas se favorece por la competencia de espacio y nutrientes favoreciendo la producción de compuestos únicos [66–68]. Se han identificado microorganismos marinos que producen compuestos con propiedades antimicrobianas, citotóxicas y anticancerígenas, entre otras [69,70]. No obstante, el microbioma marino es uno de los ambientes menos estudiados y se estima que alrededor del 91% de las especies bacterianas que habitan el océano se desconocen [71]. Las bacterias marinas, adaptadas a diferentes entornos y condiciones extremas, han desarrollado diversas rutas metabólicas que producen compuestos secundarios, como alcaloides, esteroides, terpenoides, péptidos y pólícétidos, que son poco comunes en el ambiente terrestre [72]. Estos compuestos pueden tener un gran potencial para el desarrollo de nuevos medicamentos antibacterianos.

En los últimos años se ha incrementado el descubrimiento de compuestos naturales con potencial antimicrobiano producidos por bacterias marinas [73,74]. Algunos ejemplos incluyen la desotamida y la desotamida B, ciclohexapeptidos con actividad contra bacterias Gram-positivas; la antramicina, un compuesto con efecto antibacteriano contra *B. anthracis* [75]; la bacicyclina, un péptido cíclico activo contra *E. faecalis* y *S. aureus*; las aqabamycinas, producidas por *Vibrio* sp., que muestran actividad contra varias cepas bacterianas; y el 1-acetil-beta-carbonil producido por una cepa de *Pseudomonas*, con actividad contra *S. aureus* resistente a metilicina (MRSA) [76,77]. Estos hallazgos muestran el potencial de los compuestos antimicrobianos aislados del ambiente marino.

1.10. El Golfo de México como fuente de biodiversidad

El Golfo de México (GoM) es un ecosistema marino de gran importancia, abarcando 1.5 millones de km² con profundidades promedio de 1615 m y máximas de 4400 m [78]. En el norte predominan aguas poco profundas, con hábitats como arrecifes de ostras y marismas, así como estuarios y lechos de pastos marinos en bahías [79].

En el sur se encuentran manglares, pantanos, bahías y lagunas con arrecifes de ostras [80].

El campo de la diversidad bacteriana en el GoM es un área marginalmente explorada que tiene un gran potencial para la búsqueda de microorganismos capaces de producir moléculas bioactivas, más potentes y con mecanismos de acción inusuales debido a las características propias de este ambiente marino [81].

Se han publicado diversos estudios sobre la diversidad bacteriana del GoM principalmente en relación con la degradación de hidrocarburos [82–84]. Entre los géneros bacterianos más abundantes en el GoM se encuentra *Pseudomonas*, cuyas especies se han descrito en diferentes entornos, como agua, suelo, animales y plantas [85]. Sin embargo, hasta el momento no se ha abordado la búsqueda de bacterias en el GoM que produzcan nuevos compuestos antimicrobianos.

1.11. Género *Pseudomonas*

Pseudomonas es uno de los géneros bacterianos más complejos, con un total de 259 especies descritas hasta la fecha. Sin embargo, este número está en constante evolución, con alrededor de 30 nuevas especies de *Pseudomonas* descritas entre los años 2020 y 2021 [86]. Las bacterias del género *Pseudomonas* son bacilos Gram-negativos, móviles, no formadores de esporas. Estas bacterias tienen una distribución amplia, siendo capaces de colonizar diferentes ambientes, incluidos el suelo, agua, plantas y animales. Además, tienen una capacidad metabólica versátil, pudiendo utilizar una variedad de compuestos inorgánicos como fuente de energía, aunado a esto, presentan una alta resistencia intrínseca a diferentes compuestos antimicrobianos de importancia clínica, veterinaria y agrícola. Son capaces de producir una gran cantidad de metabolitos secundarios con actividades biológicas diversas y algunas especies son patógenos oportunistas de plantas, hongos, insectos y animales [87,88].

Toda esta gama de características se ven reflejadas en la estructura del genoma de *Pseudomonas*. Las especies de *Pseudomonas* presentan una gran variabilidad

genética y metabólica, con la mayor parte de sus genes siendo específicos para cada especie o compartidos únicamente entre un subconjunto de ellas [89]. En los últimos años se ha propuesto la presencia de un conjunto de genes conservados (“*core genome*”) y un genoma accesorio, el cual es transmitido de manera horizontal y que contiene genes que le permiten la adaptación a nichos o condiciones ambientales específicas [90].

1.12. *P. aeruginosa*

Dentro del género *Pseudomonas* se encuentran algunas especies como *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae*, *P. alcaligenes* y *P. aeruginosa*. Dentro de estas, *P. aeruginosa* es el patógeno oportunista de origen ambiental más prevalente y una de las principales causas de infecciones nosocomiales, siendo clasificada dentro de la categoría “crítica” en la lista de patógenos prioritarios de la OMS, para los que se necesita investigación y desarrollo de nuevos antibióticos [6]. *P. aeruginosa* es capaz de generar infecciones agudas y crónicas debido a la amplia gama de factores de virulencia, lo que le confiere una notable flexibilidad y la capacidad de adaptarse a diferentes condiciones. Además, la efectividad de *P. aeruginosa* como patógeno se debe a su alta resistencia intrínseca y adquirida a los antibióticos. Esta última puede generarse tanto por la acumulación de mutaciones, particularmente durante infecciones crónicas, como por la adquisición de genes de resistencia [91].

Uno de los principales factores que contribuyen a la patogenicidad de *P. aeruginosa* es la presencia del sistema de secreción tipo 3 (SST3). Este sistema, codificado en el genoma, facilita la secreción de proteínas efectoras desde el citoplasma bacteriano hacia el citoplasma de la célula huésped, provocando una serie de cambios en esta última. En términos generales, el SST3 es una maquinaria proteica compleja que se asemeja a una jeringa molecular y consta de cinco elementos principales: una estructura en forma de aguja, un dispositivo de translocación, un sistema de regulación, chaperonas y proteínas efectoras [92]. *P. aeruginosa* secreta diferentes proteínas efectoras a través de su SST3. Estas proteínas pueden

interferir con la señalización celular, la respuesta inmunitaria y otros procesos celulares para favorecer la supervivencia de la bacteria [93].

Las proteínas efectoras de *P. aeruginosa* incluyen las toxinas ExoS, ExoT, ExoU y ExoY. Una vez translocadas al interior del citoplasma de la célula huésped, estas proteínas efectoras interactúan con los cofactores eucarióticos asociados. Los efectores ExoS y ExoT, los primeros en ser identificados en *P. aeruginosa*, son enzimas de doble función con actividad de GTPasas y ADP-ribosiltransferasa, desencadenando reorganizaciones en el citoesqueleto de la célula huésped. La actividad de estas proteínas genera citotoxicidad y favorece la reorganización de citoesqueleto limitando la fagocitosis [94]. ExoY es una proteína con actividad de nucleotidilil ciclasa de amplio espectro, la cual actúa rompiendo las uniones entre células endoteliales [95]. Por otro lado, ExoU es enzima potente con actividad de fosfolipasa, que tiene la capacidad de provocar una muerte celular rápida en células eucariotas [93]. Se ha vinculado a la toxina ExoU de *P. aeruginosa* con consecuencias graves en modelos de infección animal e infecciones humanas [96]. Interesantemente, las variantes clínicas y ambientales de *P. aeruginosa* muestran diferencia en los efectores del SST3 codificados en su genoma, lo cual define la fisiopatología de cada cepa o aislado específico. Se ha reportado que en los casos de infecciones agudas, el gen *exoS* está presente en aproximadamente un 65% de los aislados de *P. aeruginosa* evaluados, mientras que el gen *exoU* aparece en alrededor del 35%, *exoY* en aproximadamente el 90%, y *exoT* en el 100%. Por motivos que aún no se comprenden completamente, la mayoría de las cepas poseen o el gen *exoS* o el gen *exoU*, pero no ambos [93,97].

Adicionalmente, *P. aeruginosa* tiene la capacidad de formar biopelículas en tejidos vivos y superficies inertes, incluyendo catéteres y válvulas cardíacas. La biopelícula representa la principal forma de vida de las bacterias en el ambiente, donde están envueltas por una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS). Esta matriz puede proporcionar a las bacterias patógenas una estrategia para sobrevivir a condiciones adversas, como cambios de temperatura, escasez de nutrientes y la

acción de antibióticos, mientras que aumenta la capacidad de las bacterias para persistir en superficies tanto bióticas como abióticas [98]. La habilidad de formar biopelículas es uno de los rasgos primordiales de *P. aeruginosa*, siendo comúnmente observadas en individuos con infecciones crónicas. En *P. aeruginosa* y otras muchas bacterias, la formación de biopelículas es un importante factor tanto de virulencia como de resistencia a antibióticos [99,100].

Otros de los factores relacionados a la virulencia en *P. aeruginosa* son la producción de sideróforos y pigmentos como la piocianina. La piocianina es un compuesto nitrogenado aromático que pertenece a la categoría de las fenazinas tricíclicas. Presenta una tonalidad azul verdosa a pH neutro y alcalino, la cual cambia a un tono rosado rojizo en condiciones ácidas. La piocianina tiene la capacidad de aceptar electrones de agentes reductores, como NADH o glutatión reducido, y transferirlos a aceptores de electrones como el oxígeno [101]. Hasta la fecha, diversos estudios han evidenciado la importancia de la piocianina en la virulencia y patogenicidad de las infecciones causadas por *P. aeruginosa*, así como sus posibles efectos tóxicos. Se ha demostrado que esta molécula ejerce múltiples efectos adversos en el huésped, tanto en entornos *in vivo* como *in vitro*, incluyendo actividades pro inflamatorias y generación de radicales libres que provocan daño y muerte celular [102]. Sumado a esto, la producción de proteasas, particularmente la elastasa B (LasB), es otro factor relacionado a virulencia en *P. aeruginosa*. Esta proteasa, también llamada pseudolisina, es una metaloproteasa neutra (con cofactores Zn^{2+}/Ca^{2+}), la cual posee una marcada toxicidad que desencadena daño en los tejidos e infiltración y favorece la formación de biopelículas. Los efectos de LasB adquieren una relevancia considerable en el desarrollo de infecciones persistentes por *P. aeruginosa* [98,103].

Junto con los factores previamente citados, los ramnolípidos (RLs) también desempeñan un papel en la virulencia de *P. aeruginosa*. Los RLs son glicolípidos tensoactivos. Si bien durante mucho tiempo se consideró que *P. aeruginosa* era el principal productor de RLs, en años recientes se ha documentado que numerosas

especies bacterianas también los generan. Investigaciones indican que estas moléculas pueden tener diversas funciones derivadas de las propiedades fisicoquímicas conocidas de los RLs, como capacidad de humedecer, capacidad de actuar como detergente y otras cualidades relacionadas con su naturaleza anfipática [104]. Se ha comprobado que los RLs provocan la quimiotaxis directa de los neutrófilos, muestran efectos citotóxicos en los macrófagos humanos y en concentraciones más bajas pueden inhibir la respuesta fagocítica de los macrófagos. Los RL también intervienen en el desarrollo de biopelículas, induciendo la liberación de lipopolisacáridos, por tanto, aumentan la hidrofobicidad de la superficie celular, lo que puede favorecer la adhesión primaria de células planctónicas [105].

1.13. *S. aureus* resistente a meticilina

Dentro de la lista de bacterias resistentes a antibióticos catalogadas como patógenos prioritarios por la OMS, se encuentra *S. aureus*, particularmente las cepas resistentes al antibiótico meticilina, conocidas como MRSA [106]. *S. aureus* es un importante patógeno oportunista capaz de producir una diversidad impresionante de factores de virulencia. Estos incluyen una amplia gama de toxinas y mecanismos para evadir la respuesta inmunitaria, así como diversos factores proteicos y no proteicos que facilitan la colonización del huésped. Como resultado, puede provocar una variedad de infecciones, desde leves, como infecciones cutáneas, hasta graves, como bacteriemia, endocarditis, neumonía e infecciones quirúrgicas [107,108].

El éxito de *S. aureus* como patógeno humano también se debe a su notable capacidad de adaptación a la presión selectiva ejercida por los antibióticos. A lo largo del tiempo, ha desarrollado resistencia a casi todos los antibióticos utilizados para tratarlo. Específicamente, la resistencia a meticilina, identificada en 1981, se basa en la expresión de la transpeptidasa PBP2a con afinidad reducida hacia los β -lactámicos, incluidas las penicilinas. La transpeptidasa PBP2a está codificada por el gen *mecA* en el cromosoma. Estas cepas MRSA son responsables de infecciones

hospitalarias graves y se asocian con altas tasas de morbilidad y mortalidad [109,110].

Las tasas de resistencia a la metilicina entre los aislados clínicos de *S. aureus* varían considerablemente de un país a otro. Por ejemplo, en EE. UU., China y América Latina, las tasas de MRSA superan el 50%. Aunque en general la hospitalización asociada a MRSA está disminuyendo, en países en vías de desarrollo sigue aumentando. Incluso en EE. UU., la mortalidad causada por MRSA sigue siendo la más alta entre todas las enfermedades ocasionadas por bacterias resistentes a los antibióticos. Según el CDC, en 2018 hubo alrededor de 20,000 muertes relacionadas con infecciones ocasionadas por MRSA [111].

1.14. *Galleria mellonella*

Galleria mellonella, un insecto del orden *Lepidoptera* y de la familia *Pyralidae*, ha ganado relevancia como modelo experimental para evaluar la virulencia microbiana, la toxicidad de los compuestos y evaluar la efectividad de compuestos antimicrobianos [112]. La utilización de este modelo no requiere equipo especial de laboratorio y no necesita aprobación de comités de bioética [113].

Las características fisiológicas e inmunológicas de la larva son fundamentales para el éxito de este modelo. Las larvas pueden ser mantenidas a 37 °C, temperatura promedio de huéspedes mamíferos. El sistema inmune de *G. mellonella* tiene similitudes con la respuesta inmune innata de los mamíferos, lo que permite evaluar la virulencia de patógenos, generando resultados comparables con los de modelos animales [114].

1.15. Antecedentes

El Consorcio de Investigación del Golfo de México (CIGoM) se especializa en proyectos multidisciplinarios relacionados a posibles impactos ambientales de la industria del gas y petróleo en los ecosistemas marinos del Golfo de México. Estudios recientes del CIGoM han mostrado la presencia de gran diversidad de microorganismos en los sedimentos de aguas profundas del GoM. Además, han

proporcionado indicios sobre la adaptación de los mismos al ambiente con alto contenido de hidrocarburos [83].

En 2018 se publicó un estudio metagenómico de la diversidad bacteriana en el GoM. Sorprendentemente, este estudio permitió la identificación de diversos géneros de bacterias presuntamente patógenas en el GoM, como: *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Haemophilus*, *Halomonas*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shewanella*, *Vibrio* y *Yersinia*, en muestras de agua y sedimentos marinos [85]. Los resultados obtenidos revelan que factores naturales, antropogénicos y ecológicos influyen en la diversidad bacteriana del GoM. Algunas bacterias identificadas están en la lista de patógenos prioritarios de la OMS, lo que sugiere una posible relación con la RA o producción de compuestos antimicrobianos.

En nuestro grupo, en colaboración con el equipo de la Dra. Liliana Pardo López, miembro del CIGoM, estamos estudiando una colección de bacterias aisladas del GoM como posible fuente de nuevos compuestos antibacterianos. Asimismo, nos interesa conocer si cepas de *P. aeruginosa* presentes en el GoM tienen el mismo potencial patogénico y de RA que las cepas clínicas de esta bacteria.

Así, en el presente proyecto se plantean dos enfoques principales:

1. Identificación de bacterias del GoM productoras de compuestos con actividad antibacteriana, particularmente contra cepas MDR.
2. Caracterización de perfiles de resistencia a antibióticos y de propiedades de virulencia de cepas de *P. aeruginosa* aisladas del GoM.

2. HIPÓTESIS

El ambiente acuático del Golfo de México alberga bacterias que sintetizan nuevos compuestos antibacterianos contra bacterias patógenas como *S. aureus*, estas bacterias marinas pueden presentar resistencia a antibióticos y/o rasgos de virulencia.

3. OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar bacterias aisladas del GoM que produzcan compuestos antimicrobianos y determinar si cepas de *P. aeruginosa* aisladas del GoM presentan resistencia a antibióticos y si son potencialmente patógenas.

Objetivos específicos:

- Identificar bacterias del GoM que inhiban el crecimiento de patógenos prioritarios.
- Determinar la especie y caracterizar fenotípicamente a las bacterias de mayor interés que muestren actividad antibacteriana.
- Caracterizar parcialmente él o los compuestos con actividad antibacteriana.
- Determinar si las cepas de *P. aeruginosa* aisladas del GoM presentan propiedades de virulencia y de RA similares a las de las cepas clínicas de esta bacteria.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Diagrama general de trabajo

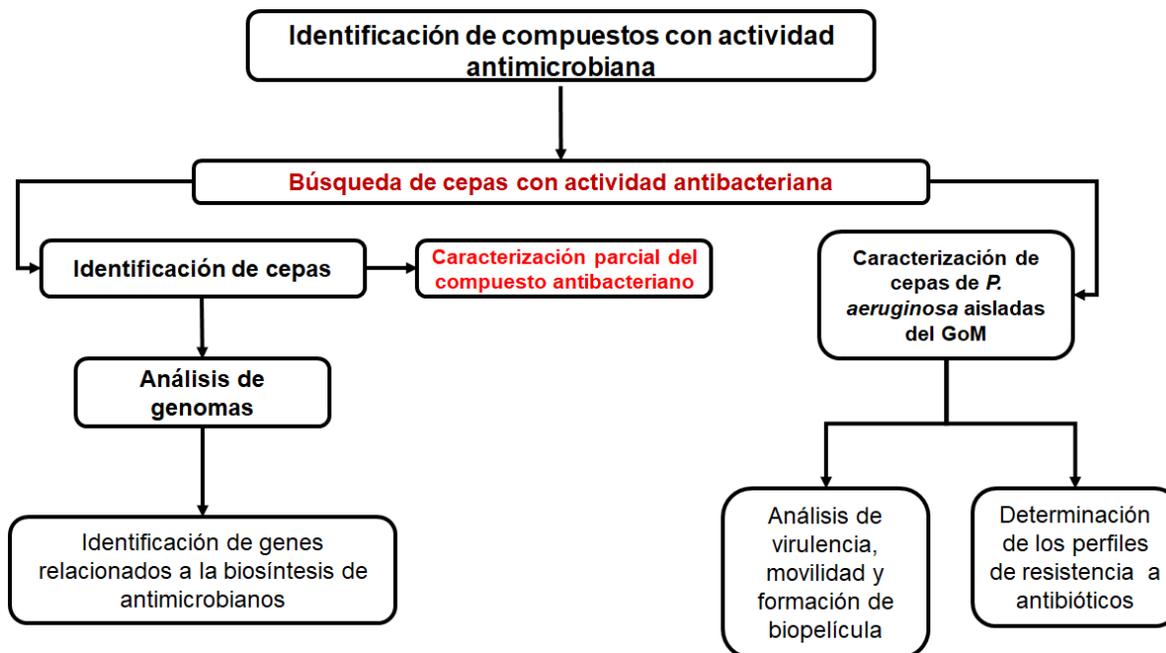


Figura. 2. Diagrama general de trabajo. Se muestra el diagrama general de trabajo de este proyecto.

4.2. Cepas bacterianas utilizadas

Las cepas marinas utilizadas en este estudio fueron proporcionadas por la Dra. Liliana Pardo López. Se analizaron ochenta y dos bacterias marinas aisladas previamente de sedimentos y muestras de agua del Golfo de México [82]. Entre ellas, *Pseudomonas* sp. GOM7 se obtuvo de una muestra de agua de mar obtenida a 55 m de profundidad (25° 38,199' N; 95°1,283' O) [82,83,115]. Las cepas bacterianas no marinas utilizadas en el estudio se describen en la Tabla 1. Los aislados resistentes a antibióticos de *S. aureus* provinieron de adultos jóvenes sanos (18-21 años), recolectados de exudados nasales o faríngeos en el periodo de 2019 a 2021, e identificados fenotípicamente mediante el sistema API®Staph (BioMérieux, Marcy l'Étoile, Francia). Los aislados clínicos de *P. aeruginosa* (P1165, P1483, P1503, P1546 y P1547) fueron obtenidos de diferentes pacientes durante su tratamiento en el Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra (INR), en la Ciudad de México, y fueron identificados en el laboratorio del hospital siguiendo los protocolos de rutina. Además, se utilizaron los aislados P6103 y P3536

previamente reportados [116,117]. Las cepas de referencia se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA).

Tabla. 1. Cepas bacterianas no marinas utilizadas en este proyecto.

| Bacteria | Características relevantes |
|--|-------------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | Cepa de referencia |
| <i>Escherichia coli</i> DH10 β | Cepa de referencia |
| <i>Escherichia coli</i> DH5 α | Cepa de referencia |
| <i>Salmonella enterica</i> serotype Typhimurium SL1344 | Cepa de referencia |
| <i>Klebsiella quasipneumoniae</i> ATCC 700603 | Cepa de referencia |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978 | Cepa de referencia |
| <i>Bacillus subtilis</i> 168 | Cepa de referencia |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 (ATCC 15692) | Cepa de referencia |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | Cepa de referencia |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 | Cepa de referencia |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14 | Cepa de referencia |
| <i>Enterococcus faecium</i> ATCC 19434 | Cepa de referencia |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 | Cepa de referencia |
| <i>S. aureus</i> ATCC 43300 | Cepa de referencia, MRSA. |
| <i>S. aureus</i> 8N2* | Obtenido de exudado nasal, MRSA. |
| <i>S. aureus</i> 4N34* | Obtenido de exudado nasal, MRSA. |
| <i>S. aureus</i> 14F4A* | Obtenido de exudado faríngeo, MRSA. |
| <i>S. aureus</i> 25F4* | Obtenido de exudado faríngeo, MRSA. |
| <i>S. aureus</i> 15N4* | Obtenido de exudado nasal, MRSA. |
| <i>S. aureus</i> 1N3* | Obtenido de exudado nasal, MRSA. |
| <i>S. aureus</i> 13F3* | Obtenido de exudado faríngeo, MRSA. |
| <i>S. aureus</i> 21F3* | Obtenido de exudado faríngeo, MRSA. |
| <i>S. aureus</i> 6N3* | Obtenido de exudado nasal, MDR. |

| | |
|---|---|
| <i>S. aureus</i> 18F1* | Obtenido de exudado faríngeo, MDR. |
| <i>S. aureus</i> 24N2* | Obtenido de exudado nasal, MDR. |
| <i>S. aureus</i> 25F2* | Obtenido de exudado faríngeo, MDR. |
| <i>S. aureus</i> 17F3* | Obtenido de exudado faríngeo, MDR. |
| <i>S. aureus</i> 17N3* | Obtenido de exudado nasal, MDR. |
| <i>P. aeruginosa</i> P6103^a | Obtenido de muestra del CMSXXI [116]. |
| <i>P. aeruginosa</i> P3536^a | Obtenido de muestra ambiental hospitalaria [117]. |
| <i>P. aeruginosa</i> P1165^b | Obtenido de hemocultivo. |
| <i>P. aeruginosa</i> P1483^b | Obtenido de aspirado endotraqueal. |
| <i>P. aeruginosa</i> P1503^b | Obtenido de muestra de tendón. |
| <i>P. aeruginosa</i> P1546^b | Obtenido de herida infectada. |
| <i>P. aeruginosa</i> P1547^b | Obtenido de urocultivo. |

*Cepas proporcionadas por el Dr. Jaime Bustos Martínez; ^aCepas proporcionadas por el Dr. Jesús Ulises Garza Ramos; ^bCepas proporcionadas por el Dr. Rafael Franco Cendejas.

4.3. Declaración de ética

El protocolo de muestreo para el aislamiento de *S. aureus* fue aprobado por el Comité de Ética de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM-Xochimilco (Documento: DCBS.CD.056.18). Todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito para participar como voluntarios. No se ofrecieron incentivos.

4.4. Medios de cultivo utilizados

Los cultivos bacterianos se crecieron en medio de lisogenia (LB), compuesto por 1% de triptona, 0.5% de extracto de levadura y 1% de NaCl, ajustado a un pH de 7.5. La producción cualitativa de piocianina se evaluó en el medio selectivo cetrimida

(Merck Millipore™), diseñado para favorecer el crecimiento de especies de *Pseudomonas* y estimular la producción de pigmentos como piocianina, pioverdina, piomelanina y fluoresceína. Este medio contiene 20 g de peptona de gelatina, 1.4 g de MgCl₂, 10 g de K₂SO₄ y 0.3 g de cetrimida por litro.

Para evaluar la actividad antibacteriana del sobrenadante liofilizado se utilizó el medio Mueller-Hinton (MH), que contiene 2% de extracto de carne, 1.75% de hidrolizado de caseína y 0.1% de almidón, ajustado a un pH de 7.5. Para determinar la susceptibilidad a antibióticos se adicionaron cationes Mg⁺⁺ y Ca⁺⁺ al medio MH. Se prepararon soluciones stock de CaCl₂ y MgCl₂ a una concentración de 10 mg mL⁻¹ y se añadieron 2.07 mL y 0.87 mL por litro de medio MH, respectivamente. El medio MH al que se le añadieron los cationes se conoce como medio MH ajustado con cationes (CAMHB).

4.5. Susceptibilidad a antibióticos de las cepas de *S. aureus*

Se determinó la sensibilidad a diferentes antibióticos de los aislados de *S. aureus* mediante el método de difusión en disco de Kirby-Bauer, siguiendo las recomendaciones del CLSI [118]. Los antibióticos analizados fueron ciprofloxacino (CIP), fosfomicina (FOS), trimetoprim/sulfametoxazol (TRS), penicilina (P), vancomicina (VAN), tetraciclina (TET), eritromicina (ERY), clindamicina (CLI), gentamicina (GEN) y cefalotina (CEF), adquiridos de Sigma-Aldrich. La resistencia a la meticilina se determinó mediante la medición de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de oxacilina (OXA) [119]. Los perfiles de susceptibilidad a los antibióticos se muestran en la Tabla 2.

Tabla. 2. Perfiles de susceptibilidad a antibióticos de las cepas de *S. aureus*.

| Cepas de <i>S. aureus</i> | CIP | FOS | TRS | P | VAN | TET | ERY | CLI | GEN | CEF | OXA (MIC) | CRA |
|---------------------------|-----|-----|-----|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----------|------|
| 8N2 | S | S | S | R | S | R | R | R | R | S | 8 | MRSA |
| 4N3A | S | S | S | R | S | S | S | R | S | S | 8 | MRSA |

| | | | | | | | | | | | | |
|-------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|------|
| 14F4A | S | S | S | R | S | S | R | S | S | S | 4 | MRSA |
| 25F4 | S | S | S | R | S | S | S | S | S | S | 4 | MRSA |
| 15N4 | S | S | S | R | S | S | R | R | S | S | 32 | MRSA |
| 1N3 | S | S | S | R | S | S | S | S | S | S | 4 | MRSA |
| 13F3 | S | S | S | R | S | S | S | S | S | S | 4 | MRSA |
| 21F3 | S | S | S | R | S | S | S | S | S | S | 4 | MRSA |
| 6N3 | S | S | S | R | S | R | R | S | S | S | 2 | MDR |
| 18F1 | S | S | S | R | S | S | R | R | S | S | 2 | MDR |
| 24N2 | S | S | S | R | S | R | R | R | R | S | 2 | MDR |
| 25F2 | S | S | S | R | S | R | R | R | S | S | <2 | MDR |
| 17F3 | S | S | S | R | S | S | R | R | S | S | <2 | MDR |
| 17N3 | S | S | S | R | S | S | R | R | S | S | <2 | MDR |

CIP= ciprofloxacino; FOS= fosfomicina; TRS= trimetoprim/sulfametoxazol; P= penicilina; VAN= vancomicina; TET= tetraciclina; ERY= eritromicina; CLI= clindamicina; GEN= gentamicina; CEF= cefalotina; La determinación de resistencia o sensibilidad a los antibióticos evaluados se indica con la letra R en color rojo o la letra S en color negro, respectivamente. CRA=Clasificación de resistencia a antibióticos; MRSA= *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. MDR= Multidrogo resistente. MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para oxacilina (OXA).

4.6. Búsqueda de actividad antibacteriana en las cepas aisladas del GoM

La capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano se evaluó mediante el método de colonia [59]. Las cepas indicadoras (no marinas) se cultivaron en LB a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) de 0.6 (aproximadamente 1×10^8 UFC mL^{-1}). Luego, se inocularon placas de agar LB con 5 mL de cada cultivo de cepa indicadora, posteriormente se retiró el cultivo y las placas se dejaron secar en esterilidad durante 5 min. Las bacterias productoras (marinas) se cultivaron durante la noche en LB a 37 °C. Posteriormente, se concentraron 3 mL de estos cultivos por centrifugación y se resuspendieron en 50 μL de LB estéril. Se aplicó una gota de 10

µL de las suspensiones de bacterias productoras en puntos equidistantes en las placas de agar LB previamente inoculadas con las cepas indicadoras. Las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C. La cepa *E. coli* DH10β se utilizó como control negativo de bacterias productoras. Como control positivo de inhibición se utilizó la cepa de *P. aeruginosa* PAO1, la cual produce el compuesto antibacteriano piocianina. La presencia de un halo de inhibición alrededor de la cepa productora indicó la presencia de actividad antibacteriana. Todas las cepas con actividad antibacteriana fueron seleccionadas como posibles candidatas para la identificación del compuesto antibacteriano.

4.7. Extracción orgánica del sobrenadante de cultivo

Los extractos orgánicos crudos de los sobrenadantes de cultivo se obtuvieron mediante la separación con solventes de diferentes polaridades, incluyendo *n*-hexano, cloroformo y acetato de etilo. Para ello, las cepas de *Pseudomonas* sp. GOM7 o *E. coli* DH10β fueron cultivadas en 200 mL de LB diluido (1:4) durante 48 h a 30°C con aireación. Las células bacterianas fueron eliminadas por centrifugación a 14,000 g durante 30 min a 4°C. Luego, se extrajeron 100 mL del sobrenadante con el solvente adecuado en una proporción de 5:1. La mezcla fue agitada enérgicamente durante 10 min y se dejó reposar durante 5-10 min. Después se obtuvo la fase orgánica y se repitió la extracción dos veces añadiendo solvente fresco a la fase acuosa. La fase orgánica se secó a temperatura ambiente en una campana de extracción y el polvo obtenido se almacenó hasta su utilización. Finalmente, los extractos orgánicos se disolvieron en una solución estéril de dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%, hasta alcanzar una concentración final de ~0.6 g mL⁻¹.

4.8. Determinación de la actividad antibacteriana

Para evaluar la actividad antibacteriana de los sobrenadantes de cultivo bacterianos, se liofilizaron los sobrenadantes de *Pseudomonas* sp. GOM7 o *E. coli* DH10β utilizando un sistema de liofilización de sobremesa FreeZone™ 2,5 de

Labconco™. El polvo obtenido se rehidrató con 5 mL de agua Milli-Q estéril, concentrándolo 40 veces. La actividad antibacteriana se determinó mediante un ensayo en placas de agar MH inoculadas con bacterias indicadoras, como se mencionó anteriormente. Se utilizaron puntas de micropipeta estériles de 1 mL para crear pocillos en las placas de agar. Luego, se cargaron 100 µL del sobrenadante liofilizado resuspendido en cada pocillo, y las placas se incubaron durante 24 h a 30°C. La presencia de un halo de inhibición alrededor de los pocillos se consideró positiva para la actividad antibacteriana en estos ensayos.

Para evaluar la viabilidad bacteriana en los extractos orgánicos se utilizaron métodos previamente descritos, con algunas modificaciones [120,121]. Se cultivó *S. aureus* ATCC 43300 en LB hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.6 (aproximadamente 1 x 10⁸ UFC mL⁻¹), luego se inocularon 10 µL de este cultivo en 1 mL del extracto orgánico solubilizado y las muestras se incubaron a 37 °C durante 5 h. Se cuantificaron las unidades formadoras de colonias (UFC) a los 0, 30, 60, 120, 180 y 300 min después de la inoculación, mediante cuentas viables en placas de agar LB. Los extractos orgánicos de la cepa *E. coli* DH10β y el crecimiento en medio LB se utilizaron como control negativo en estos ensayos.

4.9. Cromatografía en capa fina

El análisis de los compuestos presentes en las fracciones orgánicas se realizó mediante cromatografía en capa fina (TLC). De manera breve, se utilizó una placa cromatográfica TLC Sílica gel 60 F₂₅₄ (Supelco®) de 4cm x 8 cm. Las muestras a evaluar se prepararon disolviendo 3 mg de los extractos orgánicos obtenidos en 1 mL de metanol. Las muestras se aplicaron en la placa mediante un capilar de vidrio (1.15 mm de diámetro) a una distancia de 0.5 cm del borde inferior de la placa. Se aplicaron 15 gotas de cada uno de los extractos evaluados, dejando secar entre cada gota. Una vez aplicada la muestra se procedió a hacer la separación cromatográfica, para esto, una cámara cromatográfica fue saturada con 10 mL de la fase móvil. Se utilizaron 2 fases móviles: 1) Butanol-Ácido acético-Agua (BAW) en una proporción 4:1:5; o 2) Acetato de etilo-Ácido fórmico-Ácido acético-Agua

(EFAW) en proporción 50:5.5:5.5:13. La placa preparada anteriormente se colocó dentro de la cámara y la separación de compuestos se desarrolló durante aproximadamente 15 min, de modo que la longitud de corrida de la fase móvil llegara aproximadamente 1 cm antes del borde superior, distancia que permitió observar la separación de grupos de compuestos de acuerdo a la polaridad. Posteriormente se dejó secar la placa a temperatura ambiente en la campana de extracción y se observó bajo la luz de una lámpara UV a 234 nm.

4.10. Cuantificación de la producción de piocianina

La producción de piocianina se determinó inicialmente cultivando las cepas bacterianas en agar cetrimida (Merck Millipore™); las bacterias que formaron colonias verdes-azules se consideraron productoras de piocianina. Posteriormente, la cuantificación de la piocianina en el sobrenadante de los cultivos se realizó como se ha descrito con anterioridad [122]. Las cepas productoras de piocianina se cultivaron en LB durante 24 h en agitación, la extracción del pigmento se realizó mezclando vigorosamente 5 mL del sobrenadante de cultivo con 3 mL de cloroformo, y dejando reposar durante 5 min hasta la separación de las fases. Luego, se recuperó la fase orgánica (azul) y se transfirió a un tubo limpio donde se le agregó 1 mL de HCl 0.2 N. La solución rosa-roja resultante se transfirió a una celda y se cuantificó la absorbancia a 520 nm en un espectrofotómetro (BioSpectrometer Eppendorf™), utilizando HCl 0.2 N como blanco. La concentración de piocianina en $\mu\text{g mL}^{-1}$ se calculó multiplicando la absorbancia por el coeficiente de extinción molar específico del pigmento (17.072).

4.11. Cuantificación de la formación de biopelícula

La cuantificación de biopelícula se realizó en una microplaca de poliestireno con fondo plano de 96 pozos (Costar® 3599; Corning Incorporated), mediante el método descrito por Stepanovic, con algunas modificaciones [123]. A partir de un cultivo de toda la noche en medio LB, se realizó una dilución 1:100 con medio LB fresco. 200 μL de esta suspensión bacteriana se inocularon en los pozos de la microplaca.

Luego, las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. Después de la incubación, se removió el medio y los pozos se lavaron tres veces con 200 µL de PBS estéril. La biopelícula adherida se fijó con metanol y se tiñó con cristal violeta al 2% durante 10 min. Posteriormente, se retiró el colorante de los pozos y se eliminó el exceso con lavados consecutivos con PBS estéril. Finalmente, la biopelícula adherida se solubilizó con ácido acético al 33% y se cuantificó la densidad óptica a 570 nm (DO_{570}) utilizando un lector de placas Epoch™ 2 (Biotek™). Los ensayos se realizaron por triplicado.

Para la interpretación de los resultados se estableció un valor de corte (DO_c), el cual se define como tres desviaciones estándar por arriba del valor promedio de la DO_{570} del control negativo: $DO_c = DO_{570}$ promedio del control negativo + ($3 \times SD$ del control negativo). La densidad óptica final (DO_f) para cada cepa evaluada se estableció como el valor promedio de la DO_{570} menos el valor de corte: $DO_f = DO_{570}$ promedio – valor DO_c . Las cepas evaluadas fueron clasificadas siguiendo los siguientes criterios:

Tabla. 3. Criterio de clasificación de formación de biopelícula.

| Criterio | Clasificación |
|---|-----------------------------------|
| $OD_f \leq OD_c$ | No productor de biopelícula |
| $OD_c < OD_f \leq 2 \times OD_c$ | Productor débil de biopelícula |
| $2 \times OD_c < OD_f \leq 4 \times OD_c$ | Productor moderado de biopelícula |
| $OD_f > 4 \times OD_c$ | Productor fuerte de biopelícula |

OD_c = Valor de corte; OD_f = Densidad óptica final.

4.12. Ensayos de proteasas

La actividad proteolítica de las cepas de fue detectada como zonas de hidrolisis en placas de agar-leche descremada al 10% [124]. Las cepas a evaluadas fueron inoculadas en placas de agar-leche descremada, las cuales fueron incubadas durante 18 h a 37 °C.

La actividad de elastasa se determinó utilizando el ensayo de Elastasa-Rojo Congo, como se ha descrito anteriormente [125]. Las cepas a evaluar se cultivaron en medio LB a 37 °C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.6, luego, se recuperó el sobrenadante de cultivo y se almacenó a -20°C hasta su uso. Para la reacción, se pesaron 5 mg de elastina rojo-congo (Sigma Aldrich™) y se colocaron en tubos de 1.5 mL limpios. A estos tubos se les adicionaron 850 µL de PBS 10 mM pH 7.5 y 150 µL de los sobrenadantes obtenidos con anterioridad. Como control negativo, se utilizó LB fresco, el cual se añadió a un tubo de reacción. Los tubos se incubaron a 37 °C durante 3 h y posteriormente se centrifugaron a 4 °C para obtener el sobrenadante. La actividad elastolítica se calculó midiendo la densidad óptica del sobrenadante a 495nm utilizando un espectrofotómetro (BioSpectrometer Eppendorf™). Se utilizó el control negativo como blanco.

4.13. Ensayos de patogenicidad

Para evaluar la virulencia de las cepas bacterianas de *P. aeruginosa* se evaluó la patogenicidad en el modelo de larva del gusano de cera *Galleria mellonella*, el cual se ha utilizado para evaluar infecciones producidas por bacterias [113]. El ensayo con las larvas se realizó mediante la modificación del protocolo indicado por Loh y colaboradores en 2013 [126].

Para criar las larvas, se utilizó una dieta artificial que consiste en 97.5 mL de miel de abeja, 120 mL de glicerol estéril, 37.5 g de salvado de trigo estéril, 300 g de cereal seco para lactantes de arroz Gerber® y 75 g de levadura amarga. Todos los componentes de la dieta se mezclaron y distribuyeron en recipientes de polipropileno de 1 L con tapa (Reyma®). Los huevecillos fueron colocados en la dieta recién preparada para su eclosión en recipientes mantenidos a temperatura ambiente. Luego de completar los estadios larvales y la formación de pre-pupas y pupas, se recolectaron los imagos (insectos adultos) y se trasladaron a nuevos recipientes para la obtención de nuevos huevos.

Para realizar los ensayos de infección se seleccionaron larvas de 2-3 cm de longitud, con un peso aproximado de 180-250 mg, las cuales se mantuvieron sin

alimento durante 24 h. Para la infección se utilizaron grupos de 10 larvas por cada una de las cepas a evaluar.

Las cepas bacterianas a evaluar se cultivaron en medio LB a 37 °C hasta alcanzar una DO_{600} de 0.6 (equivalente a 1×10^8 UFC mL⁻¹). A continuación, las bacterias fueron obtenidas mediante centrifugación y se lavaron con PBS 1X estéril. Luego, se resuspendieron en PBS estéril hasta obtener una DO_{600} de 0.6. Para la inoculación de las larvas se realizaron diluciones en PBS 1X estéril, ajustando el número de UFCs requeridas. La cantidad de UFC en cada dilución se comprobó mediante cuentas viables en agar LB.

Los grupos de larvas fueron infectadas con un inóculo de 10 µL de los cultivos ajustados a concentraciones que van de $\approx 1 \times 10^2$ a $\approx 1 \times 10^6$ UFC mL⁻¹. La inoculación de las larvas se realizó en la última pro-pierna izquierda utilizando una jeringa de insulina U-1000 (BD Ultra-fine 6mm™). Cada grupo de larvas inoculadas fue incubado a 30 °C en cajas Petri estériles de 9 cm sin alimento y su supervivencia fue evaluada durante 5 días.

4.14. Producción de ramnolípidos

Las cepas se cultivaron toda la noche en medio LB a 37 °C. A partir de este cultivo, se inocularon matraces con medio PPGAS [127], a una DO_{600} inicial de 0.1, y se incubaron durante 24 h a 37 °C. Después de la incubación se obtuvo el sobrenadante mediante centrifugación durante 10 min a 4 °C. Posteriormente, se ajustó el pH del sobrenadante a 2.0 mediante la adición de HCl concentrado. Luego, se mezclaron 5 mL de este sobrenadante con 5 mL de una mezcla de cloroformo-metanol (2:1) y se agitaron vigorosamente durante 15 min. Se recolectó la fase orgánica (inferior) en tubos de polipropileno y el solvente se dejó evaporar en la campana de extracción. Este proceso se repitió una vez más. Una vez evaporado todo el solvente, se adicionaron 100 µL de metanol para disolver el extracto. Los ramnolípidos presentes en los extractos fueron detectados mediante cromatografía en capa fina (TLC) siguiendo el método descrito por Matsuyama [128].

4.15. Secreción y detección de ExoS y ExoU

Las cepas se cultivaron toda la noche en medio LB a 37 °C. A partir de este cultivo, se inocularon matraces de 125 mL con 15 mL de medio inductor (LB + 20 mM Mg₂Cl + 5 mM EGTA) a una DO₆₀₀ inicial de 0.5. Los matraces se incubaron a 37 °C con agitación hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 1.5. Luego, se tomaron alícuotas de 1 mL y se centrifugaron a 14,000 g y 4°C, durante 2 min. La fracción soluble se transfirió a un tubo estéril y se centrifugó nuevamente. Posteriormente, se separaron 900 µL de la fracción soluble y se añadieron 100 µL de ácido trifluoroacético (TCA) al 100% y esta mezcla se incubó a 4 °C durante 16 h para precipitar las proteínas.

Las proteínas precipitadas se concentraron por centrifugación durante 15 min a 14,000 g, se desechó el sobrenadante y las proteínas se disolvieron con buffer Laemmli 1x normalizado con la DO₆₀₀ al momento de la toma. Después, las muestras fueron desnaturalizadas a 95 °C durante 5 min. La separación de proteínas se realizó en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% siguiendo los protocolos de Bio-rad.

Este gel se utilizó para detectar ExoS y ExoU mediante Western Blot, siguiendo el protocolo previamente descrito [129]. Primero, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.2 µm (Millipore) en una cámara de transferencia semi-seca (Bio-Rad) durante 2 h a 4°C. Las membranas con las proteínas transferidas se bloquearon con leche descremada al 10% (Blotto Chem-Cruz, Santa Cruz Biotechnology) a 4°C durante toda la noche. Los lavados posteriores se realizaron con TBS-T (20 mM Tris-base, 1.5 M NaCl, pH = 7.4, 1% Tween 20).

Luego, las membranas se incubaron con los anticuerpos policlonales anti-ExoS o anti-ExoU, además de anti-GroEL (Sigma), todos diluidos 1:10,000 en TBS-T, y se incubaron a 4°C durante 1 hora con agitación. Después de este tiempo, las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T con agitación durante 10 min. Las membranas se revelaron con el sustrato quimioluminiscente HRP luminol Super Signal (Thermo Scientific).

4.16. Determinación de la susceptibilidad a antibióticos

La susceptibilidad a antibióticos de las cepas de *P. aeruginosa* fue evaluada mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) usando el método de micro dilución en placa [130,131], de acuerdo con las especificaciones indicadas en el manual del CLSI.

Para realizar los ensayos, a partir de un cultivo de toda la noche en LB a 37 °C, las células de 3 mL de cultivo fueron concentradas mediante centrifugación y lavadas con PBS 1X estéril. La pastilla celular se resuspendió en PBS estéril y se ajustó a una turbidez de 0.5 del nefelómetro de McFarland ($1-2 \times 10^8$ UFC mL⁻¹). Inmediatamente después de la preparación de la suspensión a 0.5 de McFarland, se realizó una dilución 1:20 en medio Müller-Hinton (MH), en un volumen final de 1 mL (50 µL de MH + 950 µL del cultivo a 0.5 de McFarland), para producir 5×10^6 UFC mL⁻¹, posteriormente estas diluciones se utilizaron para inocular las microplacas de 96 pozos.

Se seleccionaron los siguientes antibióticos: ceftazidima (CAZ), piperacilina (PIP), meropenem (MER), norfloxacin (NOR), ciprofloxacino (CIP), gentamicina (GEN), Imipenem (IPM) y amikacina (AMK). Estos antibióticos son recomendados para el tratamiento de infecciones ocasionadas por *P. aeruginosa* [132]. Los antibióticos seleccionados fueron adquiridos de Sigma-Aldrich.

Para preparar las soluciones de antibióticos, se pesó 0.00512 g del antibiótico seleccionado y se disolvió en 1 mL de diluyente apropiado, obteniendo una concentración de 5,120 µg mL⁻¹. Luego, las soluciones se esterilizaron por filtración con un filtro de 0.22 µm (MILLEX® GV, Millipore™) y se repartieron en alícuotas de 100 µL, las cuales se almacenaron en tubos estériles a una temperatura de -20°C. Los antibióticos sensibles a la luz se guardaron en tubos estériles de color ámbar.

Los ensayos de susceptibilidad se llevaron a cabo en placas de 96 pozos. Se probaron diferentes concentraciones de cada antibiótico siguiendo las recomendaciones del CLSI. Para ello, se realizaron diluciones de los antibióticos a evaluar utilizando medio CAMHB como diluyente, obteniendo así las concentraciones deseadas. Luego, se agregaron 100 µL de los antibióticos

ajustados a cada pozo, y se inocularon 10 µL de las suspensiones bacterianas preparadas previamente. Como control de esterilidad se inocularon los pozos con medio CAMHB esteril. Las placas fueron incubadas durante 18 h a 37 °C.

Para la interpretación de la prueba, se analizaron los controles de esterilidad y el crecimiento de las cepas control (*E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853) para validar que se encontraran dentro de los parámetros establecidos por el CLSI. Luego, para determinar la MIC se realizó un análisis visual del crecimiento de las cepas experimentales y se midió la DO₆₀₀. Las cepas se clasificaron como susceptibles, con susceptibilidad intermedia o resistente a los antibióticos evaluados, según los puntos de corte establecidos en el CLSI. Cada ensayo se realizó por triplicado para cada uno de los antibióticos evaluados.

4.17. Identificación de asilados bacterianos mediante el análisis de la secuencia del gen rRNA 16S

Para la identificación de las cepas bacterianas, el DNA genómico se purificó a partir mediante el método descrito por Sambrook con algunas modificaciones [133]. Para ello, se utilizaron 3 mL de cultivos bacterianos obtenidos después de una noche de incubación en medio LB a 37°C.

Para la secuenciación del gen rRNA16S, se llevó a cabo una PCR utilizando el DNA genómico purificado, los oligonucleótidos universales fD1 y rP2 (Tabla 4), y la DNA polimerasa GoTaq Flexi (Promega, Wisconsin, Estados Unidos). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 95 °C durante 10 min, seguido de 30 ciclos de 95 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min y 72 °C durante 1 min 30 s, con una extensión final a 72 °C durante 10 min. Los productos de PCR se purificaron utilizando el kit DNA Clean & Concentrator de Zymo Research (Irvine, CA, Estados Unidos) y luego se sometieron a secuenciación por el método Sanger en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología (IBt) / UNAM. Las secuencias resultantes se procesaron utilizando Chromas v.2.6.6 (<http://technelysium.com.au/wp/chromas/>) para su limpieza, se ensamblaron mediante CAP en BioEdit v7.1 [134] y se anotaron mediante una búsqueda BLASTN

en la base de datos del NCBI de secuencias de RNA ribosomal 16S para Bacterias y Archaea, además de la base de datos EZBioCloud [135,136].

Tabla. 4. Oligonucleótidos utilizados para la identificación de cepas bacterianas.

| Oligonucleótido | Secuencia (5'-3') | Tm | Fuente |
|-----------------|----------------------|----|--------|
| 16s-fD1 | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG | 60 | [137] |
| 16s-rP2 | CGGCTACCTTGTTACGACTT | 64 | [137] |

4.18. Secuenciación del genoma de la cepa de *Pseudomonas* sp. GOM7

Para la secuenciación del genoma de *Pseudomonas* sp. GOM7, el DNA total se purificó utilizando el Kit ZymoBiomics™ DNA Miniprep de Zymo Research (Irvine, CA, Estados Unidos), según lo descrito por el fabricante. Para ello se utilizaron cultivos de 24 h en medio LB diluido 1:4 a 37 °C.

La secuenciación del genoma se realizó mediante una combinación de las plataformas Illumina MiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) y Oxford Nanopore Technologies MinION en la Unidad de Secuenciación Masiva del IBt / UNAM. Para la secuenciación Illumina se utilizó el kit Nextera (Illumina, Inc.) y se generaron fragmentos de un tamaño medio de 500 pb. Posteriormente, Se obtuvieron 556,352 lecturas paired-end con una longitud de 300 pb utilizando un kit de secuenciación de 600 ciclos. La calidad de las lecturas se evaluó con FastQC v0.11.9 [138] y las secuencias se filtraron con una calidad $\geq Q20$ mediante Trimmomatic v0.39 [139]. Para la secuenciación Nanopore, se prepararon bibliotecas utilizando el kit SQK-LSK109 y se multiplexaron con el kit de códigos de barras EXP-NBD104. Las bibliotecas se cargaron en una celda de flujo R9.4.1. Para demultiplexar las lecturas y asignar las bases se utilizó Guppy v4.4.1 [140]. Luego, se recortaron los adaptadores y se separaron los códigos de barras mediante Porechop v0.2.4 (<https://github.com/rrwick/Porechop>). La calidad de las lecturas se evaluó con NanoPlot v1.30.1 [141]. La secuenciación, ensamblaje y anotación del genoma de *Pseudomonas* sp. GOM7, así como los análisis bioinformáticos del genoma fueron

realizados en colaboración con el Dr. Jorge Rojas Vargas del grupo de trabajo de la Dra. Liliana Pardo.

4.19. Ensamblaje, anotación y análisis del genoma de *Pseudomonas* sp. GOM7

El ensamblaje del genoma *de novo* se realizó con el ensamblador Unicycler v0.4.8 utilizando los parámetros predeterminados [142]. El análisis de la calidad del ensamblaje se realizó con QUAST v4.0 [143] y la integridad y contaminación se evaluaron con CheckM v1.1.3 [144]. El genoma completo de *Pseudomonas* sp. GOM7 se cargó en el servidor web BV-BRC (<https://www.bv-brc.org/>) para la predicción de genes y la anotación funcional con RASTtk [145].

Este genoma también se examinó en busca de grupos de genes biosintéticos de metabolitos secundarios utilizando la herramienta en línea antiSMASH v6.1.1 con parámetros predeterminados [146] y la comparación entre genes se realizó con el programa Clinker [147].

Para el análisis genómico comparativo se examinó el genoma de *Pseudomonas* sp. GOM7 junto con los genomas de *Pseudomonas* más cercanos, seleccionados mediante criterios filogenómicos descritos más adelante. Se determinó el número de familias de genes compartidas por los genomas utilizando el software CMG BioTools v2.2 [148]. Además, se llevaron a cabo análisis de sintenia de los genomas mediante el software Sibelia v3.0.7 [149], utilizando un tamaño mínimo de bloque de 20,000 pb. Los bloques sinténicos resultantes fueron visualizados en Circos [150].

4.20. Identificación taxonómica y filogenia de la cepa *Pseudomonas* sp. GOM7

Para identificar los genomas más cercanos a *Pseudomonas* sp. GOM7 se utilizó GTDBtk v2.0.0106 con la base de datos de referencia GTDB R207 que contiene 317,542 genomas (al 9 de abril de 2022) y el comando `de_novo_wf` [151]. Se

emplearon diversos criterios filogenómicos para la definición de especies bacterianas utilizando como comparación los genomas más cercanos predichos por GTDBtk. Los criterios utilizados fueron los siguientes: 1) distancia del genoma (Mash-D < 0.05) estimada por el programa Mash [152]; 2) promedio de identidad de nucleótidos basado en MUMmer (ANIm > 95%) por JSpeciesWS [153]; 3) promedio de identidad de aminoácidos (AAI > 96%) con la herramienta CompareM (<https://github.com/dparks1134/CompareM>); 4) fórmula d4 de hibridación digital DNA-DNA (dDDH > 70%) y diferencia porcentual del contenido de G+C (< 1%), ambos calculados por TYGS [154]. Se utilizó el genoma de *Azotobacter vinelandii* cepa DSM 279 (GCA_900119555.1) como grupo externo, descargado del NCBI (consultado el 13 de marzo de 2023).

4.21. Identificación de integrones clase 1

Se utilizó el DNA genómico de cada aislado de *P. aeruginosa* como molde para amplificar por PCR un fragmento del gen *intl1*, utilizando los oligonucleótidos HS463a y HS464 (Tabla 5) [155]. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con la enzima GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega, Wisconsin, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante. El proceso de amplificación consistió en un clico a 95 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C durante 30 s, 95 °C durante 1 min, 60 °C durante 30 s y 72 °C durante 90 s, con una extensión final a 72 °C durante 5 min. Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en agarosa al 0.8%.

Tabla. 5. Oligonucleótidos utilizados para la identificación de integrones clase 1.

| Oligonucleótido | Secuencia (5'-3') | Tm | Fuente |
|-----------------|------------------------|----|--------|
| HS463a | CTGGATTTTCGATCACGGCACG | 59 | [155] |
| HS464 | ACATGCGTGTAATCATCGTCG | 57 | [155] |

4.22. Análisis estadístico

Los resultados se expresan como el promedio \pm desviación estándar. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software GraphPad Prism versión 8.0.1 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.). Se empleó el análisis de varianza de una vía (ANOVA), junto con la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett o la prueba de Log-Rank, según corresponda. Los valores de $P < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

5. RESULTADOS

5.1. Identificación de bacterias productoras de antibacterianos

En un estudio previo, se aisló una colección de bacterias del GoM, la cual fue analizada para evaluar su capacidad de degradar hidrocarburos [82]. En este trabajo nos enfocamos en analizar esta misma colección de bacterias marinas en busca de posibles fuentes de antibióticos. Evaluamos la actividad antibacteriana de un total de 82 bacterias aisladas del GoM frente a las cepas de referencia *A. baumannii* ATCC 17978, *S. enterica* serotipo Typhimurium (*S. Typhimurium*) SL1344, *S. aureus* ATCC 29213 y *E. coli* ATCC 25922, mediante el ensayo de colonia. Los resultados revelaron halos de inhibición del crecimiento alrededor de colonias de bacterias marinas, en las placas de agar LB que contenían las cepas indicadoras, lo cual indica la producción de compuestos antimicrobianos (Fig. 3). El tamaño de los halos de inhibición producidos varió según las cepas evaluadas (Fig. 3). Se consideró positiva la actividad inhibitoria independientemente del tamaño del halo. Como control, en estos ensayos se utilizó la cepa *E. coli* DH1 β 0, ya que no generó inhibición contra ninguna de las cepas evaluadas.

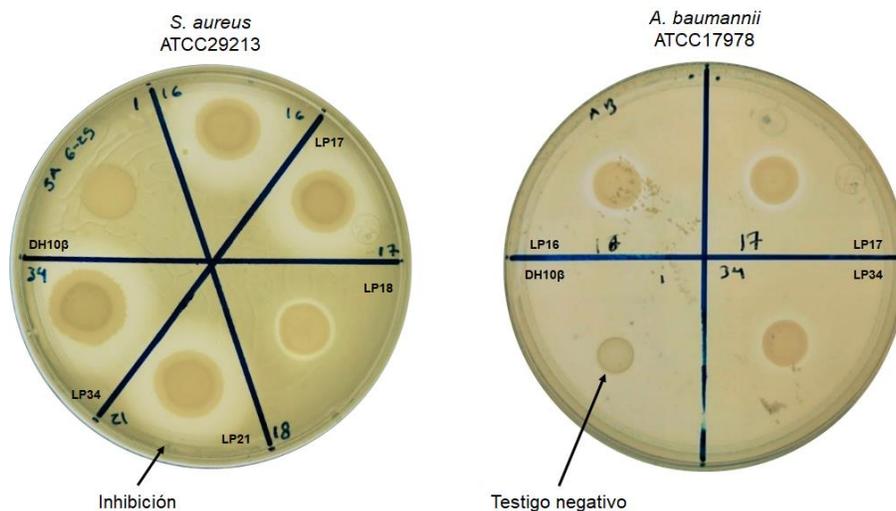


Figura. 3. Identificación de bacterias productoras de antibacterianos. Se muestran imágenes representativas de los ensayos de inhibición para la identificación de cepas productoras de antibacterianos. Las figuras muestran ensayos realizados sobre un césped de las cepas indicadoras *S. aureus* ATCC29213 y *A. baumannii* ATCC17978. Los ensayos se realizaron en placas de agar LB y fueron incubadas a 37 °C. Se muestra la actividad de las cepas marinas LP16, LP17, LP18, LP21 y LP34. La cepa *E. coli* DH10 β fue utilizada como control negativo.

En total, de la colección de 82 cepas del GoM, se identificaron 8 con la capacidad de generar halos de inhibición del crecimiento en las cepas patógenas evaluadas. Estas cepas marinas fueron: LP16, LP17, LP18, LP21, LP34, LP35, LP36 y LP89 (Tabla 6). 4 (LP16, LP17, LP18, LP21) de estas 8 cepas fueron obtenidas a 55 m de profundidad, 3 (LP34, LP35, LP36) fueron recolectadas de muestras extraídas a 1000 m de profundidad y la cepa LP89 fue obtenida a partir de una muestra recolectada a 30 m de profundidad.

Tabla. 6. Espectro de actividad antibacteriana de cepas marinas contra cepas de referencia de bacterias patógenas.

| Cepas | Profundidad de aislamiento (m) | AB | SA | KP | EC | STM | Actividad a 37 °C | Actividad a 30 °C |
|-------|--------------------------------|----|----|----|----|-----|-------------------|-------------------|
| LP16 | 55 | + | + | + | + | + | + | + |
| LP17 | 55 | + | + | + | + | + | + | + |
| LP18 | 55 | - | + | - | + | + | + | + |
| LP21 | 55 | + | + | + | + | + | + | + |
| LP34 | 1000 | + | + | + | + | + | + | + |
| LP35 | 1000 | + | + | + | + | + | + | + |
| LP36 | 1000 | + | + | + | + | + | + | + |
| LP89 | 30 | + | + | + | + | + | + | + |

Cepas evaluadas: AB= *A. baumannii*; SA= *S. aureus*; KP= *K. pneumoniae*; EC= *E. coli*; STM= *S. Typhimurium*; += inhibición del crecimiento; -= sin inhibición de crecimiento.

Se realizó una evaluación de la inhibición generada por las 8 cepas seleccionadas a 37°C y 30°C, con el propósito de determinar si en alguna de estas temperaturas se observaba mayor actividad. Los resultados obtenidos en ambas temperaturas fueron consistentes y similares (Tabla 6). En conjunto, estos resultados demuestran la actividad antibacteriana de estas 8 cepas contra cepas patógenas e indican que existen bacterias en el GoM que producen compuestos con actividad antibacteriana.

5.2. Identificación taxonómica de las cepas marinas con actividad antibacteriana mediante secuenciación del gen rRNA 16S

El análisis de la secuencia del gen rRNA ribosomal 16S es ampliamente empleado para la identificación de géneros bacterianos [137]. Para la identificación de las

cepas productoras de compuestos antibacterianos se realizó la secuenciación y análisis del gen rRNA 16S. Cabe destacar que la cepa LP16 (GOM1) ya había sido previamente identificada y reportada como *P. aeruginosa* [82]. Nuestros análisis permitieron determinar que siete de estas cepas corresponden a *P. aeruginosa*, mientras que la cepa LP18 fue identificada como *Pseudomonas sihuiensis*. Los detalles de la identificación de cada cepa se presentan en la tabla 7.

Tabla. 7. Identificación de las cepas productoras de antibacterianos mediante la secuenciación y análisis del gen rRNA 16S.

| Cepas | Especie identificada | Identidad (%) | Cobertura (%) |
|-------|-------------------------------|---------------|---------------|
| GOM1* | <i>P. aeruginosa</i> | 99.93 | n.d. |
| LP17 | <i>P. aeruginosa</i> | 100 | 100 |
| LP18 | <i>Pseudomonas sihuiensis</i> | 98.94 | 100 |
| LP21 | <i>P. aeruginosa</i> | 100 | 100 |
| LP34 | <i>P. aeruginosa</i> | 99.71 | 99 |
| LP35 | <i>P. aeruginosa</i> | 99.76 | 99 |
| LP36 | <i>P. aeruginosa</i> | 99.14 | 96 |
| LP89 | <i>P. aeruginosa</i> | 99.66 | 99 |

El análisis de la secuencias se realizó utilizando la base de datos de EZBioCloud; n.d. no determinado. * Cepa marina de *P. aeruginosa* reportada por Muriel-Millán *et al.*, 2019 [82].

5.3. Selección de la cepa LP18 como candidata para caracterización

Estudios previos han evidenciado que las cepas de *P. aeruginosa* tienen la capacidad de producir piocianina, un pigmento derivado de las fenazinas con propiedades antibacterianas [156]. Como parte de la caracterización inicial de los ocho aislados marinos de *Pseudomonas* con actividad antibacteriana, se realizó una evaluación cualitativa de la producción de piocianina en agar cetrimida. Los resultados demostraron que las siete cepas identificadas como *P. aeruginosa* no solo son capaces de crecer en este medio, sino también de sintetizar piocianina con diferentes niveles de producción (Fig. 4). En contraste, la cepa LP18 tuvo un crecimiento limitado, en comparación con las cepas de *P. aeruginosa*, sin producción de piocianina (Fig. 4).

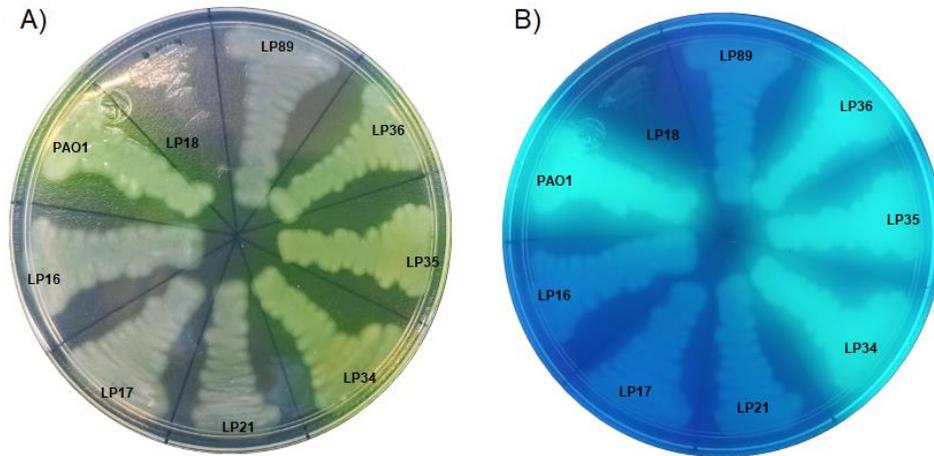


Figura. 4. Producción de piocianina de las bacterias aisladas del GoM en agar cetrimida. Se muestran el crecimiento de las cepas de *Pseudomonas* aisladas del GoM en agar cetrimida durante 18 h a 37 °C. **A)** Se observa un pigmento difusible azul-verdoso en el crecimiento de las cepas relativo al pigmento piocianina característico de las cepas de *P. aeruginosa*. **B)** Se observa la producción de pigmentos bajo luz UV para evidenciar la presencia de pigmentos como fluoresceína.

Así, la cepa LP18 fue la única en exhibir actividad antibacteriana no atribuida a la producción de piocianina. La ausencia de este pigmento sugiere, además, que esta bacteria no corresponde a la especie *P. aeruginosa*. En virtud de esto, procedimos a llevar a cabo la secuenciación y anotación del genoma de la cepa LP18. El análisis genómico posterior, reveló que la cepa LP18 representa una nueva especie dentro del género *Pseudomonas*, la cual denominamos *Pseudomonas* sp. GOM7 (GOM7).

Estos hallazgos iniciales orientaron nuestro proyecto hacia dos enfoques fundamentales: 1) la caracterización de la actividad antibacteriana de la cepa GOM7 y 2) el análisis de las propiedades de virulencia y resistencia a antibióticos de las cepas de *P. aeruginosa* aisladas del GoM. Estas perspectivas se exploran detalladamente en las secciones siguientes.

5.4. *Pseudomonas* sp. GOM7 muestra actividad inhibitoria contra cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos.

Se realizó una evaluación de la actividad antibacteriana de *Pseudomonas* sp. GOM7 frente a diversas especies bacterianas con el fin de establecer su espectro de acción. La selección de bacterias Gram-positivas incluyó aislados de *S. aureus* resistentes a antibióticos, gentilmente proporcionados por el Dr. Jaime Amadeo

Bustos de la Universidad Autónoma Metropolitana. Asimismo, se incorporaron en el estudio bacterias Gram-negativas como *E. coli* y *S. Typhimurium*.

Tanto la colonia como el sobrenadante de cultivo de *Pseudomonas* sp. GOM7 (concentrado mediante liofilización), mostraron actividad inhibitoria frente a todos los aislados de *S. aureus* resistentes a antibióticos evaluados (Tabla 8).

Tabla. 8. Espectro de actividad antibacteriana de *Pseudomonas* sp. GOM7.

| Cepa evaluada | <i>Pseudomonas</i> sp. GOM7 ^a | | |
|---|--|--------------|------------------------------|
| | Colonia | Sobrenadante | Extracto de acetato de etilo |
| Gram-positivas | | | |
| <i>S. aureus</i> ATCC 29213 | + | + | + |
| <i>S. aureus</i> ATCC 43300 (MRSA) | + | + | + |
| <i>S. aureus</i> 8N2 (MRSA) | + | + | + |
| <i>S. aureus</i> 4N34 (MRSA) | + | + | + |
| <i>S. aureus</i> 14F4A (MRSA) | + | + | + |
| <i>S. aureus</i> 25F4 (MRSA) | + | + | + |
| <i>S. aureus</i> 15N4 (MRSA) | + | + | + |
| <i>S. aureus</i> 1N3 (MRSA) | + | + | n.d. |
| <i>S. aureus</i> 13F3 (MRSA) | + | + | n.d. |
| <i>S. aureus</i> 21F3 (MRSA) | + | + | + |
| <i>S. aureus</i> 6N3 (MDR) | + | + | + |
| <i>S. aureus</i> 18F1 (MDR) | + | + | + |
| <i>S. aureus</i> 24N2 (MDR) | + | + | + |
| <i>S. aureus</i> 25F2 (MDR) | + | + | n.d. |
| <i>S. aureus</i> 17F3 (MDR) | + | + | + |
| <i>S. aureus</i> 17N3 (MDR) | + | + | + |
| <i>B. subtilis</i> 168 | + | - | n.d. |
| <i>Enterococcus faecium</i> ATCC 19434 | - | - | n.d. |
| Gram-negativas | | | |
| <i>E. coli</i> ATCC 25922 | + | - | n.d. |
| <i>S. Typhimurium</i> SL1344 | + | - | n.d. |
| <i>Klebsiella quasipneumoniae</i> ATCC 700603 | - | - | n.d. |
| <i>A. baumannii</i> ATCC 17978 | - | - | n.d. |

^aLa actividad antibacteriana del sobrenadante de cultivo liofilizado o el extracto de acetato de etilo se determinó por la formación (+) o no (-) de halos de inhibición de las cepas evaluadas; n.d. no determinado. *S. aureus* resistente a metilina (MRSA), *S. aureus* multi-drogo resistente (MDR). La cepa *E. coli* DH10 β , usada como control negativo, no presentó actividad antibacteriana, ni en colonia ni su sobrenadante. Placas de agar LB o M-H fueron utilizadas para analizar la producción de halos de inhibición en los ensayos de colonia o en los ensayos con el sobrenadante liofilizado o con los extractos de acetato de etilo, respectivamente. Estas placas fueron incubadas a 37°C para los

ensayos de colonia y a 30°C para los ensayos con el sobrenadante liofilizado y los extractos de acetato de etilo. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

En contraste, solamente las colonias de *Pseudomonas* sp. GOM7 exhibieron halos de inhibición frente a *Bacillus subtilis* 168, *S. Typhimurium* SL1344 y *E. coli* ATCC 25922. Ni las colonias ni los sobrenadantes de cultivo de *Pseudomonas* sp. GOM7 generaron halos de inhibición frente a *E. faecium* ATCC 19434, *K. quasipneumoniae* ATCC 700603 y *A. baumannii* ATCC 17978 (Tabla 8 y Fig. 5). Conforme a lo esperado, tanto las colonias bacterianas como los sobrenadantes de cultivo de la cepa *E. coli* DH10 β , empleada como control negativo, no mostraron formación de halos de inhibición frente a las bacterias evaluadas (Fig. 5). Estos resultados muestran que *Pseudomonas* sp. GOM7 tiene actividad antibacteriana, principalmente anti-*S. aureus*.

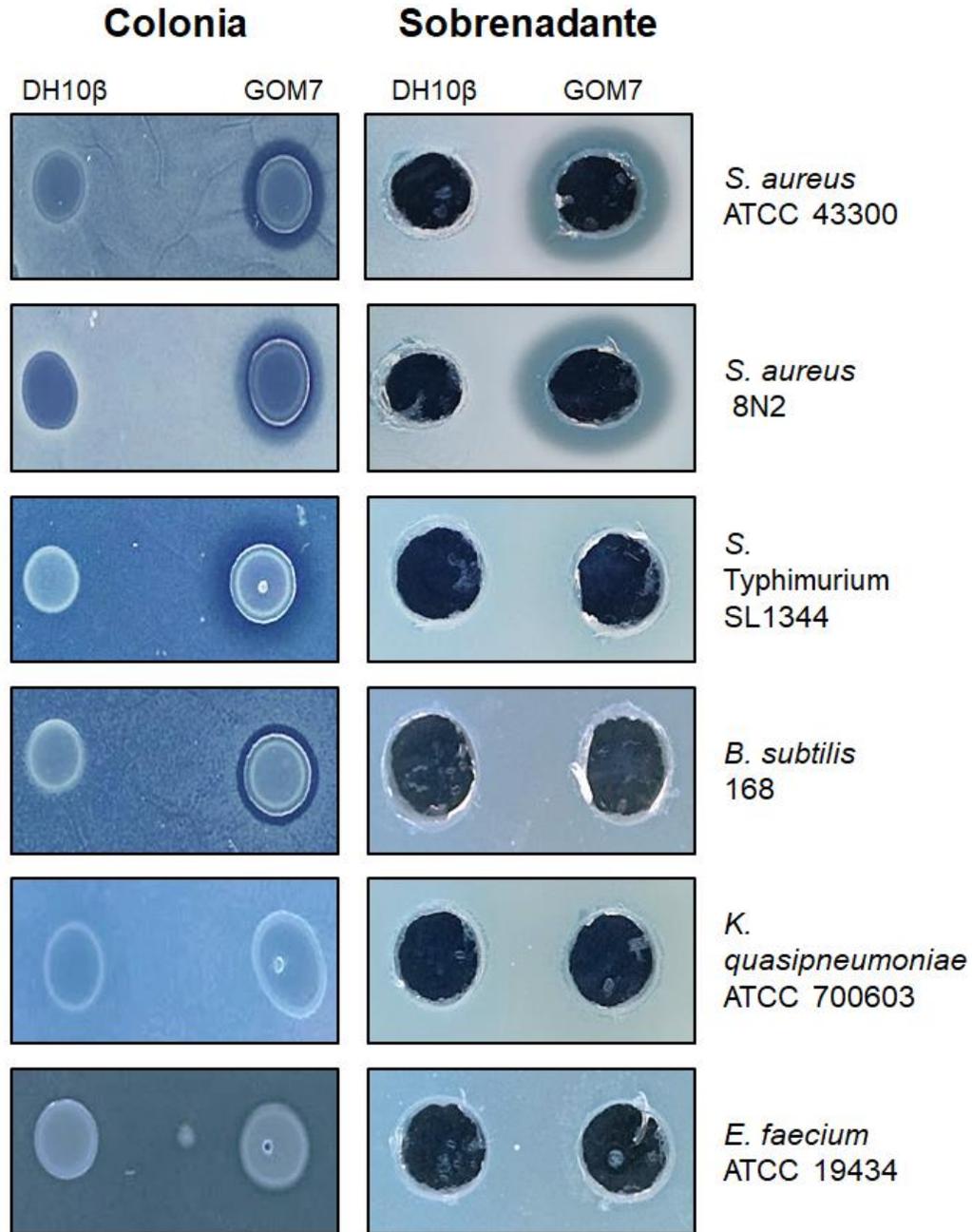


Figura. 5. Actividad antibacteriana de la cepa *Pseudomonas* sp. GOM7. Se muestran imágenes representativas de la formación de halos de inhibición del crecimiento producidos por la colonia o por el sobrenadante de cultivo concentrado de *Pseudomonas* sp. GOM7 contra diferentes bacterias. La cepa *E. coli* DH10 β fue utilizada como control negativo. La cepa de *S. aureus* ATCC 43300 y el aislado *S. aureus* 8N2 son MRSA.

Para obtener información sobre la solubilidad de los compuestos antibacterianos producidos por *Pseudomonas* sp. GOM7, se evaluó la capacidad inhibitoria de extractos del sobrenadante de cultivo obtenidos con diferentes solventes orgánicos (*n*-hexano, cloroformo y acetato de etilo, de menor a mayor polaridad,

respectivamente). Como control negativo se probaron extractos del sobrenadante de cultivo de *E. coli* DH10 β obtenidos con los mismos solventes. Solo el extracto obtenido con acetato de etilo de *Pseudomonas* sp. GOM7 formó halos de inhibición contra *S. aureus*, incluidas cepas MRSA (Tabla 8). Adicionalmente, analizamos la supervivencia de la cepa MRSA *S. aureus* ATCC 43300 expuesta a los extractos de *Pseudomonas* sp. GOM7 o de *E. coli* DH10 β obtenidos con *n*-hexano, cloroformo o acetato de etilo. De manera importante, el extracto de acetato de etilo de *Pseudomonas* sp. GOM7 redujo ~60% la supervivencia de *S. aureus* después de 5 h de exposición, mientras que las bacterias inclusive se replicaron en los extractos de *n*-hexano y cloroformo (Fig. 6). Como era de esperarse, no se observó ningún efecto inhibitorio con los extractos de solventes de *E. coli* DH10 β .

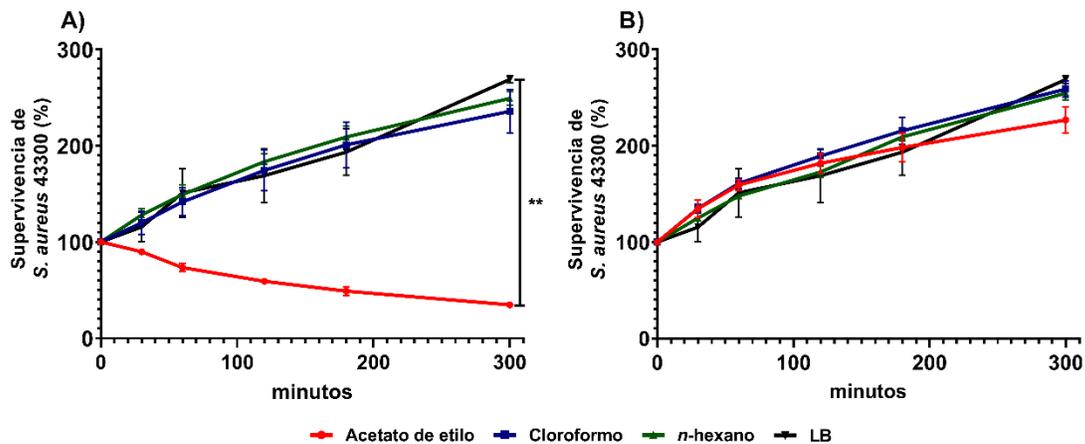


Figura. 6. El extracto de acetato de etilo de *Pseudomonas* sp. GOM7 reduce la supervivencia de *S. aureus*. Aproximadamente 1×10^6 UFC mL⁻¹ de *S. aureus* ATCC 43300 se incubaron en medio LB (negro) o en los extractos del sobrenadante de cultivo de *Pseudomonas* sp. GOM7 (A) o de *E. coli* DH10 β (B) obtenidos con *n*-hexano (verde), cloroformo (azul) o acetato de etilo (rojo). En los tiempos indicados se determinaron las UFC mL⁻¹ mediante cuenta viable en agar LB y se determinó el porcentaje de supervivencia. El valor de P fue calculado utilizando el análisis de ANOVA de una vía combinado con la prueba de Dunnett. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Los datos representan el promedio \pm S.D. de tres experimentos diferentes.

En conclusión, *Pseudomonas* sp. GOM7 produce uno o más compuestos antibacterianos solubles en acetato de etilo que afectan la viabilidad de *S. aureus*, incluidas cepas MRSA.

5.5. Secuenciación y anotación del genoma de *Pseudomonas* sp. GOM7

Para determinar las características genéticas de *Pseudomonas* sp. GOM7 se realizó la secuenciación, ensamble y anotación de su genoma completo. Estos análisis, en conjunto con la clasificación filogenómica y la predicción de posibles genes relacionados a la producción de compuestos antibacterianos se realizaron en colaboración con el Dr. Jorge Vargas Rojas del CIGoM.

El cromosoma circular completo de *Pseudomonas* sp. GOM7 tiene un tamaño de 5.424.934 pares de bases en una única secuencia continua, mostrando un contenido de G+C del 63,35% (Fig. 7). Mediante el uso de la anotación RASTtk, se logró la identificación de un total de 4.774 secuencias codificantes. En este genoma se destacan 64 genes que codifican RNAt y 12 genes que codificantes de RNAR, además de incluir 63 repeticiones CRISPR. También se observa la presencia de cuatro copias del gen rRNA16S, cada una con una longitud de 1.532 pares de bases.

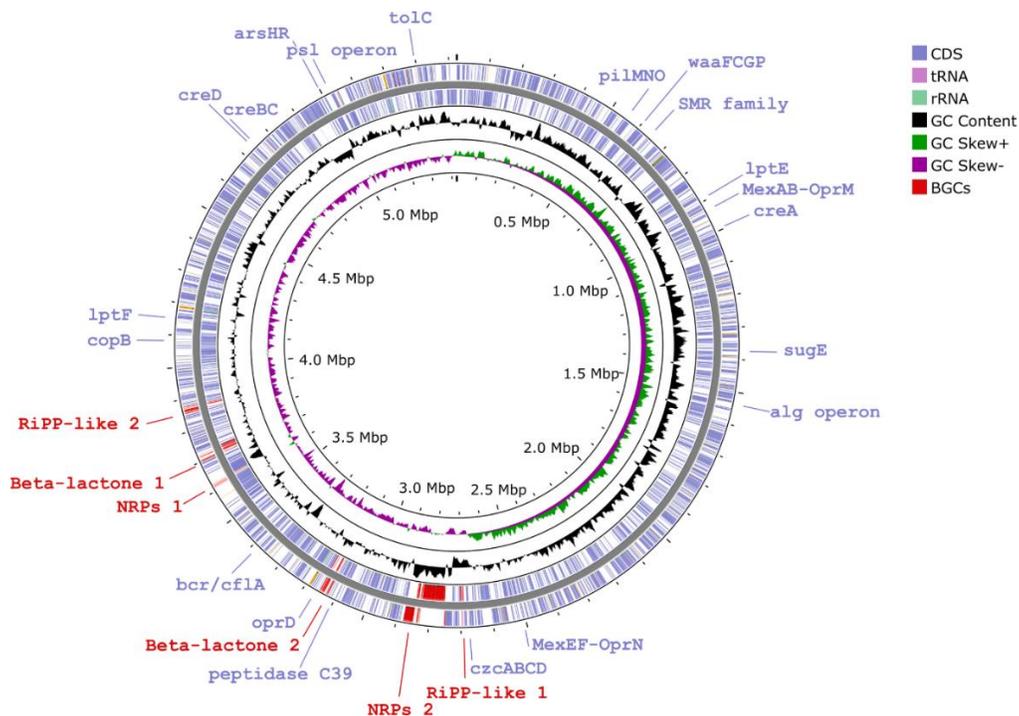


Figura. 7. Representación circular del genoma de *Pseudomonas* sp. GOM7. Los anillos representados se disponen desde el más externo hacia el centro de la siguiente manera: (■) CDS forward y CDS reverse, (■) contenido de GC, (■) GC skew, y tamaño del genoma. Algunos genes anotados codificantes de factores de virulencia, resistencia antimicrobiana y posibles resistencias a otros compuestos, están señalados en color azul. Las áreas que comprenden los grupos de genes

biosintéticos (BGC) que han sido identificados por antiSMASH como posibles codificadores de compuestos antimicrobianos se destacan en rojo (■). La figura fue realizada utilizando el servidor CGView.

Los datos de secuenciación del genoma completo y las secuencias sin procesar correspondientes a *Pseudomonas* sp. GOM7 se encuentran disponibles en el NCBI con el número de acceso CP113519. Además, el proyecto asociado a estas secuencias tiene asignado el número de acceso BioProject PRJNA905872. Los archivos de lectura de secuencias (SRA) relacionados son SRX18440904 (datos de secuenciación sin procesar obtenidos con Illumina) y SRX18440905 (datos de secuenciación sin procesar obtenidos con MinION).

5.6. *Pseudomonas* sp. GOM7 es una nueva especie de *Pseudomonas*

El análisis de genomas completos, como la identidad media de nucleótidos (ANI) y la hibridación digital del DNA-DNA (dDDH), han emergido como enfoques sólidos en los estudios filogenómicos y la delimitación de especies [157,158]. Dentro del género *Pseudomonas*, el análisis multilocus de secuencias (MLSA) ha demostrado ser un enfoque efectivo para determinar relaciones filogenéticas, empleando genes como el rRNA 16S, *gyrB*, *rpoB* y *rpoD* [159,160]. Para lograr una identificación más precisa de *Pseudomonas* sp. GOM7, inicialmente llevamos a cabo un análisis exhaustivo utilizando GTDB-Tk, el cual emplea una alineación concatenada de 120 genes bacterianos, incluyendo genes como rRNA16S, *gyrB* y *rpoB*, derivados tanto del genoma de *Pseudomonas* sp. GOM7 como de los genomas presentes en la base de datos de GTDB-Tk. Este análisis reveló 25 especies de *Pseudomonas*, como las especies más cercanas a *Pseudomonas* sp. GOM7 (Fig. 8).

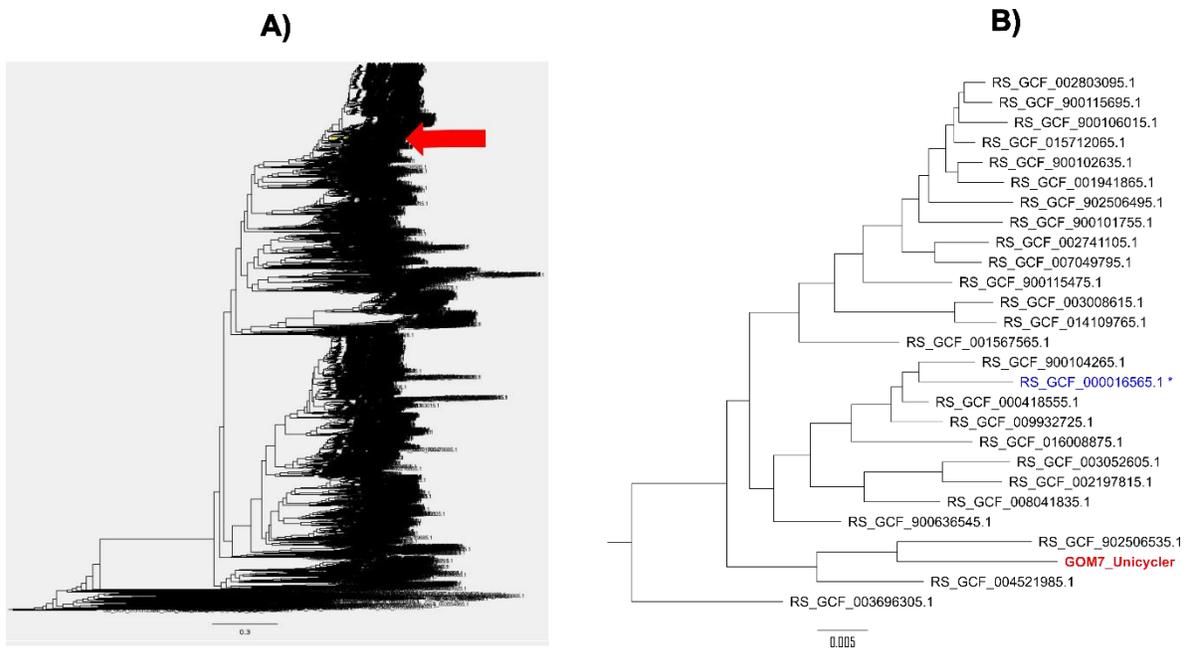


Figura. 8. Especies de *Pseudomonas* filogenéticamente más cercanas a *Pseudomonas* sp. GOM7. A) Posición del genoma de *Pseudomonas* sp.GOM7 (flecha roja) en el árbol de referencias inferido por GTDB-Tk con FastTree v2.1.10 bajo el modelo WAG a partir del alineamiento concatenado de 120 genes bacterianos ubicuos. **B)** Clado del árbol de referencia en el que el genoma de *Pseudomonas* sp.GOM7 (rojo) se asignó junto con los genomas de otras especies de *Pseudomonas*. El genoma con el número de acceso en azul ha sido eliminado del NCBI.

Posteriormente se utilizaron cinco criterios filogenómicos para clasificar a *Pseudomonas* sp. GOM7, utilizando su genoma completo para compararlo contra el genoma de las especies de *Pseudomonas* más próximas seleccionadas anteriormente, y al genoma de *Azotobacter vinelandii* DSM 279 como grupo externo (Tabla 9). En esta evaluación, la asignación a una especie específica exige que el genoma analizado cumpla con los criterios filogenómicos calculados en relación a los genomas de referencia, (dDDH >70%, ANI% >96%, AAI >96%, Mash D <0,05 y diferencias en el contenido de G+C <1%) [152,154,161]. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que ninguno de los genomas de *Pseudomonas* analizados (filogenéticamente más cercanos) se ajustó completamente a estos parámetros; solo unos pocos genomas manifestaron diferencias en el contenido de G+C inferiores al 1% (Tabla 9). En consecuencia, *Pseudomonas* sp. GOM7 no pudo ser clasificada como una especie ya conocida dentro del género *Pseudomonas*.

Tabla. 9. Criterios filogenómicos para identificar taxonómicamente la especie de *Pseudomonas* sp. GOM7.

| Genoma comparado | dDDH (d4, %) | ANIm (%) | AAI (%) | Mash D | Diferencia del contenido G+C (%) |
|--|--------------|----------|---------|--------|----------------------------------|
| <i>P. guguanensis</i> JCM 18416 (GCA_900104265.1) ^a | 31.3 | 88.30 | 88.19 | 0.11 | 0.86 |
| <i>P. composti</i> LY1 (GCA_001567565.1) | 31.2 | 88.25 | 88.59 | 0.12 | 0.36 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. P818 (GCA_000418555.1) | 30.9 | 88.17 | 88.24 | 0.12 | 0.07 |
| <i>P. indoloxydans</i> JCM 14246 (GCA_003052605.1) ^a | 30.8 | 88.00 | 87.94 | 0.11 | 1.10 |
| <i>P. mendocina</i> EF27 (GCA_008041835.1) | 30.8 | 87.96 | 87.71 | 0.12 | 1.56 |
| <i>P. oleovorans</i> subsp. <i>oleovorans</i> (GCA_002197815.1) ^a | 30.7 | 87.90 | 88.26 | 0.11 | 1.29 |
| <i>P. alcaliphila</i> JAB1 (GCA_001941865.1) | 30.6 | 87.97 | 87.49 | 0.12 | 0.81 |
| <i>P. mendocina</i> PSB00032 (GCA_016008875.1) | 30.5 | 87.87 | 87.55 | 0.12 | 0.24 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. MY50 (GCA_009932725.1) ^a | 30.4 | 88.09 | 87.79 | 0.12 | 0.53 |
| <i>P. sihuiensis</i> KCTC 32246T (GCA_900106015.1) ^a | 30.3 | 87.96 | 87.54 | 0.11 | 0.82 |
| <i>P. chengduensis</i> DSM 26382 (GCA_900102635.1) ^a | 30.3 | 87.93 | 87.95 | 0.12 | 1.03 |
| <i>P. chengduensis</i> 402 (GCA_015712065.1) | 30.2 | 87.89 | 87.65 | 0.12 | 0.72 |
| <i>P. mendocina</i> NCTC10897 (GCA_900636545.1) ^a | 30.1 | 87.88 | 88.00 | 0.11 | 0.59 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. ZH-FAD (GCA_002803095.1) | 30.1 | 87.85 | 87.40 | 0.12 | 1.13 |
| <i>P. alcaliphila</i> JCM 10630 (GCA_900101755.1) ^a | 30.1 | 87.77 | 87.87 | 0.11 | 0.47 |
| <i>P. toyotomiensis</i> JCM 15604 (GCA_900115695.1) ^a | 30.0 | 87.84 | 87.79 | 0.12 | 0.74 |
| <i>P. khazarica</i> TBZ2T (GCA_004521985.1) ^a | 30.0 | 87.65 | 87.33 | 0.11 | 1.61 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. AOB-7 (GCA_003696305.1) | 30.0 | 87.66 | 86.01 | 0.12 | 3.27 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. 8Z (GCA_902506535.1) | 30.0 | 87.57 | 88.81 | 0.12 | 2.49 |

| | | | | | |
|--|------|-------|-------|------|------|
| <i>P. mendocina</i> FFL34 (GCA_007049795.1) | 29.9 | 87.67 | 87.68 | 0.12 | 1.37 |
| <i>P. composti</i> CCUG 59231 (GCA_900115475.1)^a | 29.8 | 87.66 | 87.97 | 0.12 | 0.94 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. 80 (GCA_902506495.1) | 29.7 | 87.57 | 87.50 | 0.12 | 0.88 |
| <i>P. sediminis</i> PI11 (GCA_002741105.1)^a | 29.4 | 87.57 | 87.72 | 0.12 | 0.87 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. MSPm1 (GCA_014109765.1) | 29.3 | 87.31 | 87.10 | 0.12 | 0.94 |
| <i>P. mendocina</i> NEB698 (GCA_003008615.1) | 29.2 | 87.34 | 87.00 | 0.12 | 0.92 |
| <i>Azotobacter vinelandii</i> DSM 279 (GCA_900119555.1)^b | 22.4 | 84.43 | 72.67 | 0.19 | 2.13 |

^a Cepa tipo de acuerdo con la base de datos de NCBI consultada el 6 de Noviembre de 2022.

^b Genoma seleccionado como grupo externo.

El genoma de *P. guguanensis* JCM 18416 mostró los valores más altos de dDDH (31,3%) y ANIm (88,30%) (Tabla 8), señalando su proximidad con *Pseudomonas* sp. GOM7. Los genomas de *Pseudomonas* sp. GOM7 y *P. guguanensis* JCM 18416 comparten 3.450 familias génicas del total de 5.564 predichas por CMG BioTools (Fig 9A). Al examinar los bloques de alineamiento múltiple (cuyas extensiones mínimas superan los 10.000 pb) entre ambos genomas, se identificaron 27 regiones de sintenia compartidas que abarcan un 29,21% del genoma de *Pseudomonas* sp. GOM7 (Fig. 9). Estas áreas de sintenia se reparten en 14 contigs del genoma de *P. guguanensis* JCM 18416, aunque dispuestas en un orden distinto al observado en el genoma de *Pseudomonas* sp. GOM7. La escasa cobertura del genoma y las variaciones en la distribución de los bloques de sintenia sugieren que el genoma de *Pseudomonas* sp. GOM7 posee una organización genética distinta en comparación con *P. guguanensis* JCM 18416. En conjunto, estos hallazgos apoyan la evidencia de que *Pseudomonas* sp. GOM7 es una nueva especie dentro del género *Pseudomonas*.

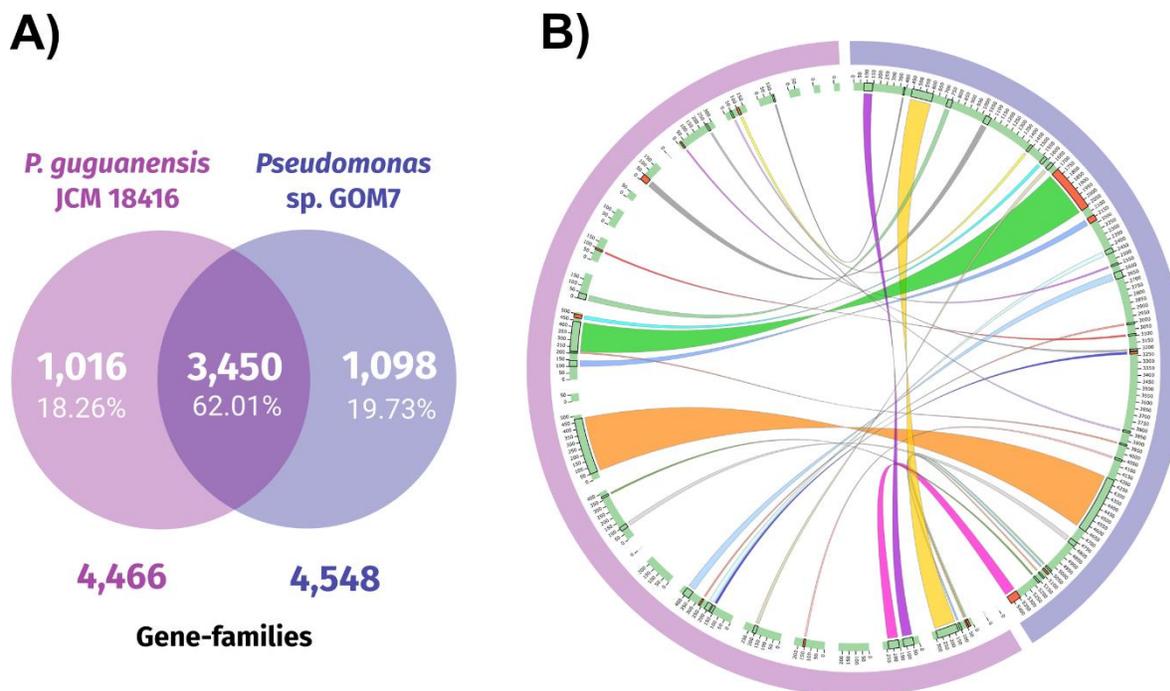


Figura. 9. Análisis de las familias de genes y comparación de bloques de alineamiento múltiple entre genomas de *Pseudomonas* sp. Comparación de *Pseudomonas* sp. GOM7 (azul) y *P. guguanaensis* JCM 18416 (púrpura). **A)** Representación en diagrama de Venn que representa la distribución de familias de genes compartidas y exclusivas entre ambos genomas. **B)** Representación de bloques de sintenia obtenidos a través de Sibelia. Desde el anillo exterior hacia el centro, se presenta la siguiente disposición: los dos genomas se muestran en azul y morado, los contigs de cada genoma se visualizan en verde pálido, y los bloques de sintenia se diferencian mediante diversos tonos. En el anillo de contigs, los bloques en rojo indican direcciones inversas de las secuencias.

5.7. Predicción de los compuestos antibacterianos en el genoma de *Pseudomonas* sp. GOM7

El análisis genómico mostró que *Pseudomonas* sp. GOM7 carece de los genes necesarios para la biosíntesis de piocianina presentes en *P. aeruginosa*, lo que confirma los resultados fenotípicos al respecto. Sin embargo, *Pseudomonas* sp. GOM7 alberga cinco genes que exhiben similitud con aquellos asociados a la síntesis de fenazinas (*phzC*, *phzF*, *phzG*, *phzH* y *phzS*). Estos genes se encuentran distribuidos en el genoma y comparten la mayor similitud (84-97%) con genes putativos de cepas de *Pseudomonas* sp. 8Z, *P. mendocina* y *P. composti* (Fig. 10). Se ha reportado que fenazinas distintas a la piocianina también pueden tener actividad antimicrobiana [162]. Así, podría plantearse que la actividad antibacteriana

producida por *Pseudomonas* sp. GOM7 está relacionada con compuestos diferentes a las fenazinas.

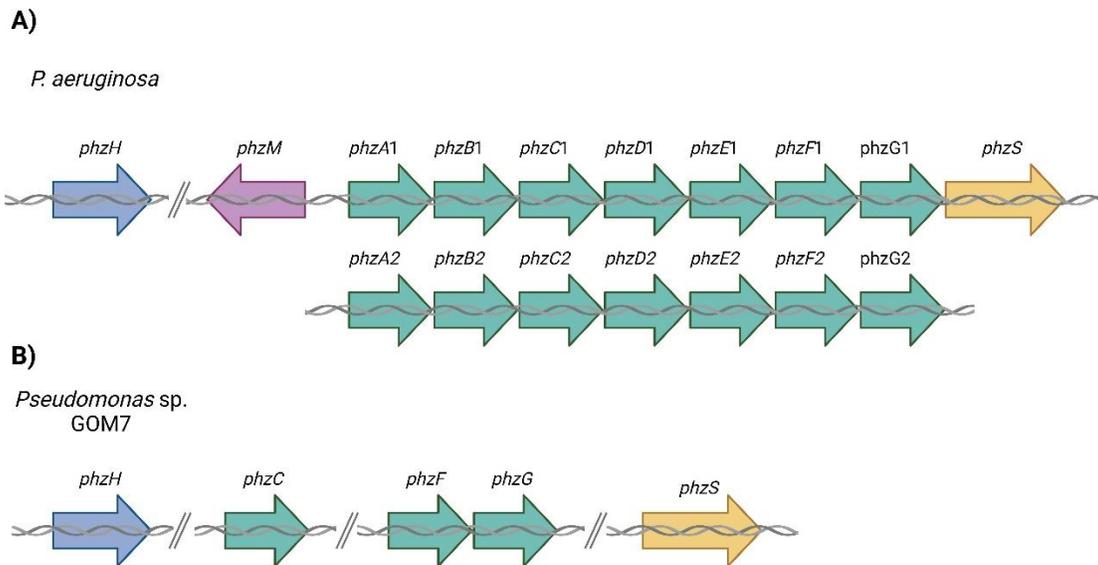


Figura. 10. Genes requeridos para la síntesis de piocianina en *P. aeruginosa*. **A)** Los dos operones que sintetizan piocianina en *P. aeruginosa* [163]. Las enzimas codificadas en los genes *phzA-phzG* transforman el ácido corísmico en el ácido fenazina-1-carboxílico (PCA), que es convertido en diferentes fenazinas por las enzimas codificadas en los genes *phzH*, *phzS* y *phzM*; una de ellas es luego transformada en piocianina por la enzima codificada en el gen *phzS*. **B)** Probables genes ortólogos de *phzH*, *phzC*, *phzF*, *phzG* y *phzS* presentes en el genoma de *Pseudomonas* sp. GOM7. Esta figura fue creada con BioRender.com.

Para identificar otros potenciales genes responsables de la producción de compuestos antimicrobianos, se analizó el genoma de *Pseudomonas* sp. GOM7 con la herramienta antiSMASH, la cual permite predecir grupos de genes biosintéticos (BGC) relacionados a metabolitos secundarios con posible actividad antimicrobiana. Este análisis reveló la existencia de seis BGCs en el genoma de *Pseudomonas* sp. GOM7, los cuales podrían estar vinculados con la actividad antibacteriana exhibida (Fig. 11). Se predijo que dos BGCs codifican péptidos sintetizados por el ribosoma y luego modificados post traduccionalmente (RiPPs) (Fig. 11A). Estos BGCs tienen un único gen tipo RiPP, el cual presenta una similitud del 42% entre sí y no comparten parentesco con otros BGCs reportados (Fig. 11A). Adicionalmente, otros dos BGCs de *Pseudomonas* sp. GOM7 están relacionados con la síntesis potencial de β -lactonas (Fig. 11B). Otro de los BGCs predichos presenta posibles ortólogos de los genes *yngeGHJ* de *Bacillus velezensis* FZB42, estos genes se encuentran

en operón con los genes *fenABCDE* para sintetizar el lipopéptido antifúngico fengicina [164]. Además, en el genoma de *Pseudomonas* sp. GOM7 se identificó la existencia de dos BGCs anotados como "módulos de sintetasas peptídicas no ribosomales" (NRPs) (Fig. 11C). Uno de estos NRPs contiene posibles ortólogos de 17 de los 31 genes de un NRP previamente detectado en el genoma de *Pseudomonas* sp. 8Z [165], con una similitud entre el 30% y el 97% (Fig. 11C). De igual manera, este NRP en *Pseudomonas* sp. GOM7 presenta ortólogos de 7 genes de *Cupriavidus necator* H16, vinculados con la creación del sideróforo cupriachelin [166]. No obstante, *Pseudomonas* sp. GOM7 carece de varios genes necesarios para la síntesis completa de cupriachelin (Fig. 11C). El otro NRP predicho en el genoma de *Pseudomonas* sp. GOM7 incluye todos los genes esenciales para la generación de los lipopéptidos antimicrobianos syringomycina de *P. syringae* y nunapeptin/nunamicyn de *P. fluorescens* [167,168], exhibiendo una similitud entre el 31% y el 82%. En conjunto, este análisis nos permitió identificar posibles genes involucrados en la actividad antibacteriana exhibida por *Pseudomonas* sp. GOM7.

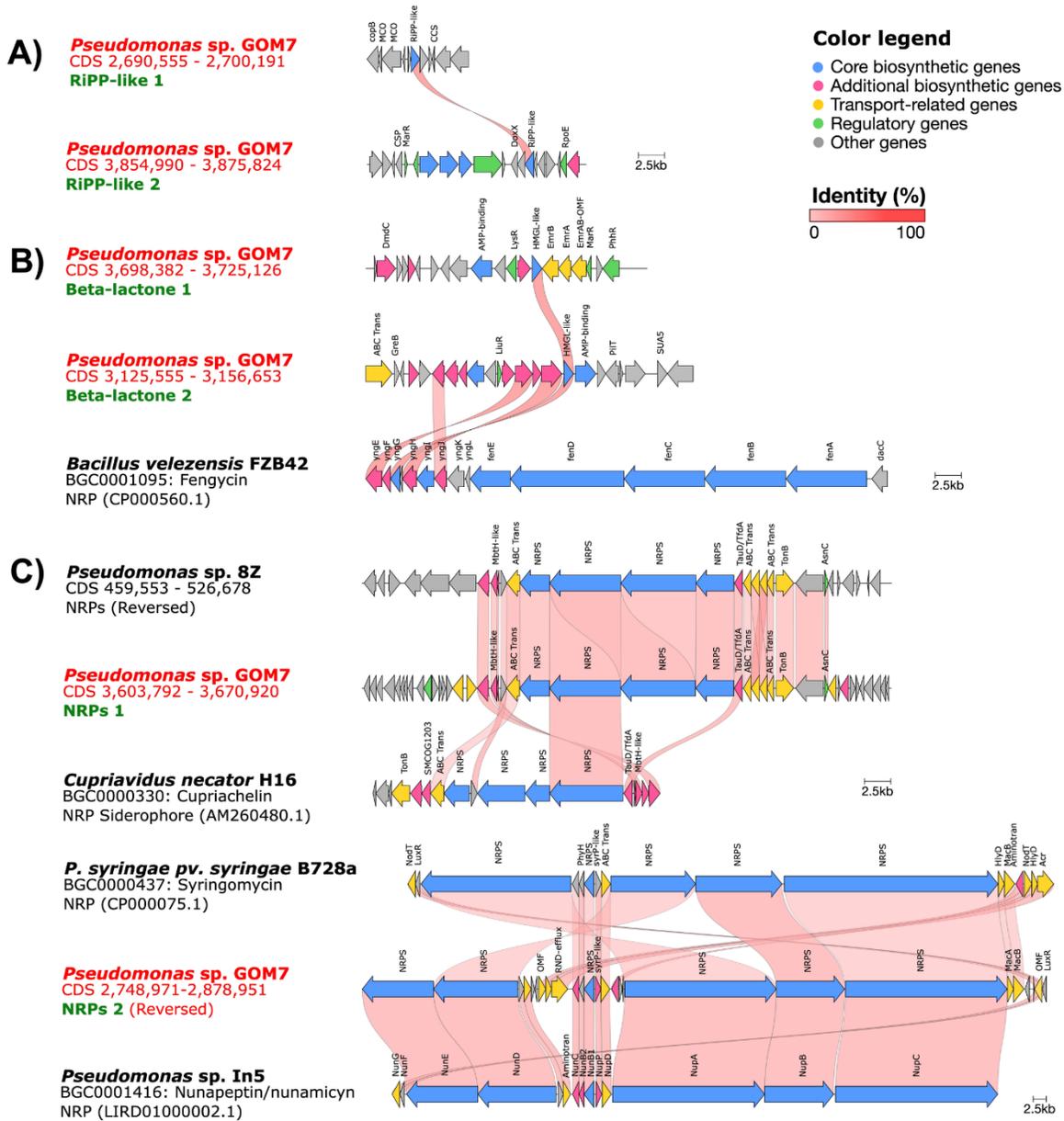


Figura. 11. Grupos de genes biosintéticos predichos en el genoma de *Pseudomonas sp. GOM7* y su comparación con los BGCs de otras bacterias. La figura muestra los BGCs predichos utilizando el programa antiSMASH seleccionando el parámetro de detección relajado. **(A)** BGCs que codifican para RiPPs. **(B)** BGCs que codifican para β -lactonas. **(C)** BGCs que codifican para péptidos no ribosomales. Los genes se representan como flechas y la dirección de la flecha indica la sintenia. La función probable de los genes y la identidad entre ellos se indican con colores según las leyendas mostradas.

5.8. Caracterización parcial del compuesto con actividad antibacteriana

Como se mencionó anteriormente, los extractos obtenidos del sobrenadante de cultivo de *Pseudomonas sp. GOM7* con acetato de etilo mostraron ser capaces de

inhibir el crecimiento de *S. aureus* (Tabla 8). Por lo tanto, se decidió analizar los compuestos presentes en este extracto con el objetivo de identificar el o los compuestos responsables de la actividad antibacteriana observada.

La figura 12A muestra los halos de inhibición producidos por la fracción de acetato de etilo contra la cepa MRSA *S. aureus* ATCC 43300. El acetato de etilo tiene un nivel intermedio de polaridad, además, se destaca por su bajo grado de toxicidad [169]. Estos resultados sugieren que los compuestos con actividad antibacteriana presentes en el extracto de acetato de etilo tienen una polaridad intermedia.

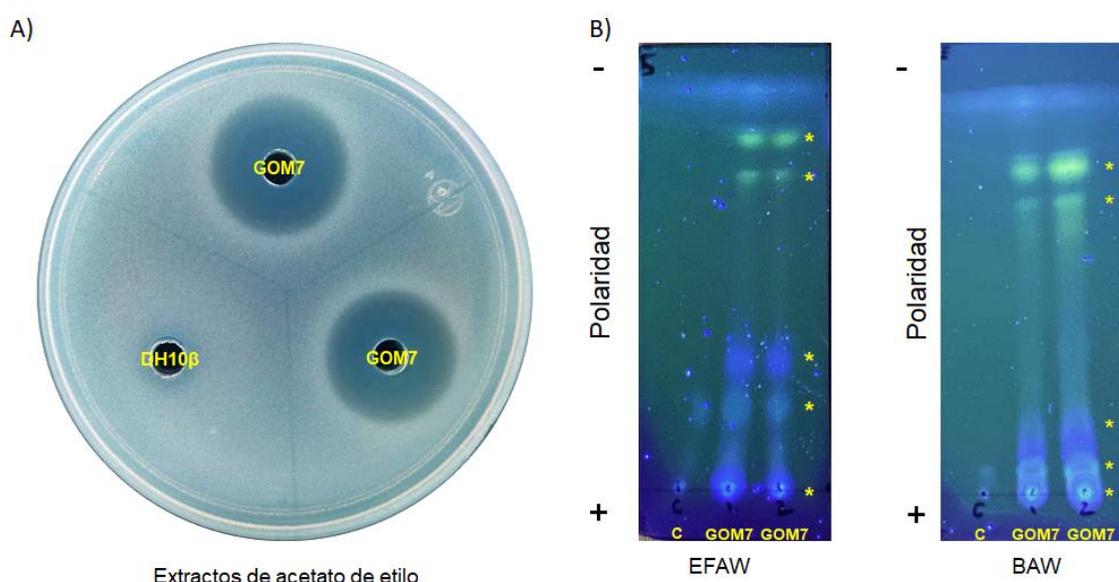


Figura. 12. Caracterización parcial del compuesto antimicrobiano de *Pseudomonas* sp. GOM7. **A)** Se muestra una imagen de la formación de halos de inhibición del crecimiento producidos por el extracto de acetato de etilo obtenido del sobrenadante de *Pseudomonas* sp. GOM7 contra *S. aureus* ATCC 43300. El extracto de acetato de etilo del sobrenadante de cultivo de la cepa *E. coli* DH10β fue utilizado como control negativo. La cepa de *S. aureus* ATCC 43300 es MRSA. **B)** Se muestran los compuestos presentes en los extractos de acetato de etilo (*) separados mediante TLC en placas cromatográfica desarrolladas con dos diferentes fases móviles y reveladas con luz UV de onda larga a 254 nm. Se utilizó como control extractos de acetato obtenidos de etilo de medio LB estéril. C= control.

El índice de polaridad del acetato de etilo nos permitió proponer un sistema de cromatografía en capa fina (TLC), como una aproximación inicial para separar los compuestos presentes en la fracción de acetato de etilo obtenida del sobrenadante de cultivo de *Pseudomonas* sp. GOM7. Este sistema utilizó dos fases móviles, ambas de naturaleza polar, pero que se diferencian en la polaridad de los solventes

que las componen. La fase EFAW, compuesta por acetato de etilo, ácido fórmico y agua, posee un índice de polaridad más elevado. Por otro lado, la fase móvil BAW está conformada por butanol, ácido acético y agua (Fig. 12B). El desarrollo de las placas cromatográficas reveló que ambas fases móviles utilizadas facilitaron la separación de los compuestos en la placa de sílice, permitiendo identificar cinco posibles compuestos de diversas polaridades (Fig. 12B). Sin embargo, los patrones de separación de los compuestos variaron, mostrando una mejor separación con la fase EFAW.

En conjunto, estos resultados muestran la presencia de 5 compuestos de naturaleza polar que podrían estar relacionados con la actividad anti-*S. aureus* exhibida por *Pseudomonas* sp. GOM7. No obstante, es necesario realizar ensayos adicionales para determinar cuál de estos compuestos es el responsable de la actividad antibacteriana observada.

5.9. *Pseudomonas* sp. GOM7 no presentó propiedades de virulencia

Como un aspecto importante para el estudio de una nueva especie bacteriana, investigamos si *Pseudomonas* sp. GOM7 exhibe propiedades de virulencia similares a las de *P. aeruginosa*, la especie clínica más importante dentro del género *Pseudomonas*. El potencial de virulencia de ambas cepas se evaluó utilizando el modelo de infección en larvas de *Galleria mellonella*, el cual es ampliamente utilizado para estudiar la virulencia de bacterias patógenas [113]. Como era esperado, la cepa de *P. aeruginosa* mató el 100 % de las larvas a las 40 h post-infección, con una dosis infectiva de 0.6×10^3 UFC mL⁻¹. En contraste, *Pseudomonas* sp. GOM7 y la cepa no virulenta de *E. coli* DH5 α (utilizada como control negativo) no mataron a ninguna de las larvas durante todo el experimento, inclusive la infección con dosis mayores de bacterias (1×10^3 , 1×10^4 , and 1×10^5 UFCs) no provocó ningún efecto letal (Fig. 13). Estos resultados indican que la cepa *Pseudomonas* sp. GOM7 no es virulenta comparada con la cepa *P. aeruginosa* PAO1 en el modelo de *G. mellonella*.

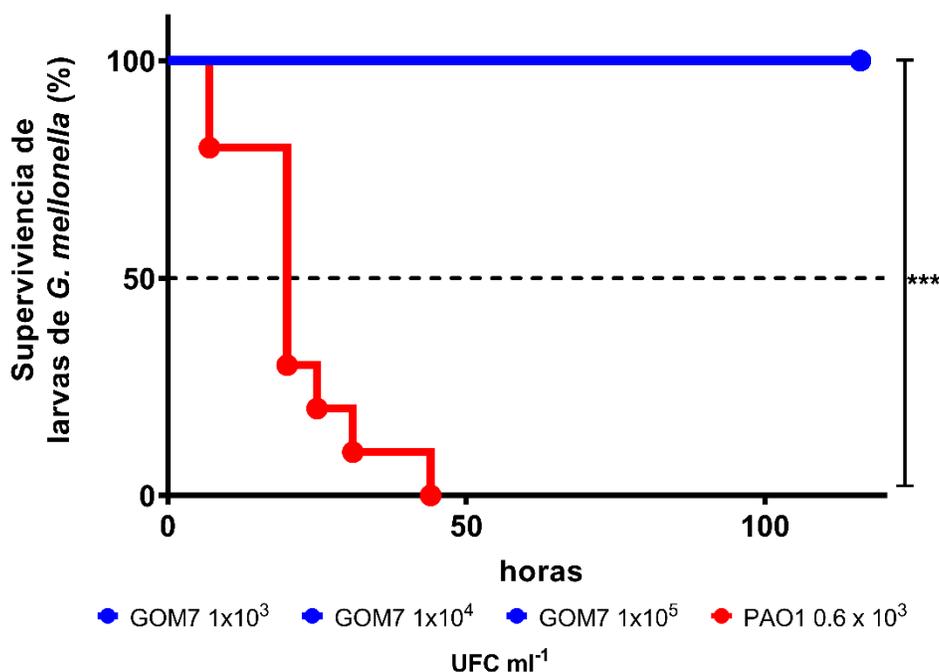


Figura. 13. Supervivencia de *G. mellonella* infectada con diferentes dosis de *Pseudomonas* sp. GOM7. Se muestran las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de las larvas infectadas con diferentes dosis de las siguientes cepas: *Pseudomonas* sp. GOM7 (azul) y *P. aeruginosa* PAO1 (rojo) como control. El valor de *P* fue calculado utilizando el análisis de log-rank. ***, *P* < 0.001. Las larvas se incubaron a 30 °C y su viabilidad fue monitoreada durante 5 días. No hubo efectos letales en las larvas infectadas con *E. coli* DH5α, inyectadas con PBS o sin inyectar.

Aunado a esto, se comparó la capacidad de formación de biopelículas y secreción de proteasas entre *Pseudomonas* sp. GOM7 y *P. aeruginosa*, ya que estos fenotipos están relacionados con la virulencia de *P. aeruginosa* [170]. Como control negativo la cepa *E. coli* DH5α también fue evaluada. Nuestros resultados mostraron una clara formación de biopelículas y secreción de proteasas por parte de *P. aeruginosa* (Fig. 14). En contraste, *Pseudomonas* sp. GOM7 y *E. coli* DH5α mostraron una formación de biopelículas aproximadamente ~5 y ~14 veces más baja que *P. aeruginosa*, respectivamente, y no presentaron secreción de proteasas (Fig. 14). El análisis genómico de *Pseudomonas* sp. GOM7 reveló la presencia de genes que se relacionan con la virulencia, pero que también están presentes en bacterias no patógenas, como genes para la síntesis de flagelo y para el pili tipo IV, así como la producción de alginato, entre otros. En general, estos resultados indican que *Pseudomonas* sp. GOM7 no es una bacteria patógena.

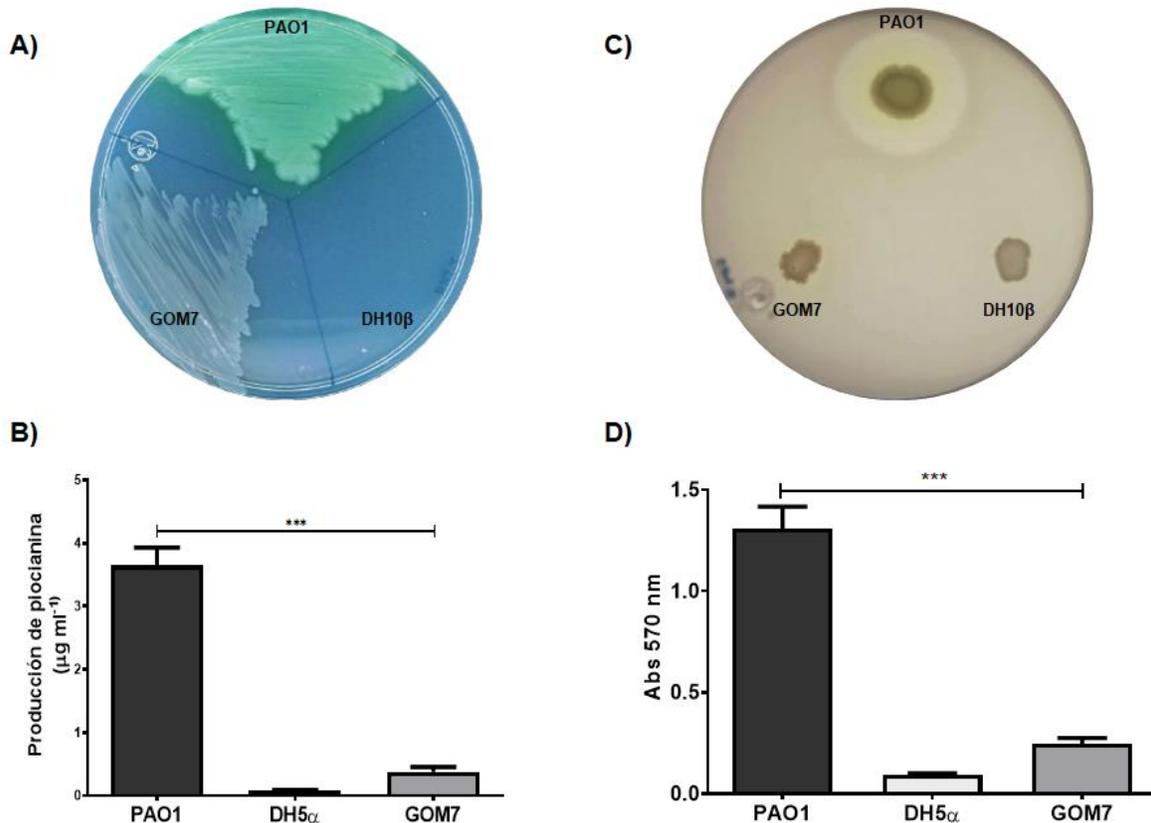


Figura. 14. Comparación de las propiedades de virulencia de *Pseudomonas* sp. GOM7, *P. aeruginosa* (patogénica) y *E. coli* DH5α (no patogénica). **A)** Observación de la coloración azul verdosa generada por la plocianina en bacterias cultivadas en agar cetrimida. **B)** Medición de plocianina en el sobrenadante de los cultivos de *Pseudomonas* sp. GOM7 y *P. aeruginosa* PAO1 tras una extracción secuencial con cloroformo, seguida de cuantificación por espectrofotometría. **C)** Evaluación de la secreción de proteasas. Se analizó la producción de proteasas extracelulares en agar de leche descremada. **D)** Cuantificación de la formación de biopelículas. Se empleó la técnica de tinción con violeta cristal para cuantificar la formación de biopelícula. Estos análisis se realizaron con bacterias cultivadas en medio LB a una temperatura de 37 °C. Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. El valor de P fue calculado utilizando el análisis de ANOVA de una vía combinado con la prueba de Dunnett con respecto al control PAO1. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Las barras representan el promedio \pm S.D. Las cepas *P. aeruginosa* PAO1 y *E. coli* DH5α se utilizaron como controles positivo y negativo, respectivamente. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

5.10. Las cepas marinas y clínicas de *P. aeruginosa* son virulentas en el modelo de *G. mellonella*.

Como se indicó anteriormente, de las cepas del GoM que mostraron actividad antibacteriana, identificamos 7 como *P. aeruginosa*. Dado que es un patógeno oportunista con una amplia distribución ambiental y bajo la perspectiva de “Una Salud”, nos interesó determinar si estas cepas, donde se podría esperar un bajo

impacto antropogénico, son potencialmente patógenas y sí presentan resistencia a antibióticos. Para ello, comparamos la patogenicidad de estas cepas marinas con un número igual de cepas clínicas de *P. aeruginosa*, utilizando el modelo de larvas de *G. mellonella*.

La virulencia de *P. aeruginosa* en *G. mellonella* y ratones ha sido reportada con anterioridad [171,172]. Primero determinamos su capacidad de matar a larvas de *G. mellonella*. Los 7 aislados clínicos y 5 de las 7 cepas marinas mataron a las larvas 44 h post-infección, un fenotipo similar al mostrado por la cepa *P. aeruginosa* PAO1 (control positivo de virulencia); las otras 2 cepas marinas mataron las larvas a las 68 h post-infección (Fig.15). Como era esperado, la cepa *E. coli* DH5 α (no patógena) no mató ninguna larva en las 116 h evaluadas. Estos resultados indican que en general las cepas marinas y los aislados clínicos probados de *P. aeruginosa* poseen una virulencia similar en el modelo de *G. mellonella*.

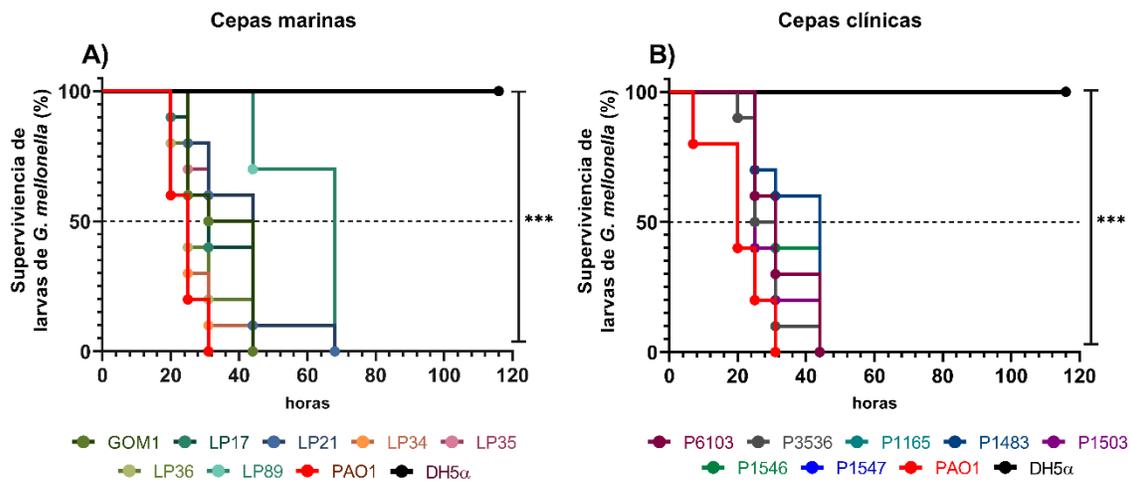


Figura. 15. Aislados marinos y clínicos de *P. aeruginosa* exhiben una virulencia similar en el modelo de *G. mellonella*. Larvas de gusano de cera fueron infectadas con $\sim 1 \times 10^2$ UFC mL $^{-1}$ de las cepas marinas o clínicas de *P. aeruginosa* y su viabilidad fue monitoreada durante 5 días. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de las larvas infectadas con cepas marinas (A) o cepas clínicas (B). Los grupos control fueron *P. aeruginosa* PAO1 (patógena) y *E. coli* DH5 α (no patógena). El valor de *P* fue calculado utilizando el análisis de Log-rank. ***, *P* < 0.001.

5.11. Las cepas marinas y clínicas de *P. aeruginosa* son capaces de formar biopelícula.

La formación de biopelícula es un fenotipo relacionado a la virulencia de *P. aeruginosa* [173]. En este estudio se comparó la capacidad de formar biopelículas en microplacas de poliestireno entre las cepas marinas y los aislados clínicos de *P. aeruginosa*, utilizando el método de tinción con cristal violeta [123]. Los resultados revelaron que tanto las cepas marinas como las clínicas exhibieron diferentes niveles de formación de biopelícula (fuerte, moderada o débil); las 7 cepas marinas formaron biopelícula, mientras que 5 de los 7 aislados clínicos también lo hicieron (Fig. 16). Las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 y *E. coli* DH5 α usadas como control positivo y negativo, respectivamente, mostraron los fenotipos esperados. Estos hallazgos indican que, si bien existe variación entre las diferentes cepas, en general se puede concluir que tanto las cepas marinas como los aislados clínicos de *P. aeruginosa* probados son capaces de formar biopelícula.

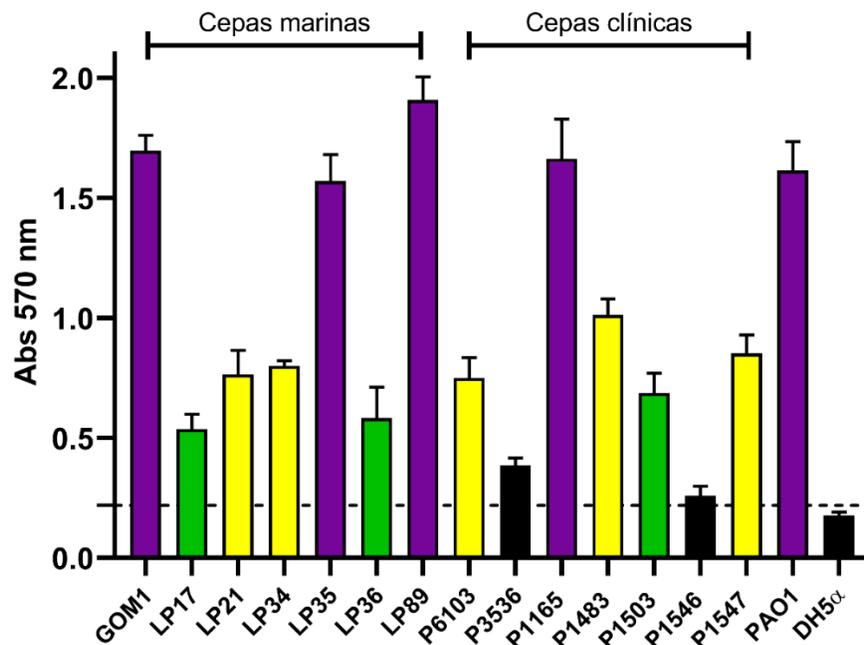


Figura. 16. Los aislados marinos y clínicos de *P. aeruginosa* forman biopelícula. Se utilizó el método de tinción con cristal violeta para cuantificar la formación de biopelícula. Las cepas se clasificaron como productoras de biopelícula: fuertes (morado), moderadas (amarillo), débiles (verde) o no formadoras de biopelícula (negro) según lo descrito por Stepanovic [123]. La línea punteada muestra el valor de corte utilizado para la clasificación el cual fue obtenido del promedio de la O.D₅₇₀ + 3 veces la S.D. del control negativo *E. coli* DH5 α . Las barras representan el promedio de 3 experimentos independientes \pm S.D. *P. aeruginosa* PAO1 fue utilizada como control positivo.

5.12. Las cepas marinas y clínicas de *P. aeruginosa* expresan factores asociados a virulencia.

Diversos factores se han asociado a la virulencia de *P. aeruginosa*, entre ellos las exotoxinas ExoS y ExoU, la piocianina, la elastasa y los ramnolípidos [174]. Por lo tanto, se determinó la presencia de estos factores de virulencia entre las cepas marinas y los aislados clínicos de *P. aeruginosa* en estudio.

En su proceso infeccioso *P. aeruginosa* utiliza un sistema de secreción de tipo III (SST3) para inyectar proteínas efectoras en el citoplasma de la célula huésped. Algunos de estos efectores son las exotoxinas ExoU que es una potente citotoxina con actividad de fosfolipasa, y ExoS una toxina bifuncional con actividad de proteína activadora de GTPasa en el extremo carboxilo terminal y actividad de ADP-transferasa [175]. Para evaluar la producción de las exotoxinas ExoS y ExoU y su secreción mediante el SST3, la presencia de estas proteínas fue analizada en el sobrenadante de cultivo de las cepas marinas y clínicas de *P. aeruginosa* mediante Western blot. Los resultados mostraron que 6 de 7 cepas marinas y 4 de 7 aislados clínicos secretaron ExoS, un fenotipo que muestra la cepa *P. aeruginosa* PAO1 (solo produce ExoS), mientras que 1 cepa marina y 3 aislados clínicos secretaron ExoU, un fenotipo que muestra la cepa *P. aeruginosa* PA14 (solo produce ExoU) (Fig. 17). Como era esperado, en la cepa *P. aeruginosa* ATCC 9027, usada como control negativo en estos ensayos, no se detectaron las toxinas ExoS y ExoU (Fig. 17). Estos resultados muestran que tanto las cepas marinas como las clínicas son capaces de producir las toxinas ExoS o ExoU y secretarlas a través del SST3.

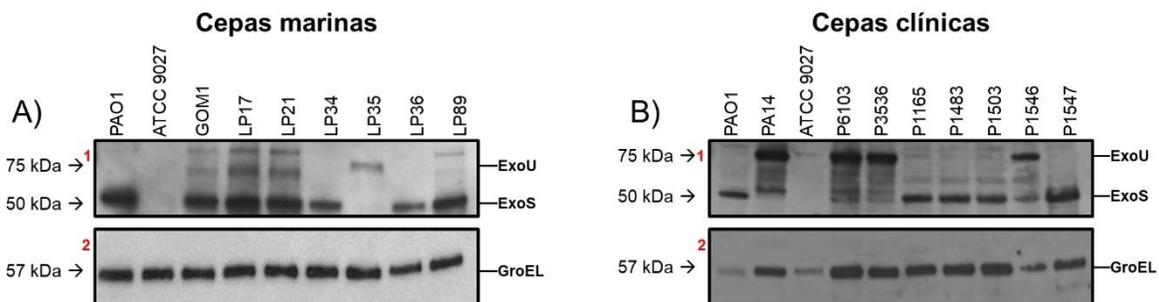


Figura. 17. Detección de las toxinas ExoS y ExoU producidas por los aislados de *P. aeruginosa*. La presencia de ExoS y ExoU en el sobrenadante de cultivo de las cepas marinas (A) o clínicas (B) fue analizada mediante Western blot usando anticuerpos policlonales anti-ExoS o anti-ExoU. La proteína GroEL fue identificada con el anticuerpo anti-GroEL (control de carga). Las cepas

P. aeruginosa PAO1 y PA14 que expresan ExoS y ExoU, respectivamente, fueron utilizadas como controles positivos, mientras que *P. aeruginosa* ATCC9027 que no expresa ninguna de estas toxinas se usó como control negativo. Los paneles marcados con el número 1 y 2 fueron obtenidos con una mezcla de los anticuerpos anti-ExoS y anti-ExoU o únicamente con el anticuerpo anti-GroEL, respectivamente.

Otros de los factores asociados a virulencia que se evaluaron fueron la producción de piocianina y elastasa. La piocianina es una molécula derivada de las fenazinas, relacionada a la formación de especies reactivas de oxígeno, mientras que la elastasa, es una proteasa que facilita la colonización bacteriana induciendo daños en el tejido del huésped [102,176]. Se comparó la producción de estos factores entre las cepas marinas y los aislados clínicos de *P. aeruginosa*, como controles positivo y negativo se usaron las cepas *P. aeruginosa* PAO1 y *E. coli* DH5 α , respectivamente (Fig. 18). En general, la producción de piocianina y de elastasa fue mayor en las cepas marinas que en las clínicas; las 7 cepas marinas mostraron niveles de piocianina más altos que los de 6 aislados clínicos, mientras que las 7 cepas marinas mostraron niveles de elastasa más altos que los de 5 aislados clínicos (Fig. 18). Como esperado, la cepa *P. aeruginosa* PAO1, produjo piocianina y elastasa, mientras que *E. coli* DH5 α no produjo ninguno de los dos factores (Fig. 18). Estos resultados muestran que los aislados marinos producen una mayor cantidad de piocianina y de elastasa que los aislados clínicos.

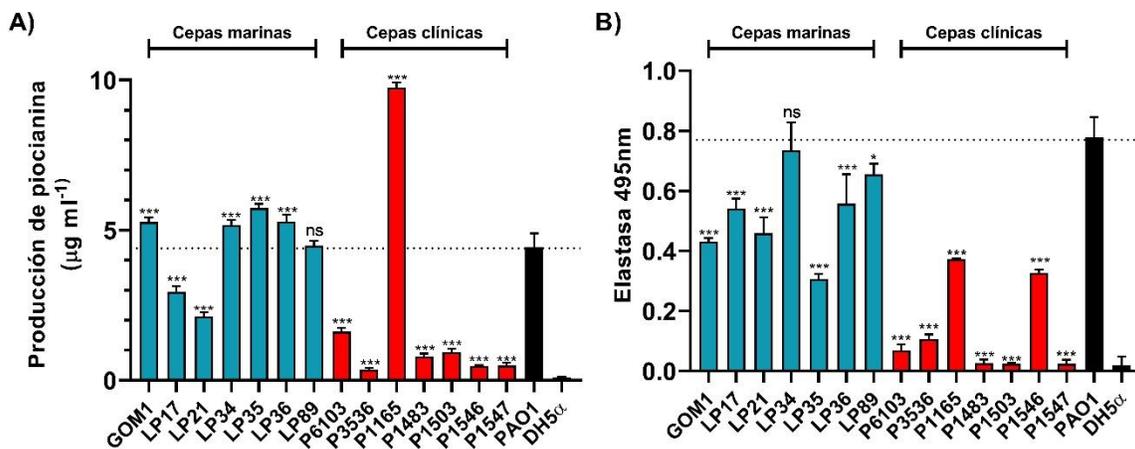


Figura. 18. Producción de piocianina y elastasa por aislados marinos y clínicos de *P. aeruginosa*. **A).** Cuantificación de piocianina en el sobrenadante de cultivos de aislados de *P. aeruginosa* tras la extracción secuencial con cloroformo y la medición de absorbancia por espectrofotometría. **B)** Producción de elastasa. La producción de elastasa extracelular se evaluó mediante el ensayo de Elastasa- Rojo Congo. Las cepas *P. aeruginosa* PAO1 y *E. coli* DH5 α se

utilizaron como controles positivo y negativo, respectivamente. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. El valor de P fue calculado utilizando el análisis de ANOVA de una vía combinado con la prueba de Dunnett con respecto al control PAO1. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Las barras representan el promedio \pm S.D. Las barras azules corresponden a las cepas marinas de *P. aeruginosa*, mientras que las barras rojas corresponden a los aislados clínicos de esta bacteria. La línea punteada muestra el valor obtenido para PAO1.

Los factores de virulencia extracelulares desempeñan un papel crucial en la virulencia de *P. aeruginosa* [177]. Entre estos factores encontramos a los ramnolípidos (RLs), los cuales son biosurfactantes con una amplia variedad de actividades. *P. aeruginosa* produce tanto mono-RLs (contiene 1 molécula de ramnosa) como di-RLs (contiene 2 moléculas de ramnosa). Se ha demostrado que los RLs desempeñan un papel crítico en la promoción de la virulencia [178]. Para evaluar la expresión de estos factores, la presencia de los RLs se detectó en el sobrenadante de cultivo de las cepas marinas y clínicas de *P. aeruginosa*. Como controles se utilizaron RLs purificados y la cepa *P. aeruginosa* PAO1, ya que esta cepa produce mono y di-RLs. Tanto las cepas marinas y clínicas de *P. aeruginosa* mostraron producción de ramnolípidos, tanto mono-RLs como di-RLs (Fig. 19), lo que concuerda con hallazgos previos sobre los tipos predominantes de RLs producidos por *P. aeruginosa* [179]. Estos resultados indican que tanto las cepas marinas como las clínicas poseen la capacidad de producir ambos tipos de ramnolípidos.

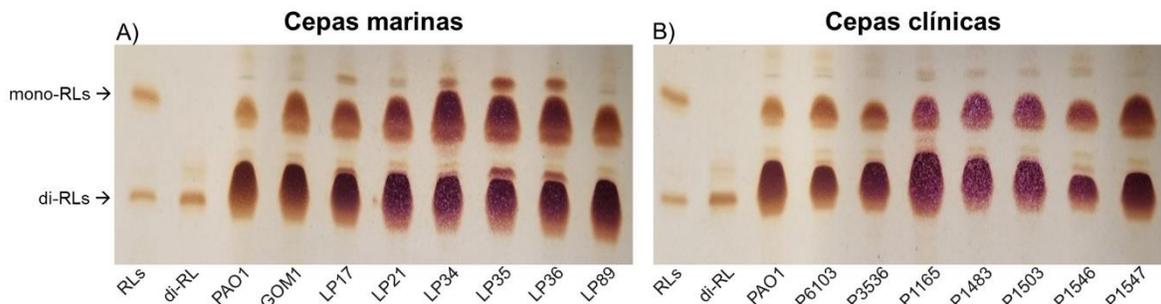


Figura. 19. Producción de ramnolípidos por cepas marinas y clínicas de *P. aeruginosa*. Se empleó la cromatografía en capa fina (TLC) para analizar la producción de RLs en el sobrenadante de cultivos de los aislados marinos y clínicos de *P. aeruginosa*. Las placas de TLC muestran la producción de RLs en los cepas. Como control, se utilizó una mezcla de mono-RL y Di-RL (RLs), o sólo Di-RL (Di-RL). El panel A representa los RLs producidos por los aislados marinos de *P. aeruginosa*, mientras que el panel B muestra los RLs producidos por las cepas clínicas de *P. aeruginosa*.

En conjunto, nuestros resultados muestran variabilidad de fenotipos entre las cepas de *P. aeruginosa* analizadas, pero en general indican que las cepas marinas son

capaces de mostrar fenotipos o expresar factores relacionados a virulencia de una manera similar o incluso a un nivel mayor que los aislados clínicos.

5.13. Las cepas marinas presentan mayor susceptibilidad a antibióticos que las cepas clínicas de *P. aeruginosa*.

La RA se ha observado principalmente en bacterias presentes en entornos clínicos, pero también se ha detectado en bacterias ambientales [17]. Para saber si los aislados marinos de *P. aeruginosa* exhiben RA, se determinaron perfiles de resistencia a distintos antibióticos en estas cepas y se hizo una comparación con los perfiles de RA de los aislados clínicos en estudio. Se seleccionaron los antibióticos: ceftazidima, piperacilina, meropenem, imipenem, norfloxacino, ciprofloxacino, gentamicina y amikacina, ya que estos son fármacos utilizados para el tratamiento de infecciones provocadas por *P. aeruginosa* [132,180]. Los resultados obtenidos indican que los aislados marinos presentan en general una mayor susceptibilidad a los antibióticos probados en comparación con los aislados clínicos, los cuales mostraron resistencia o resistencia intermedia a la mayoría de los antibióticos seleccionados (Fig. 20). Sin embargo, de manera interesante, 3 cepas marinas mostraron resistencia a algunos antibióticos (piperacilina, meropenem e imipenem). Por otro lado, las fluoroquinolonas inhibieron el crecimiento de todas las cepas marinas y fueron los antibióticos que mostraron la mayor inhibición en las cepas clínicas, esto es relevante ya que son medicamentos de primera elección en el tratamiento de infecciones ocasionadas por *P. aeruginosa* [181]. Estos resultados dan más evidencia del impacto que tiene la exposición de antibióticos en ambientes hospitalarios en la generación de bacterias resistentes, pero también muestran que en sitios sin exposición directa a antibióticos, como el ambiente marino, también puede haber bacterias resistentes. Esto último podría ser debido a la exposición a compuestos que generan resistencia cruzada a antibióticos o podría ser ocasionada por la contaminación bacteriana por actividades humanas.

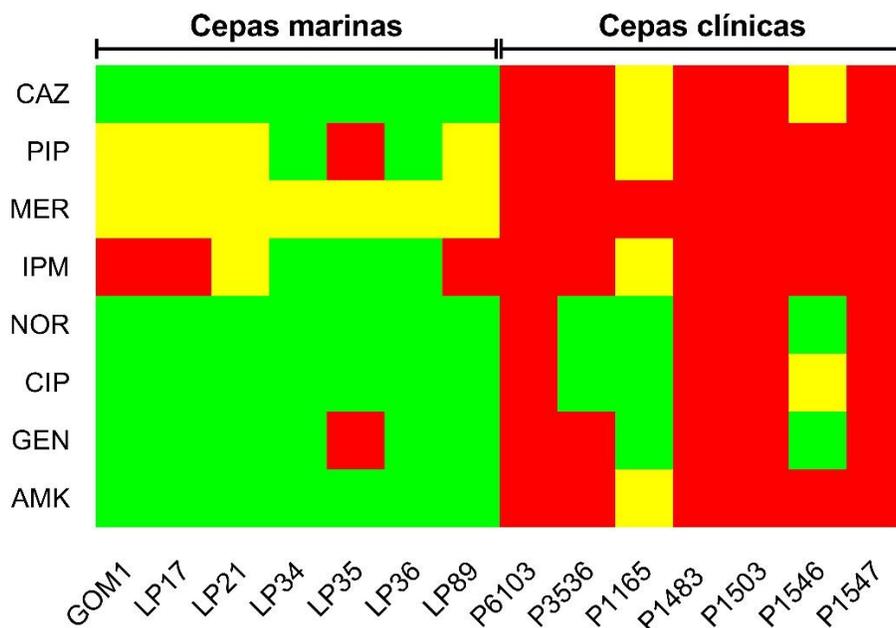


Figura. 20. Susceptibilidad a antibióticos de cepas marinas y clínicas de *P. aeruginosa*. Se muestra un mapa de calor que indica la susceptibilidad a los antibióticos seleccionados. Los colores rojo, amarillo y verde indican resistencia, resistencia intermedia y susceptibilidad, respectivamente. La clasificación de las cepas se realizó estableciendo la susceptibilidad a antibióticos mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria, según lo establecido por el CLSI. Los ensayos se realizaron por triplicado. CAZ: ceftazidima, PIP: piperacilina, MER: meropenem, IPM: imipenem, NOR, norfloxacin, CIP: ciprofloxacino, GEN: gentamicina, AMK: amikacina.

5.14. Análisis del impacto antropogénico sobre las cepas marinas y clínicas de *P. aeruginosa*.

El impacto de la actividad humana en el ambiente se relaciona con la presencia de contaminantes, incluyendo los antibióticos. Los integrones de clase 1 han sido utilizados como indicadores de este impacto en bacterias, ya que son una importante plataforma para el reclutamiento y movilización de genes de resistencia a antibióticos u otros compuestos antibacterianos; la abundancia de estos integrones puede cambiar rápidamente en respuesta a la presión de selección ejercida por estos compuestos y se pueden encontrar tanto en bacterias patógenas como no patógenas [182,183]. Para analizar el impacto antropogénico en las cepas marinas y clínicas de *P. aeruginosa*, nosotros detectamos por PCR el gen *int1* que codifica la integrasa del integrón clase 1 [155]. Los resultados revelaron la presencia del gen *int1* en 1 de las 7 cepas marinas y en 6 de las 7 cepas clínicas (Fig. 21).

Como podría ser esperado, estos resultados indican un mayor impacto antropogénico en los aislados clínicos que en las cepas marinas. De manera interesante, la cepa marina en la que se detectó *int1* fue la que mostró resistencia a 3 diferentes antibióticos (LP35), asimismo, la cepa clínica en la que no se detectó *int1* fue la que mostró mayor susceptibilidad a antibióticos (P1165).

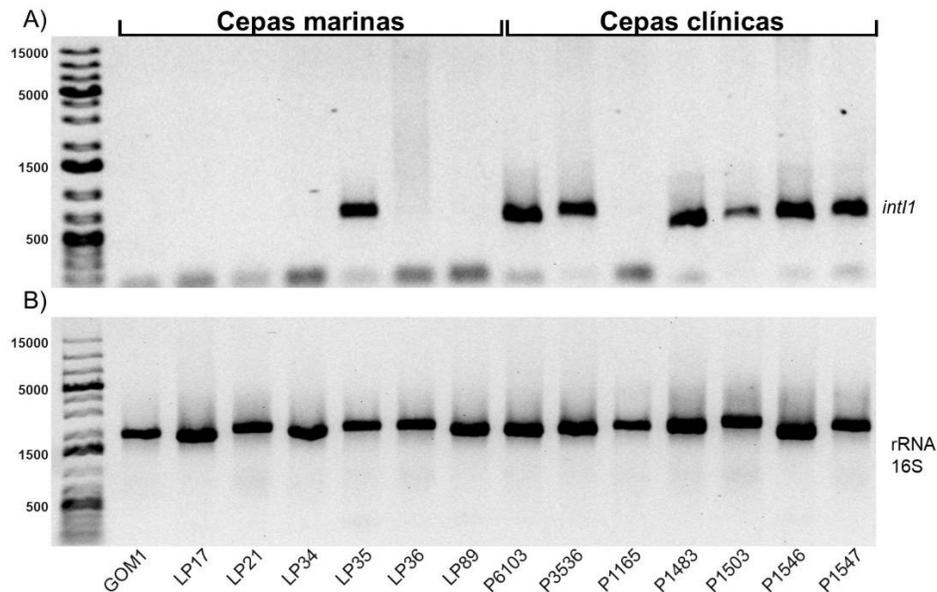


Figura. 21. Detección del gen *int1* en las cepas marinas y clínicas de *P. aeruginosa*. Se realizó la amplificación mediante PCR del gen *int1* (A) o del gen rRNA 16S (utilizado como control) (B) en las cepas marinas y clínicas de *P. aeruginosa*. Las bandas corresponden a los productos de PCR visualizados mediante electroforesis en agarosa al 0.8%. Las reacciones de PCR se realizaron por triplicado. Para las reacciones de PCR se utilizó DNA genómico que fue obtenido de manera independiente para cada una de las determinaciones.

6. DISCUSIÓN

Los microorganismos marinos han sido poco explorados como fuente de moléculas con actividad biológica, los cuales producen una amplia gama de compuestos altamente complejos incluidos antibióticos y otras moléculas antimicrobianas.

En nuestro estudio, de un análisis de 82 cepas aisladas de agua del GoM, identificamos una cepa, *Pseudomonas* sp. GOM7, que muestra actividad antibacteriana especialmente contra *S. aureus* resistente a antibióticos. Interesantemente, la secuenciación y análisis del genoma de *Pseudomonas* sp. GOM7 reveló que esta bacteria es una nueva especie del género *Pseudomonas*. Nuestros resultados indican que la especie bacteriana más cercana a *Pseudomonas* sp. GOM7 es *P. guguanensis* JCM 18416, la cual fue aislada de una muestra de agua termal en Taiwán [184]. Cuatro de las 25 especies de bacterias más cercanas a *Pseudomonas* sp. GOM7 fueron aislados de fuentes marinas, incluyendo *P. alcaliphila* JCM 10630, aislada a partir de agua de mar [185], así como *P. chengduensis* 402, *Pseudomonas* sp. 8Z y *Pseudomonas* sp. 8O, aisladas a partir de algas marinas [165]. Así, el genoma de *Pseudomonas* sp. GOM7 parece contener rasgos particulares de especies de *Pseudomonas* que habitan en medios acuáticos.

Tanto las colonias como el sobrenadante de cultivo de *Pseudomonas* sp. GOM7 tuvieron actividad contra todas las cepas resistentes a antibióticos de *S. aureus* probadas; las colonias, pero no el sobrenadante de cultivo también tuvieron actividad contra *E. coli*, *S. Typhimurium* y *B. subtilis*. Nuestros resultados indican que *Pseudomonas* sp. GOM7 tiene mayor actividad antibacteriana contra bacterias Gram-positivas. Es probable que esta diferencia en la susceptibilidad esté relacionada con la membrana externa en las bacterias Gram-negativas, la cual protege de la actividad de *Pseudomonas* sp. GOM7 [186]. Notablemente, *Pseudomonas* sp. GOM7 inhibió el crecimiento y presentó actividad bactericida contra *S. aureus* resistente a meticilina, que es uno de los patógenos prioritarios establecidos por la OMS para los cuales es urgente el desarrollo de nuevos antibióticos.

El o los compuestos anti-*S. aureus* producidos por *Pseudomonas* sp. GOM7 se extrajeron del sobrenadante de cultivo utilizando acetato de etilo, el cual es un solvente medianamente polar. El análisis mediante TLC del extracto de acetato de etilo mostró la presencia de 5 diferentes compuestos con naturaleza polar. Varios estudios han demostrado la eficacia del acetato de etilo en la extracción de compuestos antibacterianos a partir de cultivos de diferentes bacterias, incluyendo cepas marinas [187,188]. Diferentes tipos de compuestos como péptidos, ácidos grasos, ésteres, esteroides, alquenos y terpenos se pueden extraer con acetato de etilo [189,190]. Metabolitos con actividad anti-MRSA, como quinolonas, glucósidos, alcaloides y ácidos grasos, han sido identificados mediante extracciones con acetato de etilo a partir de cultivos de bacterias [191,192]. Así, la actividad antibacteriana mostrada por *Pseudomonas* sp. GOM7 puede estar relacionada a los compuestos mencionados.

El análisis del genoma de *Pseudomonas* sp. GOM7 reveló seis BGCs que codifican probables metabolitos secundarios relacionados con actividad antimicrobiana, dos parecen ser únicos (no se identificaron ortólogos según antiSMASH) y cuatro presentan similitud con BGCs previamente reportados y caracterizados (Fig. 11). Los dos BGCs únicos de *Pseudomonas* sp. GOM7 codifican RiPPs, que son péptidos abundantes en el microbioma humano y a los que se les reconoce actividad antibiótica [193]. Recientemente se encontró un BGC tipo RiPP que está implicado en la actividad antibacteriana de *Pseudomonas* sp. RGM2144 contra el patógeno de peces *Flavobacterium psychrophylum* [194]. Otros dos de los BGC de *Pseudomonas* sp. GOM7 codifican para β -lactonas, compuestos que se han relacionado con una amplia gama de actividades biológicas, incluyendo actividades antibacterianas, antifúngicas y antivirales [195]. *Pseudomonas* sp. y *P. fluorescens* ATCC 39502 producen las β -lactonas EM5395 y obafluorina (BGC0001437), respectivamente, que tienen actividad contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas [196,197]. Las otras dos BGCs predichas de *Pseudomonas* sp. GOM7 contienen NRPs. Los NRPs son metabolitos peptídicos secundarios que se encuentran en bacterias, cianobacterias y hongos, además, se han reportado NRPs antimicrobianos producidos por bacterias marinas [198]. Uno de esos NRP de

Pseudomonas sp. GOM7 es similar a un NRP putativo de *Pseudomonas* sp. 8Z [165]. El otro NRP predicho mostró la mayor similitud con un NRP de la bacteria del suelo *P. fluorescens* In5, la cual sintetiza nunapeptina y nunamicina, dos péptidos con actividad antibacteriana contra el fitopatógeno *Rhizoctonia solani* [168]. Es importante señalar que la mayoría de los BGCs predichos de *Pseudomonas* sp. GOM7 codifican péptidos, que son moléculas que pueden extraerse con el disolvente acetato de etilo [190]. Por lo tanto, es tentador especular que la actividad antibacteriana de *Pseudomonas* sp. GOM7 se debe a uno o más péptidos.

El género *Pseudomonas* es ubicuo y produce una variedad de moléculas con distintas actividades biológicas, que incluyen compuestos antimicrobianos, sideróforos, enzimas líticas, fenazinas, péptidos, glicolípidos e hidrocarburos alifáticos [87,199]. Estudios anteriores han reportado otras especies marinas de *Pseudomonas* con actividad antibacteriana contra *S. aureus*. Por ejemplo, la cepa de *Pseudomonas* sp. UJ-6 produce el metabolito secundario 1-acetil-beta-corbolina con actividad antibacteriana contra MRSA [76]. Otro metabolito llamado 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG), un policétido fenólico, producido por *Pseudomonas* sp. AMSN mostró actividad anti-MRSA [200]. Asimismo, los compuestos andrimida y moiramida A-C de *P. fluorescens* mostraron actividad antibacteriana contra *S. aureus* MRSA [201]. Por otro lado, la cepa marina de *P. alcaliphila* JCM 10630 produce toxoflavina que tiene propiedades antibióticas contra *Legionella pneumophila* y su huésped, la ameba *Vermamoeba vermiformis* [202]; sin embargo, los genes para la producción de toxoflavina no se encontraron en el genoma de *Pseudomonas* sp. GOM7. Por otra parte, el genoma de *Pseudomonas* sp. GOM7 tampoco presenta los genes *flc* que producen fluopsina C, relacionada con la actividad antibacteriana de *P. aeruginosa* contra *S. aureus* [203]. Además, el genoma de *Pseudomonas* sp. GOM7 presenta sólo algunos de los genes *phz* implicados en la síntesis de piocianina, un derivado de las fenazinas que muestra actividad antibacteriana contra *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *M. luteus*, *P. teessidea*, y *P. clemancea* [204].

En favor de continuar con su análisis como fuente de probables nuevos compuestos antibacterianos, nuestros resultados apoyan que *Pseudomonas* sp. GOM7 presenta nula virulencia comparada con *P. aeruginosa*, la especie de *Pseudomonas* de mayor relevancia clínica.

Además de *Pseudomonas* sp. GOM7, identificamos otras 7 cepas aisladas del GoM que muestran actividad antibacteriana contra todas las cepas patógenas probadas. Estas 7 cepas fueron identificadas como *P. aeruginosa* mediante el análisis de la secuencia del gen rRNA 16S. Varios estudios han reportado que *P. aeruginosa* produce piocianina, un pigmento que tiene actividad antibacteriana de amplio espectro [205]. Por lo tanto, en nuestro estudio no ahondamos más sobre la actividad antibacteriana de las cepas de *P. aeruginosa* aisladas del GoM. Sin embargo, considerando que *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista y que es importante analizar el riesgo para la salud que podría representar la presencia de este tipo de patógenos en el ambiente, decidimos analizar las propiedades de virulencia y de resistencia a antibióticos de las cepas de *P. aeruginosa* del GoM. A este respecto, encontramos que las cepas de *P. aeruginosa* del GoM presentaron una virulencia similar a cepas clínicas de *P. aeruginosa*, en el modelo de larvas de *G. mellonella*. Diversos estudios han utilizado a *G. mellonella* para el análisis de virulencia bacteriana [206]; en el caso de cepas de *P. aeruginosa* se ha determinado que entre 10 a 100 bacterias generan la muerte de *G. mellonella* en aproximadamente 24 h después de la infección [207]. Nuestros resultados muestran que con dosis infectivas similares tanto las cepas marinas como los aislados clínicos de *P. aeruginosa* son capaces de provocar la muerte de larvas de *G. mellonella*. Previos estudios han mostrado que cepas ambientales de *P. aeruginosa* presentan virulencia en el modelo de *G. mellonella* [208,209]. Asimismo, nuestros resultados mostraron que las cepas marinas y las cepas clínicas de *P. aeruginosa* que evaluamos forman biopelícula, en ambos casos se presentó variación entre las cepas en los niveles de biopelícula formada. La formación de biopelícula representa un mecanismo de resistencia a las condiciones ambientales adversas, incluyendo la presencia de antibióticos, y es un importante factor de virulencia, lo cual facilita la colonización de tejidos y de superficies abióticas, como dispositivos médicos

[210,211]. Se ha reportado que en el ambiente, incluido el marino, la biopelícula es la principal forma de vida de las bacterias, la cual permite la formación de complejas asociaciones microbianas [212,213]. Diversos estudios han reportado cepas marinas de *P. aeruginosa* capaces de formar biopelícula [214,215]. Además, nuestros resultados indican que las cepas marinas y las cepas clínicas de *P. aeruginosa* evaluadas expresan factores involucrados en la virulencia de esta bacteria (expresión del SST3, producción de las toxinas ExoS y ExoU, piocianina, elastasa y RLs). La producción de factores como la piocianina y la elastasa fue incluso mayor en las cepas marinas que en las clínicas.

La mayoría de las cepas marinas (6 de 7) secretaron la toxina ExoS, solo la cepa LP35 secretó la toxina ExoU, en el caso de las cepas clínicas 4 secretaron ExoS y 3 secretaron ExoU. Se ha reportado que ExoS es más prevalente en aislados ambientales y que ExoU es más común en aislados clínicos de *P. aeruginosa* [97]. La secreción de toxinas como ExoS, ExoT, ExoU y ExoY, mediante el SST3, se ha asociado con una mayor virulencia en *P. aeruginosa* [216]. Además, la presencia de ExoU está significativamente ligada con la resistencia a múltiples antibióticos [217,218]. Los resultados de secreción de las toxinas ExoS y ExoU indican además que las cepas marinas y clínicas de *P. aeruginosa* analizadas tienen un SST3 funcional. Este sistema de secreción se asocia a virulencia; sin embargo, también puede hallarse en numerosas bacterias no patógenas. Hu y colaboradores analizaron alrededor de 20,000 genomas bacterianos e identificaron genes para un SST3 en 109 géneros, abarcando desde bacterias ambientales no relacionadas con huéspedes eucariontes hasta bacterias benéficas para las plantas, como rizobios y algunas especies de *Pseudomonas* [219].

Estudios previos también han reportado la producción de piocianina y elastasa en cepas ambientales de *P. aeruginosa* [125,220,221]. La piocianina es un pigmento con propiedades redox-activas, actúa como un importante aceptor de electrones, además de su papel en virulencia, tiene funciones ecológicas relacionadas con señalización [222]. La elastasa B es la proteasa más abundante en el secretoma de *P. aeruginosa* y su función ecológica está relacionada con la obtención de nutrientes

mediante la degradación de proteínas [223]. Por otro lado, también se ha reportado la producción de RLs en cepas marinas de *P. aeruginosa* [224–226]. Los RLs desempeñan un papel crucial en la formación y maduración de biopelículas, así como en la motilidad, dispersión y propagación de las bacterias embebidas en la biopelícula [227].

En conjunto, nuestros resultados muestran que las cepas de *P. aeruginosa* aisladas del GoM poseen propiedades de virulencia similares a las de los aislados clínicos de esta bacteria, lo cual sugiere que factores asociados a virulencia en *P. aeruginosa* cumplen una función ecológica, permitiendo a la bacteria prosperar en diversos entornos [228]. Nuestros hallazgos concuerdan con estudios previos que indican que todas las cepas de *P. aeruginosa* podrían ser potencialmente patógenas, independientemente de sus nichos ecológicos, incluido el ambiente marino.

Además de las propiedades de virulencia, también comparamos la susceptibilidad a antibióticos entre las cepas marinas y clínicas de *P. aeruginosa* en estudio. Nuestros resultados muestran que las cepas marinas son más susceptibles a antibióticos que los aislados clínicos de esta bacteria. Esto coincide con investigaciones previas, las cuales indican una mayor proporción de susceptibilidad en cepas ambientales comparadas con aislados clínicos de *P. aeruginosa* [229,230]. Interesantemente, algunas cepas marinas mostraron resistencia a carbapenémicos, como meropenem e imipenem. Esto podría explicarse, al menos en parte, a la existencia de mecanismos de resistencia no específicos, como las bombas de eflujo [231]. Algunos estudios sugieren que el aumento de la actividad del sistema de eflujo contribuye a la resistencia a antibióticos de cepas ambientales de *P. aeruginosa*, incluidas las procedentes de entornos acuáticos. [232,233]. Adicionalmente, estudios anteriores han revelado la presencia de determinantes genéticos de resistencia a antibióticos en bacterias que habitan entornos naturales prístinos, como cuevas, aguas profundas y el subsuelo [10,234,235].

La aparición de RA se asocia principalmente con la exposición a antibióticos resultante de las actividades humanas. Los integrones de clase 1 están implicados

en la adquisición y propagación de genes de resistencia a los antibióticos y se utilizan como marcadores de este impacto antropogénico [182,236]. Se sabe que los integrones desempeñan un papel importante en la generación de diversidad fenotípica y la respuesta adaptativa, además del desarrollo de la resistencia a los antibióticos y movilización de genes [237]. La fuerte presión selectiva ejercida por el uso humano de antibióticos favorece la rápida aparición, fijación y propagación de estos integrones clase 1 en las poblaciones bacterianas. Numerosos estudios demuestran que la abundancia de la integrasa de clase 1 (gen *intl1*) coincide con los niveles de impacto antropogénico y los niveles de contaminación en diferentes entornos [238,239]. Así, nosotros evaluamos la presencia de integrones de clase 1 en los genomas de las cepas de *P. aeruginosa* en estudio, para comparar el impacto antropogénico entre las cepas marinas y clínicas. Como podría ser esperado, estos integrones clase 1 se detectaron en casi todas las cepas clínicas (en 6 de las 7 cepas) y en solo una de las 7 cepas marinas, lo que indica una influencia antropogénica más marcada en los aislados clínicos en comparación con los marinos. Interesantemente, la cepa marina (LP35) que exhibe una menor susceptibilidad a los antibióticos es precisamente la que posee el integrón clase 1. Esta correlación podría indicar que su origen se encuentra en un hábitat con una mayor exposición antropogénica o más contaminada. Es importante destacar que los ambientes acuáticos son reconocidos como uno de los reservorios y rutas de diseminación de resistencia a antibióticos más importantes a nivel global [240]. Varios estudios han documentado la presencia de integrones clase 1 en cepas de *P. aeruginosa* resistentes a antibióticos procedentes de diversos ambientes, incluyendo entornos acuáticos [241,242]. En contraste, el aislado clínico que carece del integrón clase 1 podría tener un origen ligado a un ambiente con una menor influencia antropogénica, lo que se refleja también en su mayor susceptibilidad a los antibióticos. Importante destacar que investigaciones previas han arrojado resultados similares a los nuestros al identificar la presencia de integrones clase 1 en aislados tanto ambientales como clínicos de *P. aeruginosa* [243].

En conjunto, nuestros resultados resaltan el potencial del ambiente marino del GoM como una fuente de búsqueda de nuevos antibióticos para combatir la problemática

de la RA. Asimismo, muestran que las cepas de *P. aeruginosa* obtenidas de este ambiente poseen propiedades de virulencia similares a las de cepas clínicas de esta bacteria y expresan factores que se han asociado a la virulencia de cepas clínicas. Además, nuestros resultados indican que las cepas del GoM que analizamos presentan una mayor susceptibilidad a los antibióticos en comparación con las cepas clínicas, lo que indica una menor presión selectiva en el entorno marino. En apoyo a esto, nuestro análisis reveló un menor impacto antropogénico en las cepas marinas comparadas con las clínicas.

7. CONCLUSIONES

- 8 de 82 cepas bacterianas del GoM analizadas presentaron actividad antibacteriana extracelular.
- Se identificó una nueva especie de *Pseudomonas* con actividad antibacteriana, principalmente contra cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos, la cual no es virulenta en el modelo de *G. mellonella*.
- En el genoma de *Pseudomonas* sp. GOM7 se predijeron seis potenciales BGCs relacionados a la producción de compuestos antimicrobianos con la herramienta antiSMASH.
- La actividad anti-*S. aureus* producida por *Pseudomonas* sp. GOM7 está relacionada con un compuesto de polaridad media y soluble en acetato de etilo.
- Cepas de *P. aeruginosa* del GoM presentan propiedades de virulencia similares a aislados clínicos de la misma especie.
- La susceptibilidad a antibióticos es mayor en cepas de *P. aeruginosa* provenientes del GoM que en aislados clínicos de la misma especie. Esto parece estar relacionado a un mayor impacto antropogénico en los aislados clínicos que en las cepas marinas, lo cual se determinó por la presencia de integrones de clase 1.

8. PERSPECTIVAS

- Identificar él o los compuestos con actividad antibacteriana producidos por *Pseudomonas* sp. GOM7 y analizar su aplicación como antibacteriano.
- Mutar los genes de biosíntesis de piocianina de las cepas LP35 y LP36 para evaluar si hay otros compuestos producidos por estas cepas que tengan actividad antibacteriana.
- Analizar los determinantes genéticos de resistencia a antibióticos en las bacterias del GoM que presentan RA.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Mancuso G, Midiri A, Gerace E, Biondo C. Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. *Pathogens*. 2021;10: 1310. doi:10.3390/pathogens10101310
2. OMS. Plan de Accion mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos. 2016. Available: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/es/>
3. Duval RE, Grare M, Demoré B. Fight Against Antimicrobial Resistance: We Always Need New Antibacterials but for Right Bacteria. *Molecules*. 2019;24: 3152. doi:10.3390/molecules24173152
4. O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recomendations. In: *The Review on Antimicrobial Resistance* [Internet]. 2016 [cited 31 Oct 2019] p. 76. Available: <https://amr-review.org/>
5. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*. 2022;399: 629–655. doi:10.1016/S0140-6736(21)02724-0
6. WHO. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. In: WHO [Internet]. 2017 [cited 9 Oct 2019] p. 7. Available: <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
7. Demain AL, Fang A. The natural functions of secondary metabolites. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2000;69: 1–39. doi:10.1007/3-540-44964-7_1
8. Pishchany G, Kolter R. On the possible ecological roles of antimicrobials. *Mol Microbiol*. 2020;113: 580–587. doi:10.1111/mmi.14471
9. Dantas G, Sommer MOA, Oluwasegun RD, Church GM. Bacteria Subsisting on Antibiotics. *Science* (80-). 2008;320: 100–103. doi:10.1126/science.1155157
10. Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, Koteva K, Banks ED, Johnston MD, et al. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS One*. 2012;7: 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0034953
11. D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WWL, Schwarz C, et al. Antibiotic resistance is ancient. *Nature*. 2011;477: 457–461. doi:10.1038/nature10388
12. Chinemerem Nwobodo D, Ugwu MC, Oliseloke Anie C, Al-Ouqaili MTS, Chinedu Ikem J, Victor Chigozie U, et al. Antibiotic resistance: The challenges and some emerging strategies for tackling a global menace. *J Clin Lab Anal*. 2022;36. doi:10.1002/jcla.24655
13. Cox G, Wright GD. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int J Med Microbiol*. 2013;303: 287–292. doi:10.1016/j.ijmm.2013.02.009

14. Zgurskaya HI. Molecular analysis of efflux pump-based antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol.* 2002;292: 95–105. doi:10.1078/1438-4221-00195
15. Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science (80-).* 1994;264: 382–388. doi:10.1126/science.8153625
16. Jian Z, Zeng L, Xu T, Sun S, Yan S, Yang L, et al. Antibiotic resistance genes in bacteria: Occurrence, spread, and control. *J Basic Microbiol.* 2021;61: 1049–1070. doi:10.1002/jobm.202100201
17. Andersson DI, Hughes D. Selection and Transmission of Antibiotic-Resistant Bacteria. Baquero F, Bouza E, Gutiérrez-Fuentes JA, Coque TM, editors. *Microbiol Spectr.* 2017;5. doi:10.1128/microbiolspec.MTBP-0013-2016
18. Emamalipour M, Seidi K, Zununi Vahed S, Jahanban-Esfahlan A, Jaymand M, Majdi H, et al. Horizontal Gene Transfer: From Evolutionary Flexibility to Disease Progression. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8. doi:10.3389/fcell.2020.00229
19. Christaki E, Marcou M, Tofarides A. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *J Mol Evol.* 2020;88: 26–40. doi:10.1007/s00239-019-09914-3
20. Larsson DGJ, Flach CF. Antibiotic resistance in the environment. *Nat Rev Microbiol.* 2022;20: 257–269. doi:10.1038/s41579-021-00649-x
21. Fajardo A, Martínez JL. Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. *Curr Opin Microbiol.* 2008;11: 161–167. doi:10.1016/j.mib.2008.02.006
22. Goh E-B, Yim G, Tsui W, McClure J, Surette MG, Davies J. Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Proc Natl Acad Sci.* 2002;99: 17025–17030. doi:10.1073/pnas.252607699
23. Dantas G, Sommer MOA. Context matters - the complex interplay between resistome genotypes and resistance phenotypes. *Curr Opin Microbiol.* 2012;15: 577–582. doi:10.1016/j.mib.2012.07.004
24. Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J. Call of the wild: Antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8: 251–259. doi:10.1038/nrmicro2312
25. Martínez JL. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science (80-).* 2008;321: 365–367. doi:10.1126/science.1159483
26. Browne AJ, Chipeta MG, Haines-Woodhouse G, Kumaran EPA, Hamadani BHK, Zarea S, et al. Global antibiotic consumption and usage in humans, 2000–18: a spatial modelling study. *Lancet Planet Heal.* 2021;5: e893–e904. doi:10.1016/S2542-5196(21)00280-1
27. Centers for Disease Control and Prevention NC for E and ZID, Division of Healthcare Quality Promotion. COVID-19: U.S. Impact on Antimicrobial Resistance, Special

Report 2022. Atlanta, Georgia; 2022 Jun. doi:10.15620/cdc:117915

28. Jones F, Ricke S. Observations on the history of the development of antimicrobials and their use in poultry feeds. *Poult Sci.* 2003;82: 613–617. doi:10.1093/ps/82.4.613
29. Butaye P, Devriese LA, Haesebrouck F. Antimicrobial Growth Promoters Used in Animal Feed: Effects of Less Well Known Antibiotics on Gram-Positive Bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16: 175–188. doi:10.1128/CMR.16.2.175-188.2003
30. Teillant A, Brower CH, Laxminarayan R. Economics of Antibiotic Growth Promoters in Livestock. *Annu Rev Resour Econ.* 2015;7: 349–374. doi:10.1146/annurev-resource-100814-125015
31. Martens E, Demain AL. The antibiotic resistance crisis, with a focus on the United States. *J Antibiot (Tokyo).* 2017;70: 520–526. doi:10.1038/ja.2017.30
32. Årdal C, Balasegaram M, Laxminarayan R, McAdams D, Outtersson K, Rex JH, et al. Antibiotic development — economic, regulatory and societal challenges. *Nat Rev Microbiol.* 2020;18: 267–274. doi:10.1038/s41579-019-0293-3
33. Norrby SR, Nord CE, Finch R. Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health. *Lancet Infect Dis.* 2005;5: 115–119. doi:10.1016/S1473-3099(05)01283-1
34. Årdal C, Baraldi E, Theuretzbacher U, Outtersson K, Plahte J, Ciabuschi F, et al. Insights into early stage of antibiotic development in small- and medium-sized enterprises: A survey of targets, costs, and durations. *J Pharm Policy Pract.* 2018;11: 1–10. doi:10.1186/s40545-018-0135-0
35. Pariente N. The antimicrobial resistance crisis needs action now. *PLOS Biol.* 2022;20: e3001918. doi:10.1371/journal.pbio.3001918
36. McEwen SA, Collignon PJ. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. Aarestrup FM, Schwarz S, Shen J, Cavaco L, editors. *Microbiol Spectr.* 2018;6. doi:10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017
37. Cabrera-Pardo JR, Lood R, Udekwu K, Gonzalez-Rocha G, Munita JM, Järhult JD, et al. A One Health – One World initiative to control antibiotic resistance: A Chile - Sweden collaboration. *One Heal.* 2019;8: 100100. doi:10.1016/j.onehlt.2019.100100
38. Velazquez-Meza ME, Galarde-López M, Carrillo-Quiróz B, Alpuche-Aranda CM. Antimicrobial resistance: One Health approach. *Vet World.* 2022; 743–749. doi:10.14202/vetworld.2022.743-749
39. Hernando-Amado S, Coque TM, Baquero F, Martínez JL. Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nat Microbiol.* 2019;4: 1432–1442. doi:10.1038/s41564-019-0503-9
40. Amábile-Cuevas CF. Antibiotic usage and resistance in Mexico: An update after a decade of change. *J Infect Dev Ctries.* 2021;15: 442–449. doi:10.3855/JIDC.13467

41. Garza-González E, Franco-Cendejas R, Morfín-Otero R, Echaniz-Aviles G, Rojas-Larios F, Bocanegra-Ibarias P, et al. The Evolution of Antimicrobial Resistance in Mexico during the Last Decade: Results from the INVIFAR Group. *Microb Drug Resist*. 2020;26: 1372–1382. doi:10.1089/mdr.2019.0354
42. Garza-González E, Morfín-Otero R, Mendoza-Olazarán S, Bocanegra-Ibarias P, Flores-Treviño S, Rodríguez-Noriega E, et al. A snapshot of antimicrobial resistance in Mexico. Results from 47 centers from 20 states during a six-month period. *PLoS One*. 2019;14: 1–13. doi:10.1371/journal.pone.0209865
43. Programa Universitario de Investigación en Salud. Plan universitario de control de la resistencia antimicrobiana. Universidad Nacional Autónoma de México. 2018.
44. Mahoney AR, Safae MM, Wuest WM, Furst AL. The silent pandemic: Emergent antibiotic resistances following the global response to SARS-CoV-2. *iScience*. 2021;24: 102304. doi:10.1016/j.isci.2021.102304
45. Beović B, Doušak M, Ferreira-Coimbra J, Nadrah K, Rubulotta F, Belliato M, et al. Antibiotic use in patients with COVID-19: a ‘snapshot’ Infectious Diseases International Research Initiative (ID-IRI) survey. *J Antimicrob Chemother*. 2020;75: 3386–3390. doi:10.1093/jac/dkaa326
46. Langford BJ, So M, Simeonova M, Leung V, Lo J, Kan T, et al. Antimicrobial resistance in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Microbe*. 2023;4: e179–e191. doi:10.1016/S2666-5247(22)00355-X
47. Rawson TM, Moore LSP, Zhu N, Ranganathan N, Skolimowska K, Gilchrist M, et al. Bacterial and Fungal Coinfection in Individuals With Coronavirus: A Rapid Review To Support COVID-19 Antimicrobial Prescribing. *Clin Infect Dis*. 2020. doi:10.1093/cid/ciaa530
48. Garcia-Vidal C, Sanjuan G, Moreno-García E, Puerta-Alcalde P, Garcia-Pouton N, Chumbita M, et al. Incidence of co-infections and superinfections in hospitalized patients with COVID-19: a retrospective cohort study. *Clin Microbiol Infect*. 2021;27: 83–88. doi:10.1016/j.cmi.2020.07.041
49. Lu J, Guo J. Disinfection spreads antimicrobial resistance. Sills J, editor. *Science* (80-). 2021;371: 474–474. doi:10.1126/science.abg4380
50. Pérez de la Lastra JM, Anand U, González-Acosta S, López MR, Dey A, Bontempi E, et al. Antimicrobial Resistance in the COVID-19 Landscape: Is There an Opportunity for Anti-Infective Antibodies and Antimicrobial Peptides? *Front Immunol*. 2022;13. doi:10.3389/fimmu.2022.921483
51. Rodríguez-Baño J, Rossolini GM, Schultsz C, Tacconelli E, Murthy S, Ohmagari N, et al. Key considerations on the potential impacts of the COVID-19 pandemic on antimicrobial resistance research and surveillance. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2021;115: 1122–1129. doi:10.1093/trstmh/trab048

52. Ruiz B, Chávez A, Forero A, García-Huante Y, Romero A, Snchez M, et al. Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. *Crit Rev Microbiol.* 2010;36: 146–167. doi:10.3109/10408410903489576
53. Ali SM, Siddiqui R, Khan NA. Antimicrobial discovery from natural and unusual sources. *J Pharm Pharmacol.* 2018;70: 1287–1300. doi:10.1111/jphp.12976
54. Harvey AL, Edrada-Ebel R, Quinn RJ. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nat Rev Drug Discov.* 2015;14: 111–129. doi:10.1038/nrd4510
55. Núñez-Montero K, Barrientos L. Advances in antarctic research for antimicrobial discovery: A comprehensive narrative review of bacteria from antarctic environments as potential sources of novel antibiotic compounds against human pathogens and microorganisms of industrial importance. *Antibiotics.* 2018;7. doi:10.3390/antibiotics7040090
56. Demain AL, Gómez-Ortiz B, Ruiz-Villafán B, Rodríguez-Sanoja R, Sánchez S. Recent findings of molecules with anti-infective activity: screening of non-conventional sources. *Curr Opin Pharmacol.* 2019;48: 40–47. doi:10.1016/j.coph.2019.04.003
57. Genilloud O. Natural products discovery and potential for new antibiotics. *Curr Opin Microbiol.* 2019;51: 81–87. doi:10.1016/j.mib.2019.10.012
58. da Cunha BR, Fonseca LP, Calado CRC. Antibiotic discovery: Where have we come from, where do we go? *Antibiotics.* 2019;8. doi:10.3390/antibiotics8020045
59. Durand GA, Raoult D, Dubourg G. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *Int J Antimicrob Agents.* 2019;53: 371–382. doi:10.1016/j.ijantimicag.2018.11.010
60. Nichols D, Cahoon N, Trakhtenberg EM, Pham L, Mehta A, Belanger A, et al. Use of Ichip for High-Throughput In Situ Cultivation of “Uncultivable” Microbial Species. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76: 2445–2450. doi:10.1128/AEM.01754-09
61. Ling LL, Schneider T, Peoples AJ, Spoering AL, Engels I, Conlon BP, et al. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature.* 2015;517: 455–459. doi:10.1038/nature14098
62. Kealey C, Creaven CA, Murphy CD, Brady CB. New approaches to antibiotic discovery. *Biotechnol Lett.* 2017;39: 805–817. doi:10.1007/s10529-017-2311-8
63. Yang Y, Kessler MGC, Marchán-Rivadeneira MR, Han Y. Combating Antimicrobial Resistance in the Post-Genomic Era: Rapid Antibiotic Discovery. *Molecules.* 2023;28: 4183. doi:10.3390/molecules28104183
64. Zhu J-W, Zhang S-J, Wang W-G, Jiang H. Strategies for Discovering New Antibiotics from Bacteria in the Post-Genomic Era. *Curr Microbiol.* 2020;77: 3213–3223. doi:10.1007/s00284-020-02197-8

65. Blunt JW, Copp BR, Munro MHG, Northcote PT, Prinsep MR. Marine natural products. *Nat Prod Rep*. 2010;27: 165. doi:10.1039/b906091j
66. Armstrong E, Yan L, Boyd KG, Wright PC, Burgess JG. The symbiotic role of marine microbes on living surfaces. *Hydrobiologia*. 2001;461: 37–40. doi:10.1023/A:1012756913566
67. Kowalewski M, Finnegan S. Theoretical Diversity of the Marine Biosphere. *Paleobiology*. 2010;36: 1–15. Available: <http://www.jstor.org/stable/25609440>
68. Stincone P, Brandelli A. Marine bacteria as source of antimicrobial compounds. *Crit Rev Biotechnol*. 2020;40: 306–319. doi:10.1080/07388551.2019.1710457
69. Mayer AMS, Hamann MT. Marine pharmacology in 2001–2002: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovas. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol*. 2005;140: 265–286. doi:10.1016/j.cca.2005.04.004
70. Romano G, Costantini M, Sansone C, Lauritano C, Ruocco N, Ianora A. Marine microorganisms as a promising and sustainable source of bioactive molecules. *Mar Environ Res*. 2017;128: 58–69. doi:10.1016/j.marenvres.2016.05.002
71. Mora C, Tittensor DP, Adl S, Simpson AGB, Worm B. How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? Mace GM, editor. *PLoS Biol*. 2011;9: e1001127. doi:10.1371/journal.pbio.1001127
72. Stincone P, Brandelli A. Marine bacteria as source of antimicrobial compounds. *Crit Rev Biotechnol*. 2020;40: 306–319. doi:10.1080/07388551.2019.1710457
73. Bhatnagar I, Kim SK. Immense essence of excellence: Marine microbial bioactive compounds. *Mar Drugs*. 2010;8: 2673–2701. doi:10.3390/md8102673
74. Raimundo I, Silva SG, Costa R, Keller-Costa T. Bioactive secondary metabolites from octocoral-Associated microbes—New chances for blue growth. *Mar Drugs*. 2018;16. doi:10.3390/md16120485
75. Liu M, El-Hossary EM, Oelschlaeger TA, Donia MS, Quinn RJ, Abdelmohsen UR. Potential of marine natural products against drug-resistant bacterial infections. *Lancet Infect Dis*. 2019;19: e237–e245. doi:10.1016/S1473-3099(18)30711-4
76. Lee D-S, Eom S-H, Jeong S-Y, Shin HJ, Je J-Y, Lee E-W, et al. Anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) substance from the marine bacterium *Pseudomonas* sp. UJ-6. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2013;35: 171–177. doi:10.1016/j.etap.2012.11.011
77. Santos JD, Vitorino I, Reyes F, Vicente F, Lage OM. From ocean to medicine: Pharmaceutical applications of metabolites from marine bacteria. *Antibiotics*. 2020;9: 1–30. doi:10.3390/antibiotics9080455

78. Turner RE, Rabalais NN. The Gulf of Mexico. *World Seas: an Environmental Evaluation*. Elsevier; 2019. pp. 445–464. doi:10.1016/B978-0-12-805068-2.00022-X
79. Fautin D, Dalton P, Incze LS, Leong J-AC, Pautzke C, Rosenberg A, et al. An Overview of Marine Biodiversity in United States Waters. Ropert-Coudert Y, editor. *PLoS One*. 2010;5: e11914. doi:10.1371/journal.pone.0011914
80. Ward CH, editor. *Habitats and Biota of the Gulf of Mexico: Before the Deepwater Horizon Oil Spill*. New York, NY: Springer New York; 2017. doi:10.1007/978-1-4939-3447-8
81. Montaser R, Luesch H. Marine natural products: a new wave of drugs? *Future Med Chem*. 2011;3: 1475–1489. doi:10.4155/fmc.11.118
82. Muriel-Millán LF, Rodríguez-Mejía JL, Godoy-Lozano EE, Rivera-Gómez N, Gutierrez-Rios R-M, Morales-Guzmán D, et al. Functional and Genomic Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* Strain Isolated From the Southwestern Gulf of Mexico Reveals an Enhanced Adaptation for Long-Chain Alkane Degradation. *Front Mar Sci*. 2019;6: 1–15. doi:10.3389/fmars.2019.00572
83. Godoy-Lozano EE, Escobar-Zepeda A, Raggi L, Merino E, Gutierrez-Rios RM, Juarez K, et al. Bacterial diversity and the geochemical landscape in the southwestern Gulf of Mexico. *Front Microbiol*. 2018;9: 1–15. doi:10.3389/fmicb.2018.02528
84. Moreno-ulloa A, Diaz VS, Tejeda-mora JA, Contreras MIM, Castillo FD, Guerrero A, et al. Metabolic and metagenomic profiling of hydrocarbon-degrading microorganisms obtained from the deep biosphere of the Gulf of México. 2019.
85. Escobedo-Hinojosa W, Pardo-López L. Analysis of bacterial metagenomes from the Southwestern Gulf of Mexico for pathogens detection. *Pathog Dis*. 2017;75: 1–9. doi:10.1093/femspd/ftx058
86. Girard L, Lood C, Höfte M, Vandamme P, Rokni-Zadeh H, van Noort V, et al. The ever-expanding pseudomonas genus: Description of 43 new species and partition of the pseudomonas putida group. *Microorganisms*. 2021;9: 1–24. doi:10.3390/microorganisms9081766
87. Gross H, Loper JE. Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Nat Prod Rep*. 2009;26: 1408–1446. doi:10.1039/b817075b
88. Botelho J, Grosso F, Peixe L. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* – Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resist Updat*. 2019;44: 100640. doi:10.1016/j.drug.2019.07.002
89. Kung VL, Ozer EA, Hauser AR. The Accessory Genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2010;74: 621–641. doi:10.1128/mubr.00027-10
90. Silby MW, Winstanley C, Godfrey SAC, Levy SB, Jackson RW. *Pseudomonas* genomes: Diverse and adaptable. *FEMS Microbiol Rev*. 2011;35: 652–680. doi:10.1111/j.1574-

6976.2011.00269.x

91. Diggle SP, Whiteley M. Microbe profile: *Pseudomonas aeruginosa*: Opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiol (United Kingdom)*. 2020;166: 30–33. doi:10.1099/mic.0.000860
92. Horna G, Ruiz J. Type 3 secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Res*. 2021;246: 126719. doi:10.1016/j.micres.2021.126719
93. Hauser AR. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7: 654–665. doi:10.1038/nrmicro2199
94. Barbieri JT, Sun J. *Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2004. pp. 79–92. doi:10.1007/s10254-004-0031-7
95. Belyy A, Raoux-Barbot D, Saveanu C, Namane A, Ogryzko V, Worpenberg L, et al. Actin activates *Pseudomonas aeruginosa* ExoY nucleotidyl cyclase toxin and ExoY-like effector domains from MARTX toxins. *Nat Commun*. 2016;7: 13582. doi:10.1038/ncomms13582
96. Juan C, Peña C, Oliver A. Host and Pathogen Biomarkers for Severe *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *J Infect Dis*. 2017;215: S44–S51. doi:10.1093/infdis/jiw299
97. Feltman H, Schulert G, Khan S, Jain M, Peterson L, Hauser AR. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. 2001;147: 2659–2669. doi:10.1099/00221287-147-10-2659
98. Liao C, Huang X, Wang Q, Yao D, Lu W. Virulence Factors of *Pseudomonas Aeruginosa* and Antivirulence Strategies to Combat Its Drug Resistance. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12: 1–17. doi:10.3389/fcimb.2022.926758
99. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22: 582–610. doi:10.1128/CMR.00040-09
100. Jurado-Martín I, Sainz-Mejías M, McClean S. *Pseudomonas aeruginosa*: An audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. *Int J Mol Sci*. 2021;22: 1–37. doi:10.3390/ijms22063128
101. Jabłońska J, Augustyniak A, Dubrowska K, Rakoczy R. The two faces of pyocyanin - why and how to steer its production? *World J Microbiol Biotechnol*. 2023;39: 103. doi:10.1007/s11274-023-03548-w
102. Hall S, McDermott C, Anoopkumar-Dukie S, McFarland A, Forbes A, Perkins A, et al. Cellular Effects of Pyocyanin, a Secreted Virulence Factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins (Basel)*. 2016;8: 236. doi:10.3390/toxins8080236
103. Galdino ACM, Branquinha MH, Santos ALS, Viganor L. *Pseudomonas aeruginosa* and Its Arsenal of Proteases: Weapons to Battle the Host. *Pathophysiological Aspects of*

Proteases. Singapore: Springer Singapore; 2017. pp. 381–397. doi:10.1007/978-981-10-6141-7_16

104. Soberón-Chávez G, González-Valdez A, Soto-Aceves MP, Cocotl-Yañez M. Rhamnolipids produced by *Pseudomonas*: from molecular genetics to the market. *Microb Biotechnol*. 2021;14: 136–146. doi:10.1111/1751-7915.13700
105. Abdel-Mawgoud AM, Lépine F, Déziel E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010;86: 1323–1336. doi:10.1007/s00253-010-2498-2
106. Lee AS, de Lencastre H, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-Kumar S, Peschel A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Prim*. 2018;4: 18033. doi:10.1038/nrdp.2018.33
107. Cheung GYC, Bae JS, Otto M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*. 2021;12: 547–569. doi:10.1080/21505594.2021.1878688
108. Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28: 603–661. doi:10.1128/CMR.00134-14
109. Turner NA, Sharma-Kuinkel BK, Maskarinec SA, Eichenberger EM, Shah PP, Carugati M, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nat Rev Microbiol*. 2019;17: 203–218. doi:10.1038/s41579-018-0147-4
110. Stryjewski ME, Corey GR. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: An Evolving Pathogen. *Clin Infect Dis*. 2014;58: S10–S19. doi:10.1093/cid/cit613
111. Kourtis AP, Hatfield K, Baggs J, Mu Y, See I, Epton E, et al. Vital Signs: Epidemiology and Recent Trends in Methicillin-Resistant and in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections — United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2019;68: 214–219. doi:10.15585/mmwr.mm6809e1
112. Cutuli MA, Petronio G, Vergalito F, Magnifico I, Pietrangelo L, Venditti N, et al. *Galleria mellonella* as a consolidated in vivo model hosts: New developments in antibacterial strategies and novel drug testing. *Virulence*. 2019;10: 527–541. doi:10.1080/21505594.2019.1621649
113. Tsai CJY, Loh JMS, Proft T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence*. 2016;7: 214–229. doi:10.1080/21505594.2015.1135289
114. Pereira MF, Rossi CC, Da Silva GC, Rosa JN, Bazzolli DMS. *Galleria mellonella* as an infection model: An in-depth look at why it works and practical considerations for successful application. *Pathog Dis*. 2020;78: 1–15. doi:10.1093/femspd/ftaa056
115. Romero-González LE, Rojas-Vargas J, Muriel-Millán LF, Bustos-Martínez J, Bustamante VH, Pardo-López L. Genomic and phenotypic characterization of

- Pseudomonas* sp. GOM7, a novel marine bacterial species with antimicrobial activity against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. Ziko LA, editor. PLoS One. 2023;18: e0288504. doi:10.1371/journal.pone.0288504
116. Garza-Ramos U, Barrios H, Reyna-Flores F, Tamayo-Legorreta E, Catalan-Najera JC, Morfin-Otero R, et al. Widespread of ESBL- and carbapenemase GES-type genes on carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates: a multicenter study in Mexican hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015;81: 135–137. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2014.09.029
 117. Garza-Ramos U, Tinoco P, Rojas T, Carrillo B, Barajas JM, Suarez S, et al. Molecular Characterization of Integron Class 1 (In196) Encoding the VIM-2 Metallo- β -Lactamase of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from a Hospital Environment. *J Chemother*. 2009;21: 590–591. doi:10.1179/joc.2009.21.5.590
 118. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test. 13th ed. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
 119. Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc*. 2008;3: 163–175. doi:10.1038/nprot.2007.521
 120. Akbar N, Siddiqui R, Sagathevan K, Khan NA. Gut bacteria of animals living in polluted environments exhibit broad-spectrum antibacterial activities. *Int Microbiol*. 2020;23: 511–526. doi:10.1007/s10123-020-00123-3
 121. Khan NA, Osman K, Goldsworthy GJ. Lysates of *Locusta migratoria* brain exhibit potent broad-spectrum antibacterial activity. *J Antimicrob Chemother*. 2008;62: 634–635. doi:10.1093/jac/dkn239
 122. Essar DW, Eberly L, Hadero A, Crawford IP. Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: Interchangeability of the two anthranilate synthase and evolutionary implications. *J Bacteriol*. 1990;172: 884–900. doi:10.1128/jb.172.2.884-900.1990
 123. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Ćirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*. 2007;115: 891–899. doi:10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
 124. Pailin T, Kang DH, Schmidt K, Fung DYC. Detection of extracellular bound proteinase in EPS-producing lactic acid bacteria cultures on skim milk agar. *Lett Appl Microbiol*. 2001;33: 45–49. doi:10.1046/j.1472-765X.2001.00954.x
 125. Cocotl-Yañez M, Soto-Aceves MP, González-Valdez A, Servín-González L, Soberón-Chávez G. Virulence factors regulation by the quorum-sensing and Rsm systems in the marine strain *Pseudomonas aeruginosa* ID4365, a natural mutant in *lasR*. *FEMS Microbiol Lett*. 2020;367. doi:10.1093/femsle/fnaa092

126. Loh JMS, Adenwalla N, Wiles S, Proft T. *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A streptococcus. *Virulence*. 2013;4: 419–428. doi:10.4161/viru.24930
127. Zhang Y, Miller RM. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas rhamnolipid* surfactant (biosurfactant). *Appl Environ Microbiol*. 1992;58: 3276–3282. doi:10.1128/aem.58.10.3276-3282.1992
128. Matsuyama T, Sogawa M, Yano I. Direct Colony Thin-Layer Chromatography and Rapid Characterization of *Serratia marcescens* Mutants Defective in Production of Wetting Agents. *Appl Environ Microbiol*. 1987;53: 1186–1188. doi:10.1128/aem.53.5.1186-1188.1987
129. Soto-Aceves MP, Cocotl-Yañez M, Merino E, Castillo-Juárez I, Cortés-López H, González-Pedrajo B, et al. Inactivation of the quorum-sensing transcriptional regulators LasR or RhlR does not suppress the expression of virulence factors and the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology*. 2019;165: 425–432. doi:10.1099/mic.0.000778
130. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother*. 2001;48: 5–16. doi:10.1093/jac/48.suppl_1.5
131. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 30th ed. 30th ed. CLSI supplement M100. Wayne, Pennsylvania; 2020.
132. Mensa J, Barberán J, Soriano A, Llinares P, Marco F, Cantón R, et al. Antibiotic selection in the treatment of acute invasive infections by *Pseudomonas aeruginosa*: Guidelines by the Spanish Society of Chemotherapy. *Rev Esp Quimioter*. 2018;31: 78–100. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29480677>
133. Green MR, Sambrook J. Isolating DNA from gram-negative bacteria. *Cold Spring Harb Protoc*. 2017;2017: 83–84. doi:10.1101/pdb.prot093369
134. Hall TA. BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. *Nucleic Acids Symp Ser*. 1999;41: 95–98.
135. Yoon S-H, Ha S-M, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, et al. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2017;67: 1613–1617. doi:10.1099/ijsem.0.001755
136. McGinnis S, Madden TL. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res*. 2004;32: W20–W25. doi:10.1093/nar/gkh435
137. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*. 1991;173: 697–703. doi:10.1128/JB.173.2.697-703.1991
138. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010.

Available: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

139. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30: 2114–2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170
140. Wick RR, Judd LM, Holt KE. Performance of neural network basecalling tools for Oxford Nanopore sequencing. *Genome Biol*. 2019;20: 129. doi:10.1186/s13059-019-1727-y
141. De Coster W, D’Hert S, Schultz DT, Cruts M, Van Broeckhoven C. NanoPack: visualizing and processing long-read sequencing data. Berger B, editor. *Bioinformatics*. 2018;34: 2666–2669. doi:10.1093/bioinformatics/bty149
142. Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. Phillippy AM, editor. *PLOS Comput Biol*. 2017;13: e1005595. doi:10.1371/journal.pcbi.1005595
143. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 2013;29: 1072–1075. doi:10.1093/bioinformatics/btt086
144. Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res*. 2015;25: 1043–1055. doi:10.1101/gr.186072.114
145. Brettin T, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Olsen GJ, et al. RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Sci Rep*. 2015;5: 8365. doi:10.1038/srep08365
146. Medema MH, Blin K, Cimermancic P, de Jager V, Zakrzewski P, Fischbach MA, et al. antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res*. 2011;39: W339–W346. doi:10.1093/nar/gkr466
147. Gilchrist CLM, Chooi Y-H. Clinker & clustermap.js: Automatic generation of gene cluster comparison figures. Robinson P, editor. *Bioinformatics*. 2021;37: 2473–2475. doi:10.1093/bioinformatics/btab007
148. Vesth T, Lagesen K, Acar Ö, Ussery D. CMG-Biotools, a Free Workbench for Basic Comparative Microbial Genomics. de Crécy-Lagard V, editor. *PLoS One*. 2013;8: e60120. doi:10.1371/journal.pone.0060120
149. Minkin I, Patel A, Kolmogorov M, Vyahhi N, Pham S. Sibelia: A Scalable and Comprehensive Synteny Block Generation Tool for Closely Related Microbial Genomes. 2013. pp. 215–229. doi:10.1007/978-3-642-40453-5_17
150. Krzywinski M, Schein J, Birol İ, Connors J, Gascoyne R, Horsman D, et al. Circos: An

- information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res.* 2009;19: 1639–1645. doi:10.1101/gr.092759.109
151. Chaumeil P-A, Mussig AJ, Hugenholtz P, Parks DH. GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database. Hancock J, editor. *Bioinformatics.* 2019. doi:10.1093/bioinformatics/btz848
 152. Ondov BD, Treangen TJ, Melsted P, Mallonee AB, Bergman NH, Koren S, et al. Mash: fast genome and metagenome distance estimation using MinHash. *Genome Biol.* 2016;17: 132. doi:10.1186/s13059-016-0997-x
 153. Richter M, Rosselló-Móra R, Oliver Glöckner F, Peplies J. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics.* 2016;32: 929–931. doi:10.1093/bioinformatics/btv681
 154. Meier-Kolthoff JP, Göker M. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nat Commun.* 2019;10: 2182. doi:10.1038/s41467-019-10210-3
 155. Stokes HW, Nesbø CL, Holley M, Bahl MI, Gillings MR, Boucher Y. Class 1 integrons potentially predating the association with tn402-like transposition genes are present in a sediment microbial community. *J Bacteriol.* 2006;188: 5722–5730. doi:10.1128/JB.01950-05
 156. Hassan HM, Fridovich I. Mechanism of the antibiotic action of pyocyanine. *J Bacteriol.* 1980;141: 156–163.
 157. Richter M, Rosselló-Móra R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci.* 2009;106: 19126–19131. doi:10.1073/pnas.0906412106
 158. Nouioui I, Sangal V. Advanced prokaryotic systematics: the modern face of an ancient science. *New Microbes New Infect.* 2022;49–50: 101036. doi:10.1016/j.nmni.2022.101036
 159. Hesse C, Schulz F, Bull CT, Shaffer BT, Yan Q, Shapiro N, et al. Genome-based evolutionary history of *Pseudomonas* spp. *Environ Microbiol.* 2018;20: 2142–2159. doi:10.1111/1462-2920.14130
 160. Gomila M, Peña A, Mulet M, Lalucat J, García-Valdés E. Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Front Microbiol.* 2015;6: 1–13. doi:10.3389/fmicb.2015.00214
 161. Barco RA, Garrity GM, Scott JJ, Amend JP, Nealson KH, Emerson D. A Genus Definition for Bacteria and Archaea Based on a Standard Genome Relatedness Index. Giovannoni SJ, editor. *MBio.* 2020;11. doi:10.1128/mBio.02475-19
 162. Price-Whelan A, Dietrich LEP, Newman DK. Rethinking “secondary” metabolism: Physiological roles for phenazine antibiotics. *Nat Chem Biol.* 2006;2: 71–78.

doi:10.1038/nchembio764

163. Nadal Jimenez P, Koch G, Thompson JA, Xavier KB, Cool RH, Quax WJ. The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2012;76: 46–65. doi:10.1128/membr.05007-11
164. Koumoutsi A, Chen X-H, Henne A, Liesegang H, Hitzeroth G, Franke P, et al. Structural and Functional Characterization of Gene Clusters Directing Nonribosomal Synthesis of Bioactive Cyclic Lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* Strain FZB42. *J Bacteriol.* 2004;186: 1084–1096. doi:10.1128/JB.186.4.1084-1096.2004
165. Karimi E, Geslain E, KleinJan H, Tanguy G, Legeay E, Corre E, et al. Genome Sequences of 72 Bacterial Strains Isolated from *Ectocarpus subulatus*: A Resource for Algal Microbiology. Ochman H, editor. *Genome Biol Evol.* 2020;12: 3647–3655. doi:10.1093/gbe/evz278
166. Kreutzer MF, Kage H, Nett M. Structure and Biosynthetic Assembly of Cupriachelin, a Photoreactive Siderophore from the Bioplastic Producer *Cupriavidus necator* H16. *J Am Chem Soc.* 2012;134: 5415–5422. doi:10.1021/ja300620z
167. Scholz-Schroeder BK, Soule JD, Gross DC. The *sypA*, *sypB*, and *sypC* Synthetase Genes Encode Twenty-Two Modules Involved in the Nonribosomal Peptide Synthesis of Syringopeptin by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B301D. *Mol Plant-Microbe Interact.* 2003;16: 271–280. doi:10.1094/MPMI.2003.16.4.271
168. Michelsen CF, Watrous J, Glaring MA, Kersten R, Koyama N, Dorrestein PC, et al. Nonribosomal Peptides, Key Biocontrol Components for *Pseudomonas fluorescens* In5, Isolated from a Greenlandic Suppressive Soil. Greenberg EP, editor. *MBio.* 2015;6. doi:10.1128/mBio.00079-15
169. Makky EA, AlMatar M, Mahmood MH, Ting OW, Qi WZ. Evaluation of the Antioxidant and Antimicrobial Activities of Ethyl Acetate Extract of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technol Biotechnol.* 2021;59: 127–136. doi:10.17113/ftb.59.02.21.6658
170. Veetilvalappil V V., Manuel A, Aranjani JM, Tawale R, Koteswara A. Pathogenic arsenal of *Pseudomonas aeruginosa*: an update on virulence factors. *Future Microbiol.* 2022;17: 465–481. doi:10.2217/fmb-2021-0158
171. Andrejko M, Zdybicka-Barabas A, Cytryńska M. Diverse effects of *Galleria mellonella* infection with entomopathogenic and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Invertebr Pathol.* 2014;115: 14–25. doi:10.1016/j.jip.2013.10.006
172. Wood SJ, Kuzel TM, Shafikhani SH. *Pseudomonas aeruginosa*: Infections, Animal Modeling, and Therapeutics. *Cells.* 2023;12: 199. doi:10.3390/cells12010199
173. Thi MTT, Wibowo D, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Int J Mol Sci.* 2020;21: 1–25. doi:10.3390/ijms21228671
174. Strateva T, Mitov I. Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of

- Pseudomonas aeruginosa* infections. *Ann Microbiol.* 2011;61: 717–732. doi:10.1007/s13213-011-0273-y
175. Shaver CM, Hauser AR. Relative Contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to Virulence in the Lung. *Infect Immun.* 2004;72: 6969–6977. doi:10.1128/IAI.72.12.6969-6977.2004
 176. Casilag F, Lorenz A, Krueger J, Klawonn F, Weiss S, Häussler S. The LasB Elastase of *Pseudomonas aeruginosa* Acts in Concert with Alkaline Protease AprA To Prevent Flagellin-Mediated Immune Recognition. McCormick BA, editor. *Infect Immun.* 2016;84: 162–171. doi:10.1128/IAI.00939-15
 177. Qin S, Xiao W, Zhou C, Pu Q, Deng X, Lan L, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7: 1–27. doi:10.1038/s41392-022-01056-1
 178. Zulianello L, Canard C, Köhler T, Caille D, Lacroix J-S, Meda P. Rhamnolipids Are Virulence Factors That Promote Early Infiltration of Primary Human Airway Epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.* 2006;74: 3134–3147. doi:10.1128/IAI.01772-05
 179. Maier RM, Soberón-Chávez G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2000;54: 625–633. doi:10.1007/s002530000443
 180. Bassetti M, Vena A, Croxatto A, Righi E, Guery B. How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs Context.* 2018;7: 212527. doi:10.7573/dic.212527
 181. O'Donnell, JN, Bidell, MR, Lodise TP. Approach to the Treatment of Patients with Serious Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Pharmacother J Hum Pharmacol Drug Ther.* 2020;40: 952–969. doi:10.1002/phar.2449
 182. Gillings MR, Gaze WH, Pruden A, Smalla K, Tiedje JM, Zhu YG. Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *ISME J.* 2015;9: 1269–1279. doi:10.1038/ismej.2014.226
 183. Ma L, Li A-D, Yin X-L, Zhang T. The Prevalence of Integrons as the Carrier of Antibiotic Resistance Genes in Natural and Man-Made Environments. *Environ Sci Technol.* 2017;51: 5721–5728. doi:10.1021/acs.est.6b05887
 184. Liu Y-C, Young L-S, Lin S-Y, Hameed A, Hsu Y-H, Lai W-A, et al. *Pseudomonas guguanensis* sp. nov., a gammaproteobacterium isolated from a hot spring. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013;63: 4591–4598. doi:10.1099/ijs.0.047712-0
 185. Yumoto I, Yamazaki K, Hishinuma M, Nodasaka Y, Suemori A, Nakajima K, et al. *Pseudomonas alcaliphila* sp. nov., a novel facultatively psychrophilic alkaliphile isolated from seawater. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001;51: 349–355. doi:10.1099/00207713-51-2-349

186. Delcour AH. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics*. 2009;1794: 808–816. doi:10.1016/j.bbapap.2008.11.005
187. Thirumurugan D, Vijayakumar R, Vadivalagan C, Karthika P, Alam Khan MK. Isolation, structure elucidation and antibacterial activity of methyl-4,8-dimethylundecanate from the marine actinobacterium *Streptomyces albogriseolus* ECR64. *Microb Pathog*. 2018;121: 166–172. doi:10.1016/j.micpath.2018.05.025
188. Núñez-Montero K, Lamilla C, Abanto M, Maruyama F, Jorquera MA, Santos A, et al. Antarctic *Streptomyces fildesensis* So13.3 strain as a promising source for antimicrobials discovery. *Sci Rep*. 2019;9: 1–13. doi:10.1038/s41598-019-43960-7
189. Schafhauser T, Kulik A. Isolation and Purification of Natural Products from Microbial Cultures. 2023. pp. 75–96. doi:10.1007/978-1-0716-2855-3_5
190. Saadouli I, El Euch IZ, Trabelsi E, Mosbah A, Redissi A, Ferjani R, et al. Isolation, characterization and chemical synthesis of large spectrum antimicrobial cyclic dipeptide (L-leu-l-pro) from streptomyces misionensisv16r3y1 bacteria extracts. a novel¹H NMR metabolomic approach. *Antibiotics*. 2020;9: 1–13. doi:10.3390/antibiotics9050270
191. Skariyachan S, Rao AG, Patil MR, Saikia B, Bharadwaj Kn V, Rao Gs J. Antimicrobial potential of metabolites extracted from bacterial symbionts associated with marine sponges in coastal area of Gulf of Mannar Biosphere, India. *Lett Appl Microbiol*. 2014;58: 231–241. doi:10.1111/lam.12178
192. El-Naggar NEA, El-Bindary AAA, Abdel-Mogib M, Nour NS. In vitro activity, extraction, separation and structure elucidation of antibiotic produced by *Streptomyces anulatus* NEAE-94 active against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biotechnol Biotechnol Equip*. 2017;31: 418–430. doi:10.1080/13102818.2016.1276412
193. Li Y, Rebuffat S. The manifold roles of microbial ribosomal peptide–based natural products in physiology and ecology. *J Biol Chem*. 2020;295: 34–54. doi:10.1074/jbc.REV119.006545
194. Vidal JM, Fonseca A, Ruiz P, Sepúlveda D, Carrasco C, Scilipoti S, et al. Genomic features of *Pseudomonas* sp. RGM2144 correlates with increased survival of rainbow trout infected by *Flavobacterium psychrophilum*. *J Fish Dis*. 2022. doi:10.1111/jfd.13713
195. Wackett LP. Microbial β -lactone natural products. *Microb Biotechnol*. 2017;10: 218–220. doi:10.1111/1751-7915.12600
196. Wells JS, Hunter JC, Astle GL, Sherwood JC, Ricca CM, Trejo WH, et al. Distribution of beta-lactam and beta-lactone producing bacteria in nature. *J Antibiot (Tokyo)*. 1982;35: 814–821. doi:10.7164/antibiotics.35.814

197. Robinson SL, Christenson JK, Wackett LP. Biosynthesis and chemical diversity of β -lactone natural products. *Nat Prod Rep.* 2019;36: 458–475. doi:10.1039/C8NP00052B
198. Agrawal S, Acharya D, Adholeya A, Barrow CJ, Deshmukh SK. Nonribosomal peptides from marine microbes and their antimicrobial and anticancer potential. *Front Pharmacol.* 2017;8: 1–26. doi:10.3389/fphar.2017.00828
199. Leisinger T, Margraff R. Secondary metabolites of the fluorescent pseudomonads. *Microbiol Rev.* 1979;43: 422–442. doi:10.1128/mmbr.43.3.422-442.1979
200. Isnansetyo A, Horikawa M, Kamei Y. In vitro anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* activity of 2,4-diacetylphloroglucinol produced by *Pseudomonas* sp. AMSN isolated from a marine alga. *J Antimicrob Chemother.* 2001;47: 724–725. doi:10.1093/oxfordjournals.jac.a002694
201. Needham J, Kelly MT, Ishige M, Andersen RJ. Andrimid and Moiramides A-C, Metabolites Produced in Culture by a Marine Isolate of the Bacterium *Pseudomonas fluorescens*: Structure Elucidation and Biosynthesis. *J Org Chem.* 1994;59: 2058–2063. doi:10.1021/jo00087a020
202. Faucher SP, Matthews S, Nickzad A, Vounba P, Shetty D, Bédard É, et al. Toxoflavin secreted by *Pseudomonas alcaliphila* inhibits the growth of *Legionella pneumophila* and *Vermamoeba vermiformis*. *Water Res.* 2022;216: 118328. doi:10.1016/j.watres.2022.118328
203. Patteson JB, Putz AT, Tao L, Simke WC, Bryant LH, Britt RD, et al. Biosynthesis of fluopsin C, a copper-containing antibiotic from *Pseudomonas aeruginosa*. *Science (80-)*. 2021;374: 1005–1009. doi:10.1126/science.abj6749
204. Rahman PKSM, Pasirayi G, Auger V, Ali Z. Development of a simple and low cost microbioreactor for high-throughput bioprocessing. *Biotechnol Lett.* 2009;31: 209–214. doi:10.1007/s10529-008-9853-8
205. Abdelaziz AA, Kamer AMA, Al-Monofy KB, Al-Madboly LA. *Pseudomonas aeruginosa*'s greenish-blue pigment pyocyanin: its production and biological activities. *Microb Cell Fact.* 2023;22: 110. doi:10.1186/s12934-023-02122-1
206. Ménard G, Rouillon A, Cattoir V, Donnio PY. *Galleria mellonella* as a Suitable Model of Bacterial Infection: Past, Present and Future. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11: 1–18. doi:10.3389/fcimb.2021.782733
207. Beeton ML, Alves DR, Enright MC, Jenkins ATA. Assessing phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* using a *Galleria mellonella* infection model. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;46: 196–200. doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.04.005
208. Andrejko M, Zdybicka-Barabas A, Wawrzoszek M, Cytryńska M. Diverse Susceptibility of *Galleria mellonella* Humoral Immune Response Factors to the Exoproteinase Activity of Entomopathogenic and Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa*.

Zoolog Sci. 2013;30: 345–351. doi:10.2108/zsj.30.345

209. Kaszab E, Radó J, Kriszt B, Pászti J, Lesinszki V, Szabó A, et al. Groundwater, soil and compost, as possible sources of virulent and antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Environ Health Res.* 2021;31: 848–860. doi:10.1080/09603123.2019.1691719
210. Ciofu O, Moser C, Jensen PØ, Høiby N. Tolerance and resistance of microbial biofilms. *Nat Rev Microbiol.* 2022;20: 621–635. doi:10.1038/s41579-022-00682-4
211. Ghafoor A, Hay ID, Rehm BHA. Role of Exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation and Architecture. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77: 5238–5246. doi:10.1128/AEM.00637-11
212. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2: 95–108. doi:10.1038/nrmicro821
213. Qian P-Y, Cheng A, Wang R, Zhang R. Marine biofilms: diversity, interactions and biofouling. *Nat Rev Microbiol.* 2022;20: 671–684. doi:10.1038/s41579-022-00744-7
214. Gholami S, Tabatabaei M, Sohrabi N. Comparison of biofilm formation and antibiotic resistance pattern of *Pseudomonas aeruginosa* in human and environmental isolates. *Microb Pathog.* 2017;109: 94–98. doi:10.1016/j.micpath.2017.05.004
215. Mahto KU, Das S. Microscopic techniques to evaluate the biofilm formation ability of a marine bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PFL-P1 on different substrata. *Microsc Res Tech.* 2021;84: 2451–2461. doi:10.1002/jemt.23799
216. Park M-H, Kim SY, Roh EY, Lee HS. Difference of Type 3 secretion system (T3SS) effector gene genotypes (*exoU* and *exoS*) and its implication to antibiotic resistances in isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from chronic otitis media. *Auris Nasus Larynx.* 2017;44: 258–265. doi:10.1016/j.anl.2016.07.005
217. Agnello M, Wong-Beringer A. Differentiation in Quinolone Resistance by Virulence Genotype in *Pseudomonas aeruginosa*. Cascales E, editor. *PLoS One.* 2012;7: e42973. doi:10.1371/journal.pone.0042973
218. Subedi D, Vijay AK, Kohli GS, Rice SA, Willcox M. Association between possession of *ExoU* and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Omri A, editor. *PLoS One.* 2018;13: e0204936. doi:10.1371/journal.pone.0204936
219. Hu Y, Huang H, Cheng X, Shu X, White AP, Stavriniades J, et al. A global survey of bacterial type III secretion systems and their effectors. *Environ Microbiol.* 2017;19: 3879–3895. doi:10.1111/1462-2920.13755
220. Bel Hadj Ahmed A, Salah Abbassi M, Rojo-Bezares B, Ruiz-Roldán L, Dhahri R, Mehri I, et al. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from various environmental niches: New STs and occurrence of antibiotic susceptible “high-risk

clones." Int J Environ Health Res. 2020;30: 643–652. doi:10.1080/09603123.2019.1616080

221. Ruiz-Roldán L, Rojo-Bezares B, de Toro M, López M, Toledano P, Lozano C, et al. Antimicrobial resistance and virulence of *Pseudomonas* spp. among healthy animals: concern about exolysin ExlA detection. *Sci Rep.* 2020;10: 11667. doi:10.1038/s41598-020-68575-1
222. Mavrodi D V, Bonsall RF, Delaney SM, Soule MJ, Phillips G, Thomashow LS. Functional Analysis of Genes for Biosynthesis of Pyocyanin and Phenazine-1-Carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Downloaded from <http://jb.asm.org/> on September 19 , 2015 by SREE CHITRA TIRUNAL INST FOR. *J Bacteriol.* 2001;183: 6454–6465. doi:10.1128/JB.183.21.6454
223. Everett MJ, Davies DT. *Pseudomonas aeruginosa* elastase (LasB) as a therapeutic target. *Drug Discov Today.* 2021;26: 2108–2123. doi:10.1016/j.drudis.2021.02.026
224. Cheng T, Liang J, He J, Hu X, Ge Z, Liu J. A novel rhamnolipid-producing *Pseudomonas aeruginosa* ZS1 isolate derived from petroleum sludge suitable for bioremediation. *AMB Express.* 2017;7: 120. doi:10.1186/s13568-017-0418-x
225. Chakraborty J, Das S. Characterization of the metabolic pathway and catabolic gene expression in biphenyl degrading marine bacterium *Pseudomonas aeruginosa* JP-11. *Chemosphere.* 2016;144: 1706–1714. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.10.059
226. Du J, Zhang A, Zhang X, Si X, Cao J. Comparative analysis of rhamnolipid congener synthesis in neotype *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 and two marine isolates. *Bioresour Technol.* 2019;286: 121380. doi:10.1016/j.biortech.2019.121380
227. Laabei M, Jamieson WD, Lewis SE, Diggle SP, Jenkins ATA. A new assay for rhamnolipid detection—important virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014;98: 7199–7209. doi:10.1007/s00253-014-5904-3
228. Gonçalves T, Vasconcelos U. Colour Me Blue: The History and the Biotechnological Potential of Pyocyanin. *Molecules.* 2021;26: 927. doi:10.3390/molecules26040927
229. Ramsay KA, Wardell SJT, Patrick WM, Brockway B, Reid DW, Winstanley C, et al. Genomic and phenotypic comparison of environmental and patient-derived isolates of *Pseudomonas aeruginosa* suggest that antimicrobial resistance is rare within the environment. *J Med Microbiol.* 2019;68: 1591–1595. doi:10.1099/JMM.0.001085
230. Kim S, Masai S, Murakami K, Azuma M, Kataoka K, Sebe M, et al. Characteristics of Antibiotic Resistance and Tolerance of Environmentally Endemic *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics.* 2022;11: 1120. doi:10.3390/antibiotics11081120
231. Alcalde-Rico M, Hernando-Amado S, Blanco P, Martínez JL. Multidrug Efflux Pumps at the Crossroad between Antibiotic Resistance and Bacterial Virulence. *Front Microbiol.* 2016;7. doi:10.3389/fmicb.2016.01483

232. Alonso A, Rojo F, Martinez JL. Environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* show pathogenic and biodegradative properties irrespective of their origin. *Environ Microbiol.* 1999;1: 421–430. doi:10.1046/j.1462-2920.1999.00052.x
233. Olga P, Apostolos V, Alexis G, George V, Athena M. Antibiotic resistance profiles of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from various Greek aquatic environments. Simonet P, editor. *FEMS Microbiol Ecol.* 2016;92: fiw042. doi:10.1093/femsec/fiw042
234. Toth M, Smith C, Frase H, Mobashery S, Vakulenko S. An antibiotic-resistance enzyme from a deep-sea bacterium. *J Am Chem Soc.* 2010;132: 816–823. doi:10.1021/ja908850p
235. Brown MG, Balkwill DL. Antibiotic resistance in bacteria isolated from the deep terrestrial subsurface. *Microb Ecol.* 2009;57: 484–493. doi:10.1007/s00248-008-9431-6
236. Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev.* 2009;33: 757–784. doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00175.x
237. Gillings MR. Integrons: Past, Present, and Future. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2014;78: 257–277. doi:10.1128/MMBR.00056-13
238. Gaze WH, Zhang L, Abdousslam NA, Hawkey PM, Calvo-Bado L, Royle J, et al. Impacts of anthropogenic activity on the ecology of class 1 integrons and integron-associated genes in the environment. *ISME J.* 2011;5: 1253–1261. doi:10.1038/ismej.2011.15
239. Lucassen R, Rehberg L, Heyden M, Bockmühl D. Strong correlation of total phenotypic resistance of samples from household environments and the prevalence of class 1 integrons suggests for the use of the relative prevalence of *intl1* as a screening tool for multi-resistance. Singer AC, editor. *PLoS One.* 2019;14: e0218277. doi:10.1371/journal.pone.0218277
240. Suzuki S, Pruden A, Virta M, Zhang T. Editorial: Antibiotic Resistance in Aquatic Systems. *Front Microbiol.* 2017;8. doi:10.3389/fmicb.2017.00014
241. Nardelli M, Scalzo PM, Ramírez MS, Quiroga MP, Cassini MH, Centrón D. Class 1 Integrons in Environments with Different Degrees of Urbanization. Hozbor DF, editor. *PLoS One.* 2012;7: e39223. doi:10.1371/journal.pone.0039223
242. Corno G, Ghaly T, Sabatino R, Eckert EM, Galafassi S, Gillings MR, et al. Class 1 integron and related antimicrobial resistance gene dynamics along a complex freshwater system affected by different anthropogenic pressures. *Environ Pollut.* 2023;316: 120601. doi:10.1016/j.envpol.2022.120601
243. Ruiz-Martínez L, López-Jiménez L, Fusté E, Vinuesa T, Martínez JP, Viñas M. Class 1 integrons in environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents.* 2011;38: 398–402. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.06.016

10. ANEXOS

ARTÍCULOS PUBLICADOS DURANTE EL DOCTORADO

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

Genomic and phenotypic characterization of *Pseudomonas* sp. GOM7, a novel marine bacterial species with antimicrobial activity against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*

Luis E. Romero-González¹✉, Jorge Rojas-Vargas¹✉, Luis F. Muriel-Millán¹, Jaime Bustos-Martínez², Víctor H. Bustamante^{1*}, Liliana Pardo-López^{1*}

1 Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México, **2** Departamento de Atención a la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, CDMX, México

✉ These authors contributed equally to this work.

* victor.bustamante@ibt.unam.mx (VHB); liliana.pardo@ibt.unam.mx (LPL)



OPEN ACCESS

Citation: Romero-González LE, Rojas-Vargas J, Muriel-Millán LF, Bustos-Martínez J, Bustamante VH, Pardo-López L (2023) Genomic and phenotypic characterization of *Pseudomonas* sp. GOM7, a novel marine bacterial species with antimicrobial activity against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. PLoS ONE 18(7): e0288504. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288504>

Editor: Laila Adel Ziko, University of Hertfordshire hosted by Global Academic Foundation, EGYPT

Received: April 10, 2023

Accepted: June 27, 2023

Published: July 13, 2023

Copyright: © 2023 Romero-González et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its [Supporting Information files](#).

Funding: This work was supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) / México (PN 2017-01-5182) to V.H.B and from CONACYT–Mexican Ministry of Energy-Hydrocarbon Trust, project 201441 to L.P.-L. L.E.

Abstract

Antimicrobial resistance (AMR) represents a serious threat to global health. The development of new drugs to combat infections caused by bacteria resistant to multiple or even all available antibiotics is urgent. Most antibiotics used up to date have been identified from soil microorganisms. The marine environment represents an alternative source with great potential for the identification of microorganisms that produce bioactive molecules, including antibiotics. In this study, we analyzed the antibacterial activity of a collection of 82 bacterial strains isolated from marine water and sediment samples collected from the Southwestern Gulf of Mexico. Eight of the marine isolates inhibited the growth of different pathogenic bacteria, seven of which were identified as presumptive *Pseudomonas aeruginosa*. Interestingly, genome sequencing and phylogenetic analysis revealed that the remaining marine isolate showing antibacterial activity is a novel *Pseudomonas* species that we denominated *Pseudomonas* sp. GOM7, which was not pathogenic in the *Galleria mellonella* infection model in the conditions tested. Notably, *Pseudomonas* sp. GOM7 inhibited the growth of multidrug and methicillin-resistant strains of the priority pathogen *Staphylococcus aureus*. Our results show that the anti-*S. aureus* compound(s) produced by *Pseudomonas* sp. GOM7 can be extracted from the culture supernatant of this bacterium with the organic solvent ethyl acetate. Annotation of the *Pseudomonas* sp. GOM7 genome revealed the presence of several biosynthetic gene clusters predicted to code for possible antimicrobial compounds. Our results further highlight the potential of bacteria from the Gulf of Mexico as a source of novel antimicrobials.

R.-G. and J.R.-V. are doctoral students enrolled in the Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and received predoctoral fellowships from CONACYT (818121 and 965003, respectively). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Currently, antimicrobial resistance (AMR) represents a serious threat to global health. The presence of bacteria resistant to several or even all commercial antibiotics makes treating infectious diseases very challenging and increases mortality and hospitalization expenses [1]. The crisis by AMR has been attributed to numerous factors, including the widespread use of antibiotics in humans, farm animals, and agriculture, as well as incorrect antibiotic prescription practices and a decline in the discovery of novel drugs [2]. Additionally, an increase in the proliferation of antibiotic-resistant bacteria is anticipated as a result of the high consumption of antibiotics, disinfectants, and biocide agents during the COVID-19 pandemic [3, 4]. In 2017, the World Health Organization (WHO) published a list of 12 bacteria denominated as priority pathogens, which present resistance to the antibiotics commonly used to combat their infections; thus, it is urgent to develop new drugs against these pathogenic bacteria. One of these priority pathogens is the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), which also presents resistance to multiple other antibiotics [5]. MRSA is a prevalent cause of hospital-acquired infections, including pneumonia, bacteremia, and skin infections, and it is associated with high morbidity and mortality [6]. For instance, Centers for Disease Control and Prevention (CDC) assessments estimated 119 000 infections and 20 000 deaths from invasive MRSA infections in 2017 in the US. The burden of MRSA has increased over the years, resulting in a substantial healthcare cost estimated at US\$ 450 million in the last decade. Furthermore, *S. aureus* is the most common cause of coinfection in patients with COVID-19, and MRSA ratios have increased during the pandemic [7, 8].

Most antibiotics are produced by microorganisms; approximately 80 antibacterial drugs that were licensed between 1981 and 2014 are either natural compounds or directly derived from primary or secondary metabolites produced by microorganisms [9, 10]. Soil microbes have been the main source of antibiotics; however, further attempts to identify new antibiotics from this source have largely rediscovered known compounds [11]. Searching for new antibacterial compounds is now being directed to microorganisms present in poorly explored sources, such as animals, plants, caves, and bodies of water [12]. In particular, the oceans, covering over 70% of the Earth's surface and containing a high diversity of microorganisms, represent a promising source of bioactive compounds. Marine bacteria are exposed to variations in environmental conditions, such as temperature, pressure, light, and salinity, which favor the production of unique compounds [13]. Molecules produced by marine bacteria include alkaloids, steroids, terpenoids, peptides, and polyketides [14]. The Gulf of Mexico (GoM) is the ninth largest body of water in the world, bordered by the USA on the northern and eastern sides, by Mexico on the western and southern sides, and by Cuba on the southeast side; it covers a surface area of more than 1.5 million km². Recent studies have shown the diversity of bacterial communities from the GoM and their role in different biogeochemical cycles [15]. A bacterial genus found abundantly in the GoM is *Pseudomonas* [16]. *Pseudomonas* species are present in different environments such as water, soil, animals, and plants [17]. Furthermore, *Pseudomonas* species show a high genomic plasticity that results in extraordinary metabolic versatility, producing a plethora of bioactive secondary metabolites, including phenazine derivatives like pyocyanin [18, 19].

In this study, we explored a collection of marine bacterial isolates as a source of possible new antibiotics. We identified a novel species of *Pseudomonas*, *Pseudomonas* sp. GOM7, which shows growth inhibitory activity against multidrug resistant (MDR) *S. aureus* strains, including the priority pathogen MRSA.

Materials and methods

Bacterial strains and growth conditions

The eighty-two marine bacteria tested were previously isolated from sediments and seawater samples from the GoM [20]. *Pseudomonas* sp. GOM7 was obtained from a seawater sample collected at a depth of 55 m (25° 38.199' N; 95° 1.283' W) [15, 20]. The nonmarine bacterial strains used in this study are described in S1 Table. *S. aureus* isolates were obtained from healthy young adults (18–21 years old) in the period from 2019 to 2021. Samples were taken from nasal or pharyngeal exudates and phenotypically identified using an API® Staph system (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France). Reference strains tested in this study were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA). All bacterial strains were cultivated in lysogeny broth (LB) or Mueller-Hinton (M-H) broth at 37°C or 30°C.

Ethics statement

Sampling protocol for *S. aureus* isolation was approved by the Ethics Committee of the Biological Sciences and Health Division of the UAM-Xochimilco (Document: DCBS.CD.056.18). All participants provided their written informed consent to participate as volunteers. No incentives were offered.

Antibiotic susceptibility

The antibiotic susceptibility of *S. aureus* isolates was determined by the Kirby-Bauer disk diffusion method according to CLSI recommendations [21]. The antibiotics tested were ciprofloxacin (CIP), fosfomicin (FOS), trimethoprim/sulfamethoxazole (TRS), penicillin (P), vancomycin (VAN), tetracycline (TET), erythromycin (ERY), clindamycin (CLI), gentamicin (GEN), and cefalotin (CEF). Methicillin resistance was evaluated by obtaining the minimal inhibitory concentration (MIC) for oxacillin (OXA) using the previously described microdilution assay [22]. Antibiotics were purchased from Sigma-Aldrich. The antibiotic susceptibility profiles found for the *S. aureus* isolates are indicated in S2 Table.

Organic extraction of the culture supernatant

Organic crude extracts from the supernatant of bacterial cultures were obtained by extraction with solvents of different polarities (*n*-hexane, chloroform, and ethyl acetate). Culture supernatants were obtained by growing *Pseudomonas* sp. GOM7 or *E. coli* DH10β in 200 ml of diluted (1:4) LB for 48 h at 30°C with aeration. Cells were removed by centrifugation at 8,586 g for 30 min at 4°C. Then, 100 ml of the supernatant was extracted with the respective solvent in a 5:1 ratio. The mixture (supernatant and solvent) was shaken vigorously for 10 min and allowed to stand for 5–10 min. The organic layer was collected, and the extraction was repeated two more times with the addition of fresh solvent. The organic phase was dried at room temperature in a fume hood and the powder obtained was stored until use. The organic extracts were solubilized in a sterile 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) solution to a final concentration of 0.6 g ml⁻¹.

Antibacterial activity assays

The growth inhibitory effect on bacteria was assessed by the colony method. Indicator strains (assessed for growth inhibition) were grown in LB at 37°C up to an optical density at 600 nm of 0.6 ($\approx 1 \times 10^8$ CFU ml⁻¹). LB agar plates were inoculated with 5 ml of each indicator strain culture. After 5 min, the cultures were removed and the plates were dried under sterile conditions. Producer bacteria (assessed for production of antibacterial activity) were grown

overnight in LB at 37°C. Then, 3 ml of these cultures were concentrated by centrifugation and resuspended in 50 µl of sterile LB. A 10 µl drop of the producer bacteria suspensions was placed at equidistant points in the previously inoculated LB agar plates. The plates were incubated for 24 h at 37°C. The *E. coli* DH10β strain was tested as a negative control of producer bacteria.

Antibacterial activity of bacterial culture supernatants was assessed as follows. Culture supernatants from *Pseudomonas* sp. GOM7 or *E. coli* DH10β were obtained as described above; then, the supernatant was lyophilized in a Labconco™ FreeZone™ 2.5 Benchtop Freeze Dry System. The obtained powder was rehydrated with 5 ml of sterile Milli-Q water; it was thus concentrated 40 times. The antibacterial activity of the supernatants was determined by an agar-well assay [23] on M-H agar plates, which were inoculated with indicator bacteria as described before. The top part of a 1 ml sterile micropipette tip was used to create wells in the inoculated agar plates. Then, 100 µl of the resuspended lyophilized supernatant was loaded in each well, and the plates were incubated for 24 h at 30°C. The presence of an inhibition halo was considered positive for antibacterial activity in these assays.

Bacterial viability in organic extracts was assessed by following previously described methods to evaluate antibacterial activity of conditioned media, with some modifications [24, 25]. *S. aureus* ATCC 43300 was grown in LB up to an optical density at 600 nm of 0.6 ($\approx 1 \times 10^8$ CFU ml⁻¹); then, 10 µl of this culture were inoculated into 1 ml of the solubilized organic extract and the samples were incubated at 37°C for 5 h. Colony forming units (CFUs) were quantified at 0, 30, 60, 120, 180, and 300 min post-inoculation by plating on LB agar plates. Organic extracts from *E. coli* DH10β strain and growth in LB medium were used as negative control in these assays.

Biofilm formation

Biofilm formation was evaluated by the crystal violet assay in 96-well polystyrene microtiter plates (Costar®, Corning Incorporated) as previously described [26]. Bacterial strains were grown in LB for 24 h at 37°C. Absorbance lectures at 570 nm were determined in a microtiter plate reader (BioTek™ Epoch2™, San Diego, CA, USA).

Pyocyanin production

Observation of pyocyanin production was performed by growing the bacterial strains on cetrimide agar; bacteria that form green or blue colonies are considered to produce pyocyanin. Quantification of pyocyanin from the supernatant of bacterial cultures grown in LB was determined as previously reported [27]. Concentration was calculated by multiplying absorbance with the specific molar extinction coefficient of the pyocyanin.

Protease assay

Protease activity was detected as clearing zones on skim-milk agar plates [28].

Pathogenicity assays

Pathogenicity was analyzed using the *Galleria mellonella* (wax moth) infection model as described previously [29]. Groups of ten *G. mellonella* larvae were inoculated through the lower left proleg with 10 µl of a bacterial suspension in 1X PBS containing 0.5×10^3 – 1×10^6 CFU ml⁻¹, using an insulin syringe. Infected larvae were incubated at 30°C without food and inspected at 4, 7, 20, 25, 31, 44, 68, 98, and 116 h post-injection to record mortality.

Purification and sequencing of DNA

Genomic DNA was purified using the Quick-gDNA miniprep kit from Zymo Research (Irvine, CA, United States) according to the manufacturer's instructions from overnight bacterial cultures in LB at 37°C. For sequencing of the 16S rRNA gene, PCRs were performed using the purified genomic DNA, the universal primers fD1 and rP2 [30], and the GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega). Amplification products were purified with the DNA Clean & Concentrator kit from Zymo Research (Irvine, CA, United States) and subsequently sequenced using the Sanger method at the DNA Synthesis and Sequencing Unit at the Institute of Biotechnology (IBT) / UNAM. Sequences were cleaned using Chromas v.2.6.6 (<http://technelysium.com.au/wp/chromas/>), assembled by CAP in BioEdit v7.1 [31], and annotated based on a BLASTN search of the NCBI database 16S ribosomal RNA sequences for Bacteria and Archaea [32]. For sequencing the *Pseudomonas* GOM7 genome, a combination of the platforms Illumina MiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) and Oxford Nanopore Technologies MinION were used at the Massive Sequencing Unit of the IBT / UNAM. Illumina sequencing was performed using the Nextera library kit (Illumina, Inc.), and DNA was cut to generate fragments of an average size of 500 bp. A 600-cycle sequencing kit was used to obtain 556,352 paired-end reads with a length of 300 bp. The read quality was examined using FastQC v0.11.9 [33] and raw sequences were filtered with a quality \geq Q20 using Trimmomatic v0.39 [34]. For Nanopore sequencing, libraries were prepared with the SQK-LSK109 kit and multiplexed using the EXP-NBD104 barcoding kit. The libraries were loaded into the R9.4.1 flow cell. Reads were base called and demultiplexed using Guppy v4.4.1 [35], adapters were trimmed, and barcode separation was performed by Porechop v0.2.4 (<https://github.com/rrwick/Porechop>). The read quality was examined with NanoPlot v1.30.1 [36].

Genome assembly and annotation

Genome *de novo* assembly was performed with Unicycler assembler v0.4.8 [37] using the default parameters. The quality analysis of the assembly was performed with QUAST v4.0 [38] and the completeness and contamination were evaluated with CheckM v1.1.3 [39]. The complete *Pseudomonas* sp. GOM7 genome was uploaded to the BV-BRC web server (<https://www.bv-brc.org/>) for gene prediction and functional annotation with the RASTtk pipeline [40]. The genome was also surveyed for secondary metabolite biosynthetic gene clusters using the antiSMASH online tool v6.1.1 [41], and comparison between genes was performed with the Cliniker program [42].

Taxonomic identification and phylogeny

To identify the closest genomes, the *Pseudomonas* sp. GOM7 genome was analyzed by GTDB-Tk v2.0.0 [43] using the GTDB R207 reference database with 317,542 genomes (April 9, 2022) and the `de_novo_wf` command. The closest GTDBtk genomes were retrieved from the NCBI database (consulted on March 13, 2023), and different phylogenomic criteria for delimiting species were calculated: the genome distance estimation (Mash-D < 0.05) by the Mash program [44], the average nucleotide identity based on MUMmer (ANIm > 95%) by JSpeciesWS [45], the average amino acid identity (AAI > 96%) values with the CompareM tool (<https://github.com/dparks1134/CompareM>), the digital DNA-DNA hybridization (dDDH > 70%) formula d4 and the G+C content percentage difference (< 1%), both by TYGS [46]. The outgroup genome was that of the *Azotobacter vinelandii* strain DSM 279 assembly (GCA_900119555.1), downloaded from the NCBI website (consulted on March 13, 2023).

Comparative genome and genome synteny analyses

For comparative genomic analysis, the *Pseudomonas* sp. GOM7 genome and its closest *Pseudomonas* genomes derived from the phylogenomic criteria analysis were tested. The number of gene families shared by the genomes was obtained using the CMG BioTools software v2.2 [47]. For genome synteny analyses, Sibelia software v3.0.7 [48] was used with a minimum block size of 20,000 bp, and the alignment of syntenic blocks was visualized in Circos [49].

Statistical analysis

Data are presented as the mean \pm standard deviation. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 8.0.1 software for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). One-way ANOVA, combined with Dunnett's multiple comparison test, or the log-rank test, were used as indicated. *P* values of <0.05 were considered statistically significant.

Results

Identification of *Pseudomonas* marine isolates with antibacterial activity

In a previous study we isolated a collection of bacteria from the GoM, which was tested for hydrocarbon degradation capacity [20]. Here, we analyzed this collection of marine bacteria as a source of possible antibiotics. A total of 82 bacterial isolates from the GoM were tested for growth inhibitory activity against the reference strains *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978, *Salmonella enterica* serotype Typhimurium (S. Typhimurium) SL1344, *S. aureus* ATCC 29213, and *Escherichia coli* ATCC 25922 by the colony method. 74 isolates, including different genera such as *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, and *Chryseobacterium* did not show antibacterial activity. In contrast, seven isolates generated inhibition halos on all tested bacteria; six of these isolates were identified as *P. aeruginosa* by sequencing of the 16S rRNA gene (S3 Table), and the other one was previously identified as *P. aeruginosa* GOM1 by genome sequencing [20]. Consistently, these seven isolates were shown to produce the phenazine pigment pyocyanin (S4 Table), a trait of *P. aeruginosa* [50]. Because *P. aeruginosa* strains are recognized to present antibacterial activity by the production of pyocyanin and bacteriocins [51, 52], the referred isolates were not further analyzed. One other marine isolate, GOM7, generated inhibition halos mostly on *S. aureus* strains (Table 1). The best match to the 16S rRNA gene of the GOM7 isolate was the *P. sihuiensis* strain WM-2 (S3 Table). However, the genomic analysis described below indicated that the GOM7 isolate is actually a new *Pseudomonas* species, which we denominated *Pseudomonas* sp. GOM7. As expected, the production of pyocyanin was not detected in *Pseudomonas* sp. GOM7 (S1 Fig). These results revealed to *Pseudomonas* sp. GOM7 as an interesting subject for further analysis.

Pseudomonas sp. GOM7 shows inhibitory activity against *S. aureus* strains resistant to antibiotics

Antibacterial activity of *Pseudomonas* sp. GOM7 was further analyzed against different bacteria including antibiotic-resistant strains of *S. aureus*. Of note, both the colonies and the culture supernatant (concentrated by lyophilization) of *Pseudomonas* sp. GOM7 generated inhibition halos on all the antibiotic-resistant strains of *S. aureus* tested (Table 1). In contrast, only the colony of *Pseudomonas* sp. GOM7 generated inhibition halos on *Bacillus subtilis* 168, *S. Typhimurium* SL1344, and *E. coli* ATCC 25922, and neither the bacterial colony nor the culture supernatant generated inhibition halos on *E. faecium* ATCC 19434, *K. quasipneumoniae* ATCC 700603, and *A. baumannii* ATCC 17978 (Table 1). As expected, neither the bacterial colony nor the culture supernatant of the *E. coli* DH10 β strain, used as a negative control,

Table 1. Antibacterial activity spectrum of *Pseudomonas* sp. GOM7.

| Strain tested | <i>Pseudomonas</i> sp. GOM7 ^a | | |
|---|--|-------------|-----------------------|
| | Colony | Supernatant | Ethyl acetate extract |
| Gram-positive | | | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 | + | + | + |
| <i>S. aureus</i> ATCC 43300 (MRSA) | + | + | + |
| <i>S. aureus</i> 8N2 (MRSA) | + | + | + |
| <i>S. aureus</i> 4N34 (MRSA) | + | + | + |
| <i>S. aureus</i> 14F4A (MRSA) | + | + | + |
| <i>S. aureus</i> 25F4 (MRSA) | + | + | + |
| <i>S. aureus</i> 15N4 (MRSA) | + | + | + |
| <i>S. aureus</i> 1N3 (MRSA) | + | + | n.d. |
| <i>S. aureus</i> 13F3 (MRSA) | + | + | n.d. |
| <i>S. aureus</i> 21F3 (MRSA) | + | + | + |
| <i>S. aureus</i> 6N3 (MDR) | + | + | + |
| <i>S. aureus</i> 18F1 (MDR) | + | + | + |
| <i>S. aureus</i> 24N2 (MDR) | + | + | + |
| <i>S. aureus</i> 25F2 (MDR) | + | + | n.d. |
| <i>S. aureus</i> 17F3 (MDR) | + | + | + |
| <i>S. aureus</i> 17N3 (MDR) | + | + | + |
| <i>B. subtilis</i> 168 | + | - | n.d. |
| <i>Enterococcus faecium</i> ATCC 19434 | - | - | n.d. |
| Gram-negative | | | |
| <i>E. coli</i> ATCC 25922 | + | - | n.d. |
| <i>S. Typhimurium</i> SL1344 | + | - | n.d. |
| <i>Klebsiella quasipneumoniae</i> ATCC 700603 | - | - | n.d. |
| <i>A. baumannii</i> ATCC 17978 | - | - | n.d. |

^aAntibacterial activity was observed by the formation (+) or not (-) of an inhibition halo on the strain tested; n.d. not determined. The *E. coli* DH10 β strain, used as a negative control, did not exhibit antibacterial activity neither by colony nor by the supernatant or ethyl acetate extract. LB and M-H agar plates were used to analyze the effect of the colonies or culture supernatants and ethyl acetate extract respectively, which were incubated for 24 h at 37°C for colony assays or 30°C for supernatant and ethyl acetate extract analysis. Assays were performed in triplicate.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288504.t001>

formed inhibition halos on the bacteria tested (Table 1). Representative images for the formation or not of inhibition halos by the *Pseudomonas* sp. GOM7 and *E. coli* DH10 β strains are shown in Fig 1. These results support that *Pseudomonas* sp. GOM7 produces one or more compounds with antibacterial activity.

To gain insight on the solubility of the compounds with antibacterial activity produced by *Pseudomonas* sp. GOM7, we tested crude extracts from the culture supernatant of this bacterium obtained with different organic solvents: As negative controls, crude extracts from the culture supernatant of *E. coli* DH10 β obtained with the same solvents were also assessed in these assays. Only the ethyl acetate extract from *Pseudomonas* sp. GOM7 formed inhibition halos on *S. aureus*, including MRSA strains (Table 1). Additionally, we analyzed the survival of the *S. aureus* ATCC 43300 strain (MRSA) when exposed through time to ethyl acetate, *n*-hexane or chloroform extracts from *Pseudomonas* sp. GOM7 or *E. coli* DH10 β . Notably, the ethyl acetate extract from *Pseudomonas* sp. GOM7 reduced ~60% the survival of *S. aureus* after 5 h of exposition; in contrast, bacteria replicated in the *n*-hexane and chloroform extracts (Fig 2A). As expected, no inhibitory effect was observed with the solvent extracts from *E. coli* DH10 β (Fig 2B).

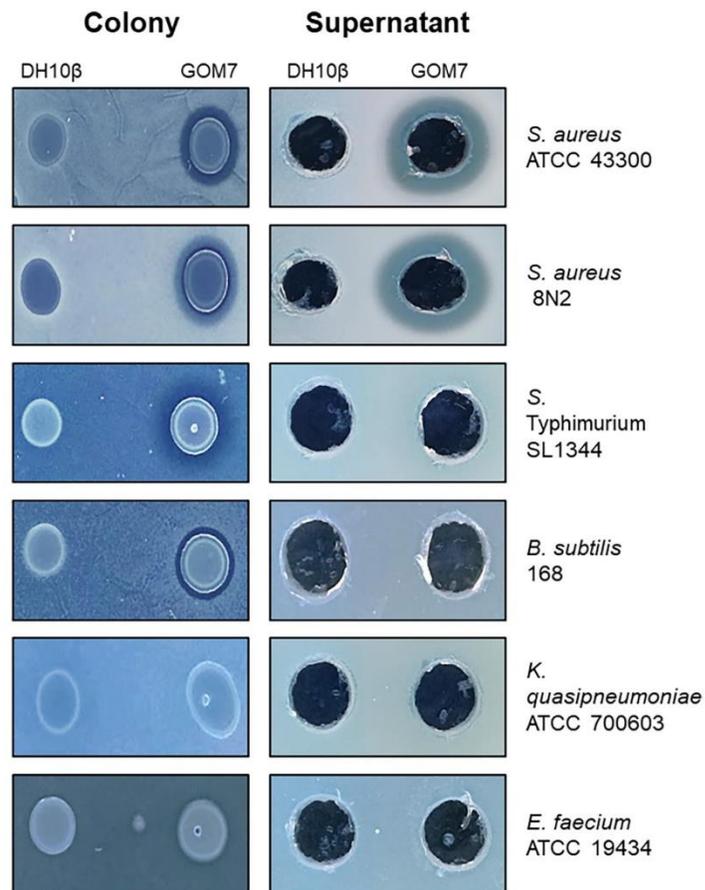


Fig 1. Inhibition halos formed by *Pseudomonas* sp. GOM7. Colonies or the culture supernatant of *Pseudomonas* sp. GOM7 were tested for formation of inhibition halos on different bacteria. The *E. coli* DH10 β strain was used as a negative control. Images are representative of the results shown in Table 1.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288504.g001>

Collectively, these results indicate that *Pseudomonas* sp. GOM7 secretes one or more compounds that affect the viability of MDR *S. aureus* and importantly the priority pathogen MRSA.

Sequencing, assembly, and annotation of the *Pseudomonas* sp. GOM7 genome

To determine the genetic characteristics of *Pseudomonas* sp. GOM7, we sequenced its whole genome using a hybrid approach with Illumina MiSeq and Nanopore MinION platforms.

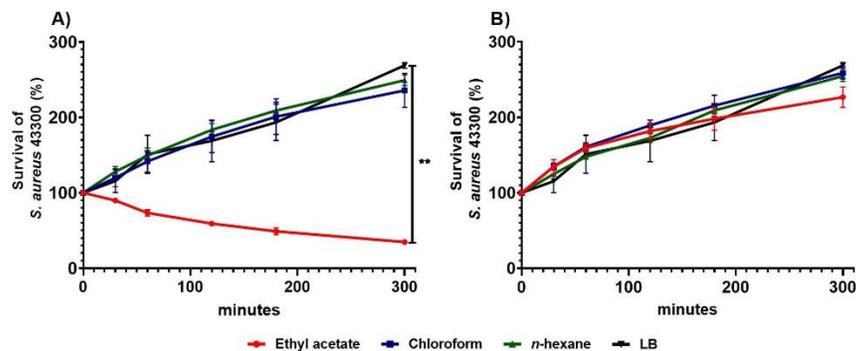


Fig 2. Ethyl acetate crude extract from *Pseudomonas* sp. GOM7 reduces the survival of MRSA. Approximately 1×10^6 CFUs of *S. aureus* ATCC 43300 were inoculated into LB (black) (positive control of viability and growth), or into *n*-hexane (green), chloroform (blue), or ethyl acetate (red) extracts obtained from the culture supernatant of *Pseudomonas* sp. GOM7 (A) or *E. coli* DH10β (B). At the indicated times, CFUs were counted on LB agar plates and then bacterial survival percentage values were calculated and graphed. *P* value was calculated using One-way ANOVA combined with Dunnett's multiple comparison test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Data are expressed as the mean \pm S.D. of three independent experiments.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288504.g002>

Illumina sequencing resulted in 556,352 paired-end reads with a median length of 300 bp and a median sequence quality (Phred score) of 36. The MinION device generated 39,185 reads with a mean length of 15,917 nucleotides (nt), a maximum read length of 133,102 nt, an N50 value of 23,048 nt, and a mean read quality of 13. For the assembly, completeness of 100% and contamination of 0.40% were obtained. The complete circular chromosome contains 5,424,934 bp in 1 contig and has a G+C content of 63.35% (Fig 3). A total of 4,774 coding sequences were predicted using RASTtk annotation. The genome harbors genes for 64 tRNA and 12 rRNA, as well as 63 CRISPR repeats. Four copies of the 16S rRNA gene were found, each with a length of 1,532 bp.

The whole-genome sequence data and raw sequences of the *Pseudomonas* sp. GOM7 are available at NCBI under accession number CP113519, BioProject accession number PRJNA905872, and Sequence Read Archive (SRA) accession numbers SRX18440904 (Illumina raw sequence data) and SRX18440905 (MinION raw sequence data).

Pseudomonas* sp. GOM7 is a new species of *Pseudomonas

Whole genome sequence analyses including average nucleotide identity (ANI) and digital DNA-DNA hybridization (dDDH) have proven to be reliable approaches for phylogenomic studies and species definition [53, 54]. For the *Pseudomonas* genus, a multi-locus sequence analysis (MLSA) based on sequence comparison of the 16S rRNA, *gyrB*, *rpoB*, and *rpoD* genes has shown results comparable to those from whole genome sequence analyses to determine phylogenetic relationships [55, 56]. To better identify the species of *Pseudomonas* sp. GOM7, we first performed a GTDB-Tk analysis based on the concatenated alignment of 120 bacterial genes, including the 16S rRNA, *gyrB* and *rpoB* genes, from the *Pseudomonas* sp. GOM7 genome and all the genomes from the GTDB-Tk database. This analysis revealed 25 *Pseudomonas* species as the closest relatives to *Pseudomonas* sp. GOM7 (S2 Fig). Then, five phylogenomic criteria were calculated using the genome of *Pseudomonas* sp. GOM7 as the query, the genomes of the closest *Pseudomonas* species as the subject, and the genome of *Azotobacter vinelandii* DSM 279 as the outgroup (Table 2). In this analysis, a subject genome should

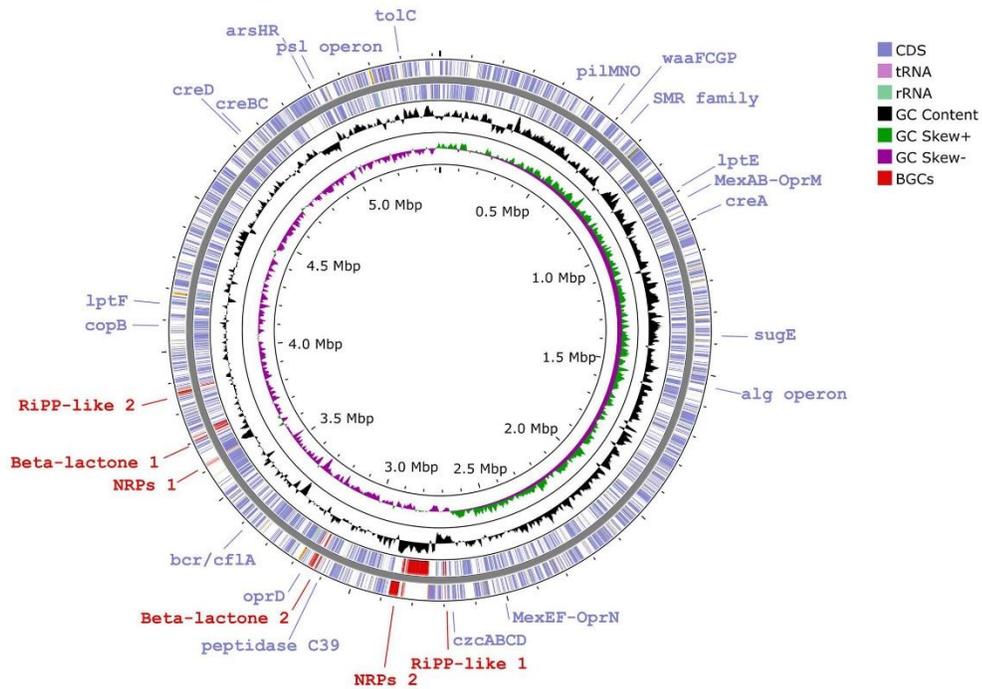


Fig 3. Circular representation of the *Pseudomonas* sp. GOM7 genome. The contents of the featured rings (starting with the outermost ring to the center) are as follows: (blue square) CDS forward and CDS reverse, (black square) GC content, (green square, purple square) GC skew, and genome size. Some genes annotated as encoding virulence factors, antimicrobial resistance, and potential resistance to other compounds are indicated in blue. Biosynthetic gene cluster (BGC) regions predicted by antiSMASH to encode potential antimicrobial compounds are shown in red (red square). The figure was produced using the CGView Server.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288504.g003>

meet all the calculated phylogenomic criteria (dddH >70%, ANI% >96%, AAI >96%, Mash D <0.05, and G+C content difference <1%) to assign the respective species to the query genome [44, 46, 57]. However, none of the subject genomes analyzed met these criteria; only a few genomes yielded a G+C content difference lower than 1% (Table 2). Thus, *Pseudomonas* sp. GOM7 could not be classified as a known *Pseudomonas* species.

The *P. guguensis* JCM 18416 genome exhibited the highest dddH (31.3%) and ANIm (88.30%) values (Table 2), indicating that this is the closest species to *Pseudomonas* sp. GOM7. The *Pseudomonas* sp. GOM7 and *P. guguensis* JCM 18416 genomes share 3,450 gene families of the total 5,564 predicted by CMG BioTools (Fig 4A). CMG BioTools include in a gene family the genes whose proteins have 50% identity and 50% coverage [47]. The comparison of multiple alignment blocks (of minimum 10,000 bp length) between the two genomes showed 27 shared syntenic regions covering 29.21% of the *Pseudomonas* sp. GOM7 genome (Fig 4B). The synteny regions were distributed in 14 contigs of the *P. guguensis* JCM 18416 genome, with a different order than in the *Pseudomonas* sp. GOM7 genome. The low genome coverage and the differences in the distribution of the synteny blocks indicate that the *Pseudomonas* sp.

Table 2. Phylogenomic criteria to identify taxonomically the species of *Pseudomonas* sp. GOM7.

| Genome | dDDH (d4, %) | ANIm (%) | AAI (%) | Mash D | G+C content difference (%) |
|--|--------------|----------|---------|--------|----------------------------|
| <i>P. guguaneensis</i> JCM 18416 (GCA_900104265.1) ^a | 31.3 | 88.30 | 88.19 | 0.11 | 0.86 |
| <i>P. composti</i> LY1 (GCA_001567565.1) | 31.2 | 88.25 | 88.59 | 0.12 | 0.36 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. P818 (GCA_000418555.1) | 30.9 | 88.17 | 88.24 | 0.12 | 0.07 |
| <i>P. indoloxydans</i> JCM 14246 (GCA_003052605.1) ^a | 30.8 | 88.00 | 87.94 | 0.11 | 1.10 |
| <i>P. mendocina</i> EF27 (GCA_008041835.1) | 30.8 | 87.96 | 87.71 | 0.12 | 1.56 |
| <i>P. oleovorans</i> subsp. <i>oleovorans</i> (GCA_002197815.1) ^a | 30.7 | 87.90 | 88.26 | 0.11 | 1.29 |
| <i>P. alcaliphila</i> JAB1 (GCA_001941865.1) | 30.6 | 87.97 | 87.49 | 0.12 | 0.81 |
| <i>P. mendocina</i> PSB00032 (GCA_016008875.1) | 30.5 | 87.87 | 87.55 | 0.12 | 0.24 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. MY50 (GCA_009932725.1) ^a | 30.4 | 88.09 | 87.79 | 0.12 | 0.53 |
| <i>P. sihuensis</i> KCTC 32246T (GCA_900106015.1) ^a | 30.3 | 87.96 | 87.54 | 0.11 | 0.82 |
| <i>P. chengduensis</i> DSM 26382 (GCA_900102635.1) ^a | 30.3 | 87.93 | 87.95 | 0.12 | 1.03 |
| <i>P. chengduensis</i> 402 (GCA_015712065.1) | 30.2 | 87.89 | 87.65 | 0.12 | 0.72 |
| <i>P. mendocina</i> NCTC10897 (GCA_900636545.1) ^a | 30.1 | 87.88 | 88.00 | 0.11 | 0.59 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. ZH-FAD (GCA_002803095.1) | 30.1 | 87.85 | 87.40 | 0.12 | 1.13 |
| <i>P. alcaliphila</i> JCM 10630 (GCA_900101755.1) ^a | 30.1 | 87.77 | 87.87 | 0.11 | 0.47 |
| <i>P. toyotomiensis</i> JCM 15604 (GCA_900115695.1) ^a | 30.0 | 87.84 | 87.79 | 0.12 | 0.74 |
| <i>P. khazarica</i> TBZ2T (GCA_004521985.1) ^a | 30.0 | 87.65 | 87.33 | 0.11 | 1.61 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. AOB-7 (GCA_003696305.1) | 30.0 | 87.66 | 86.01 | 0.12 | 3.27 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. 8Z (GCA_902506535.1) | 30.0 | 87.57 | 88.81 | 0.12 | 2.49 |
| <i>P. mendocina</i> FFL34 (GCA_007049795.1) | 29.9 | 87.67 | 87.68 | 0.12 | 1.37 |
| <i>P. composti</i> CCUG 59231 (GCA_900115475.1) ^a | 29.8 | 87.66 | 87.97 | 0.12 | 0.94 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. 8O (GCA_902506495.1) | 29.7 | 87.57 | 87.50 | 0.12 | 0.88 |
| <i>P. sediminis</i> P111 (GCA_002741105.1) ^a | 29.4 | 87.57 | 87.72 | 0.12 | 0.87 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. MSPm1 (GCA_014109765.1) | 29.3 | 87.31 | 87.10 | 0.12 | 0.94 |
| <i>P. mendocina</i> NEB698 (GCA_003008615.1) | 29.2 | 87.34 | 87.00 | 0.12 | 0.92 |
| <i>Azotobacter vinelandii</i> DSM 279 (GCA_900119555.1) ^b | 22.4 | 84.43 | 72.67 | 0.19 | 2.13 |

^aType strain according to the NCBI database consulted on November 6, 2022.

^bSelected genome as control outgroup.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288504.t002>

GOM7 genome has a dissimilar gene arrangement compared with the *P. guguaneensis* JCM 18416 genome.

Together, these results show that *Pseudomonas* sp. GOM7 is a novel species within the *Pseudomonas* genus.

Prediction of genes for possible antibacterial compounds in *Pseudomonas* sp. GOM7 genome

In agreement with the phenotypic assays showing no production of pyocyanin (S1 Fig), we found that the *Pseudomonas* sp. GOM7 genome lacks both large operons required for the biosynthesis of pyocyanin in *P. aeruginosa* (S3 Fig). However, *Pseudomonas* sp. GOM7 contains five genes showing identity with genes related to phenazine synthesis (*phzC*, *phzF*, *phzG*, *phzH*, and *phzS*); these genes are scattered throughout the genome and share the highest identities (84–97%) with putative genes of *Pseudomonas* sp. 8Z, *P. mendocina*, and *P. composti* strains (S3 Fig). Phenazines other than pyocyanin can also present antimicrobial activity [58]. Thus, it is tempting to speculate that the *phz* genes of *Pseudomonas* sp. GOM7 may be involved in the production of phenazines different from pyocyanin, or other molecules with antibacterial activity.

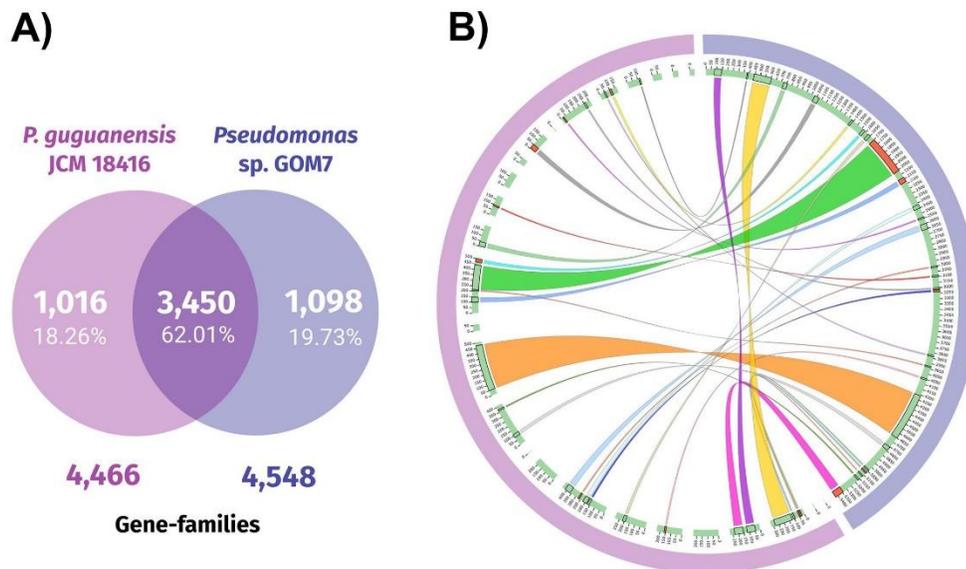


Fig 4. Analysis of gene families and comparison of multiple alignment blocks between the *Pseudomonas* sp. GOM7 (blue) and *P. guguanensis* JCM 18416 (purple) genomes. A) Venn diagram representing the distribution of shared and unique gene families between the two genomes. B) Genome synteny blocks obtained by Sibelia. From the outermost ring to the center, the featured ring contents are as follows: the two genomes are marked in blue and in purple, the contigs of each genome are marked in pale green, and the synteny blocks are represented by different colors. The red blocks in the contig ring indicate the reverse direction of the sequences.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288504.g004>

To identify other genes potentially encoding antimicrobial compounds, the *Pseudomonas* sp. GOM7 genome was analyzed with the antiSMASH program, which predicts biosynthetic gene clusters (BGCs) for secondary metabolites with probable antimicrobial activity. This analysis predicted six BGCs in the genome of *Pseudomonas* sp. GOM7 that could be involved in the production of antimicrobial compounds (Fig 5). Two of these BGCs are predicted to encode ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs) (Fig 5A). Both BGCs contain a single RiPP-like gene, which presents 42% identity between them, and they do not share homology with other reported BGCs (Fig 5A). Two other BGCs of *Pseudomonas* sp. GOM7 are associated with the synthesis of potential β -lactones and share a biosynthetic HMGL-like gene that is 36% identical (Fig 5B). One of these later BGCs carries probable orthologs of the *ynrEGHJ* genes of *Bacillus velezensis* FZB42, which are in an operon with the *fenABCDE* genes to synthesize the antifungal lipopeptide fengycin [59]; however, the *Pseudomonas* sp. GOM7 genome lacks the *fenABCDE* genes that are fundamental for fengycin production (Fig 5B). Two more BGCs of *Pseudomonas* sp. GOM7 were annotated as 'nonribosomal peptide synthetase modules' (NRPs) (Fig 5C). One of these NRPs contains probable orthologs for 17 of the 31 genes of a predicted NRP identified in the genome of the marine *Pseudomonas* sp. strain 8Z [60], with identities between 30–97% (Fig 5C). Additionally, this NRP of *Pseudomonas* sp. GOM7 also carries probable orthologs for 7 genes of *Cupriavidus necator* H16 involved in the production of the siderophore lipopeptide cupriachelin [61]; however, *Pseudomonas* sp. GOM7 lacks several other genes required for the synthesis of such

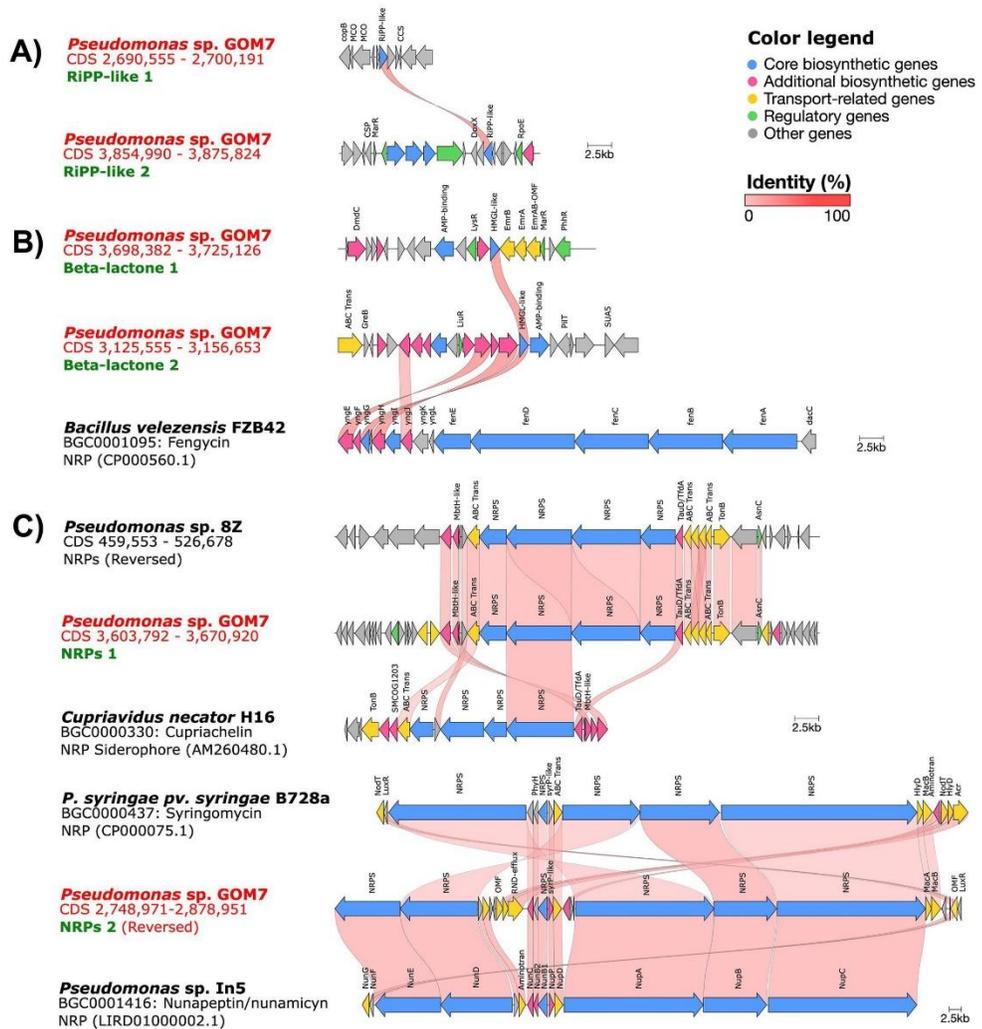


Fig 5. Predicted secondary metabolite biosynthetic gene clusters (BGCs) in the *Pseudomonas* sp. GOM7 genome and their comparison with BGCs from other bacteria. A) BGCs encoding for ribosomal-synthesized and posttranslationally modified peptides (RiPPs). B) BGCs encoding β -lactones. C) BGCs encoding 'nonribosomal peptide synthetase modules' (NRPs). Genes are represented as arrows, and the arrow direction indicates synteny. The probable function of genes and the identity between genes are indicated with colors according to the legends shown.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288504.g005>

compound (Fig 5C). The other NRP of *Pseudomonas* sp. GOM7 contains all genes required for the synthesis of the *P. syringae* syringomycin and *Pseudomonas fluorescens* nunapeptin/nunamicyn antimicrobial lipopeptides [62, 63], with identities between 31–82%, with the highest values for the nunapeptin/nunamicyn genes (Fig 5C).

These analyses revealed possible genes that may be involved in the antibacterial activity shown by *Pseudomonas* sp. GOM7.

The figure shows BGCs predicted with antiSMASH using the relaxed detection mode, when the strict detection mode was used the first BGC was not obtained.

Pseudomonas sp. GOM7 does not show virulence properties in tested assays

As an important trait to know for the study of a new bacterial species, we analyzed whether *Pseudomonas* sp. GOM7 shows different properties associated with the virulence of *P. aeruginosa*, the most relevant clinical species of *Pseudomonas*. First, the virulence of *Pseudomonas* sp. GOM7 and *P. aeruginosa* were compared in the *G. mellonella* infection model, which is widely used to test this phenotype [64]. As expected, *P. aeruginosa* killed 100% of the larvae at 40 h post-infection with an infective dose of 0.6×10^3 CFUs. In contrast, *Pseudomonas* sp. GOM7 and the nonvirulent *E. coli* DH5 α (used as a negative control) did not kill any larvae during the time tested, even with higher infective doses (1×10^3 , 1×10^4 , and 1×10^5 CFUs) (Fig 6). These results indicate that *Pseudomonas* sp. GOM7 is at least 167 times less virulent

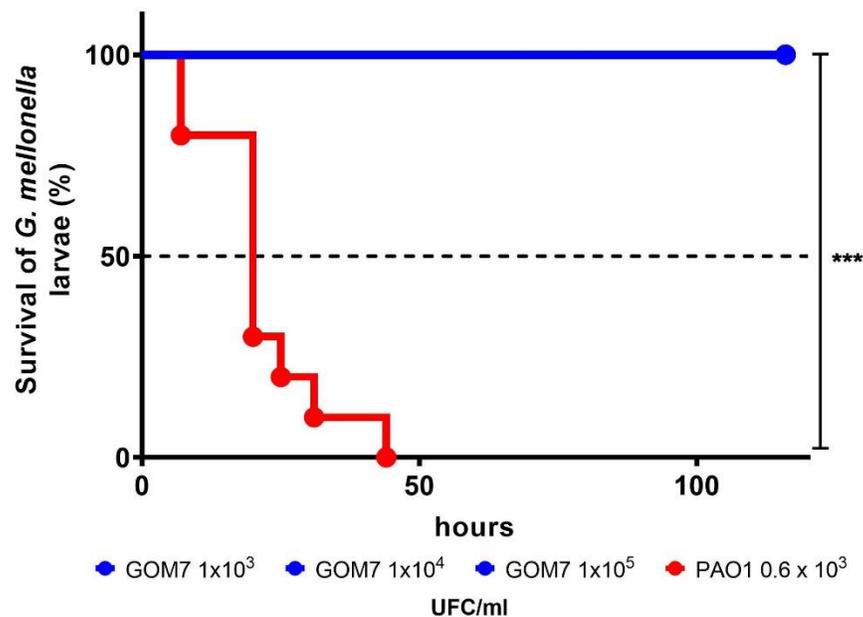


Fig 6. Survival of *G. mellonella* larvae. Mortality of *G. mellonella* larvae induced by bacterial infection. Kaplan-Meier survival curves were obtained by infecting larvae with the indicated CFUs of *Pseudomonas* sp. GOM7 (blue), *P. aeruginosa* PAO1 (red) and monitored daily for 5 days. Larvae not injected or injected only with 1X PBS did not kill any larvae. *P* value was calculated using the log-rank test. ***, *P* < 0.001.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288504.g006>

than *P. aeruginosa* in the *G. mellonella* model. Additionally, we compared *Pseudomonas* sp. GOM7 and *P. aeruginosa* for biofilm formation and the secretion of proteases, two phenotypes related to the virulence of *P. aeruginosa* [65]. As a negative control, the *E. coli* DH5 α strain was also assessed. Our assays showed evident biofilm formation and secretion of proteases for *P. aeruginosa*; in contrast, *Pseudomonas* sp. GOM7 and *E. coli* DH5 α strains presented a very low level of biofilm formation, ~5 and ~14 times lower than that of *P. aeruginosa*, respectively, and were negative for the secretion of protease test (S1 Fig). As described above, *Pseudomonas* sp. GOM7 does not produce pyocyanin (S1 Fig), an additional trait associated with *P. aeruginosa* virulence [66]. In agreement with these results, prediction of virulence factors in the *Pseudomonas* sp. GOM7 genome revealed the presence mostly of genes that can be associated with virulence but that are also present in nonpathogenic bacteria, such as genes for the synthesis and functioning of flagella and a Type IV pilus, as well as to produce alginate, lipopolysaccharide, and exopolysaccharide Ps1 (S5 Table). Overall, these results support that *Pseudomonas* sp. GOM7 is a nonpathogenic bacterium.

Discussion

Pseudomonas is a ubiquitous genus that produces numerous molecules with different biological activities, such as antimicrobial compounds, siderophores, and lytic enzymes [67]. *Pseudomonas* species show high genetic and metabolic diversity, and most genes are species-specific or shared only among a subset of species, which contributes to the ability of these bacteria to colonize different environmental niches or hosts [17, 68].

In this study, we identified a new *Pseudomonas* species that we denominated *Pseudomonas* sp. GOM7, which was isolated from the GoM, did not show virulence properties in the assays tested and exhibited antibacterial activity. Genomic analysis for taxonomic identification indicates that the closest bacterial species to *Pseudomonas* sp. GOM7 is *P. guguanensis* JCM 18416 (Table 2), which was isolated from a hot spring water sample in Taiwan [69]. Four more of the 25 closest bacterial relatives to *Pseudomonas* sp. GOM7 were isolated from marine sources: *P. alcaliphila* JCM 10630 from seawater [70] and *P. chengduensis* 402, *Pseudomonas* sp. 8Z, and *Pseudomonas* sp. 8O from marine algae cultures [60]. Thus, the genome of *Pseudomonas* sp. GOM7 seems to contain traits of *Pseudomonas* species living in aquatic environments.

The colony and the culture supernatant of *Pseudomonas* sp. GOM7 inhibited the growth of *S. aureus*, including MDR strains and the priority pathogen MRSA (Table 1). Previous studies have reported other marine *Pseudomonas* species with antibacterial activity against *S. aureus*. For instance, *Pseudomonas* sp. UJ-6 and *Pseudomonas* sp. AMSN marine strains produce the compounds 1-acetyl-beta-carboline and 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), respectively, which present antibacterial activity against MRSA [71, 72]. Furthermore, a *P. fluorescens* marine strain was found to produce the compounds andrimid and moiramides A-C, which also exhibit antibacterial activity against MRSA [73]. Additionally, the *P. alcaliphila* JCM 10630 marine strain produces toxoflavin, which has antibiotic properties against *Legionella pneumophila* and its host, the amoeba *Vermamoeba vermiformis* [74]. However, the *Pseudomonas* sp. GOM7 genome does not carry the genetic determinants associated with the production of toxoflavin nor any of the compounds described above. On the other hand, the *Pseudomonas* sp. GOM7 genome neither present the *flc* gene cluster (producing fluopsin C) that mediates antibacterial activity of *P. aeruginosa* against *S. aureus* [75].

The anti-*S. aureus* compound(s) produced by *Pseudomonas* sp. GOM7 was extracted from the culture supernatant of this bacterium with ethyl acetate (Fig 2). Many works have reported the suitability of ethyl acetate for the extraction of antibacterial compounds from bacteria, including marine strains [76, 77]. Compounds like peptides, fatty acids, esters, sterols, alkenes,

and terpenes are soluble in ethyl acetate, [78–80]. Furthermore, metabolites like quinones, glycosides, alkaloids, and fatty acids with anti-MRSA activity have been identified in bacteria from ethyl acetate extractions [81, 82]. Computational analysis revealed six BGCs for secondary metabolites in the genome of *Pseudomonas* sp. GOM7; two seem to be specific for *Pseudomonas* sp. GOM7 (not orthologs were identified according to antiSMASH) and four present similarities with previously reported and characterized BGCs (Fig 5). The two specific BGCs of *Pseudomonas* sp. GOM7 encode RiPPs (Fig 5A), which are peptides abundant in the human microbiome and are recognized to have antibiotic activity [83]. Recently, a RiPP BGC was found and determined to be involved, along with ten other gene clusters, in the antibacterial activity of *Pseudomonas* sp. RGM2144 against the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* [84]. Two more BGCs of *Pseudomonas* sp. GOM7 encode for β -lactones (Fig 5B), compounds that are related to a wide range of biological activities, including antibacterial, antifungal, and antiviral activities [85]. *Pseudomonas* sp. and *P. fluorescens* ATCC 39502 produce the β -lactones EM5395 and obafluorin (BGC0001437), respectively, which have activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria [86, 87]. The two others predicted BGCs of *Pseudomonas* sp. GOM7 contain NRPs (Fig 5C). NRPs encode bioactive peptides and are found in bacteria, cyanobacteria, and fungi; NRPs producing antimicrobial peptides have been reported in marine bacteria [88]. One NRP of *Pseudomonas* sp. GOM7 is similar to a putative NRP from *Pseudomonas* sp. 8Z (Fig 5C) [60]. The other NRP of *Pseudomonas* sp. GOM7 showed the highest similarity with an NRP of the soil bacterium *P. fluorescens* In5, which synthesizes nunapeptin and nunamicyn, two peptides with antibacterial activity against the phytopathogen *Rhizoctonia solani* [63]. The same NRP of *Pseudomonas* sp. GOM7 also presented similarity to a NRP of the *P. syringae* pv. *syringae* B728a strain that synthesizes syringomycin, a compound with antibacterial activity against *Rhodococcus fascians*, *Micrococcus luteus*, *Rhodotorula pilimanae*, *Geotrichum candidum*, and the plant pathogen *Botrytis cinerea* [89]. Important to note, most predicted BGCs of *Pseudomonas* sp. GOM7 code for peptides, which are molecules that can be extracted with the solvent ethyl acetate [79]. Thus, it is tempting to speculate that the antibacterial activity of *Pseudomonas* sp. GOM7 is due to one or more peptides. Identification of the antibacterial compound(s) produced by *Pseudomonas* sp. GOM7 is a matter of our current investigation.

Our study provides further evidence showing the potential of marine microorganisms as a source of new antimicrobials.

Supporting information

S1 Table. Nonmarine bacterial strains used in this study.

(PDF)

S2 Table. Antibiotic susceptibility of *S. aureus* isolates.

(PDF)

S3 Table. Identification of marine isolates showing antibacterial activity by 16S rRNA sequencing.

(PDF)

S4 Table. Pyocyanin production by *P. aeruginosa* marine isolates showing antibacterial activity.

(PDF)

S5 Table. Virulence factors predicted for *Pseudomonas* sp. GOM7 by RASTtk annotation in the BV-BRC web server.

(XLSX)

S1 Fig. Comparison of virulence properties among *Pseudomonas* sp. GOM7, *P. aeruginosa* (pathogenic), and *E. coli* (nonpathogenic). A) Visualization of the characteristic blue-green coloration generated by pyocyanin on bacteria grown on cetrimide agar. B) Pyocyanin quantification in the supernatant of *Pseudomonas* sp. GOM7 and *P. aeruginosa* PAO1 cultures after sequential extraction with chloroform and quantification by spectrophotometry. C) Secretion of proteases. Production of extracellular proteases was evaluated in skim-milk agar. D). Biofilm formation. The crystal violet staining method was used to quantify biofilm formation. Quantification of pyocyanin production and biofilm formation was determined in bacteria grown in LB at 37°C. Bars represent averages \pm S.D. *P* value was calculated using One-way ANOVA combined with Dunnett's multiple comparison test. ***, *P* < 0.001. *P. aeruginosa* PAO1 and *E. coli* DH5 α strains were used as positive and negative controls, respectively. All assays were performed in triplicate.

(PDF)

S2 Fig. *Pseudomonas* species closest to *Pseudomonas* sp. GOM7. A) Position of the *Pseudomonas* sp. GOM7 genome (red arrow) in the reference tree inferred by GTDB-Tk with FastTree v2.1.10 under the WAG model from the concatenated alignment of 120 ubiquitous bacterial gen. B) Clade of the reference tree where the *Pseudomonas* sp. GOM7 genome (in red) was placed together with genomes from other *Pseudomonas* species. The genome with the accession number in blue has been deleted from the NCBI.

(PDF)

S3 Fig. Genes required for pyocyanin production in *P. aeruginosa* and some probable orthologous genes present in *Pseudomonas* sp. GOM7. A) The two clusters of genes that synthesize pyocyanin in *P. aeruginosa*. The enzymes encoded in the *phzA-phzG* genes transform chorismic acid into the phenazine-1-carboxylic acid (PCA), which is converted into different phenazines by the enzymes encoded in the *phzH*, *phzS*, and *phzM* genes; one phenazine is then transformed into pyocyanin by the enzyme encoded in the *phzS* gene. B) Probable *phzH*, *phzC*, *phzF*, *phzG*, and *phzS* orthologous genes present in the *Pseudomonas* sp. GOM7 genome. This figure was created with BioRender.com.

(PDF)

Acknowledgments

We thank the University Unit of Massive Sequencing and Bioinformatics of the Institute of Biotechnology-UNAM for giving us access to its computer cluster. We thank Karla Millán-López, Fernando Lévaro-Domínguez, Samuel González García, Alejandro Alagón-Cano, Felipe Olvera-Rodríguez, and Mario Caro-Bermudez for their technical support or assistance, as well as Dr. Gloria Soberón-Chavez and Dr. Miguel Cocotl-Yañez for sharing protocols.

Author Contributions

Conceptualization: Víctor H. Bustamante.

Data curation: Luis E. Romero-González, Jorge Rojas-Vargas.

Formal analysis: Luis E. Romero-González, Jorge Rojas-Vargas.

Funding acquisition: Víctor H. Bustamante, Liliana Pardo-López.

Investigation: Luis E. Romero-González, Jorge Rojas-Vargas, Luis F. Muriel-Millán, Jaime Bustos-Martínez.

Methodology: Luis E. Romero-González, Jorge Rojas-Vargas.

Project administration: Víctor H. Bustamante, Liliana Pardo-López.

Resources: Víctor H. Bustamante, Liliana Pardo-López.

Supervision: Víctor H. Bustamante, Liliana Pardo-López.

Visualization: Luis E. Romero-González, Jorge Rojas-Vargas.

Writing – original draft: Luis E. Romero-González, Jorge Rojas-Vargas, Víctor H. Bustamante.

Writing – review & editing: Luis E. Romero-González, Jorge Rojas-Vargas, Luis F. Muriel-Millán, Jaime Bustos-Martínez, Víctor H. Bustamante, Liliana Pardo-López.

References

1. Dadgostar P. Antimicrobial resistance: implications and costs. *Infect Drug Resist.* 2019; 12: 3903–3910. <https://doi.org/10.2147/IDR.S234610> PMID: 31908502
2. Aslam B, Wang W, Arshad MI, Khurshid M, Muzammil S, Rasool MH, et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infect Drug Resist.* 2018; 11: 1645–1658. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173867> PMID: 30349322
3. Rezasoltani S, Yadegar A, Hatami B, Asadzadeh Aghdaei H, Zali MR. Antimicrobial Resistance as a Hidden Menace Lurking Behind the COVID-19 Outbreak: The Global Impacts of Too Much Hygiene on AMR. *Front Microbiol.* 2020; 11: 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.590683> PMID: 33384670
4. Mahoney AR, Safaee MM, Wuest WM, Furst AL. The silent pandemic: Emergent antibiotic resistances following the global response to SARS-CoV-2. *iScience.* 2021; 24: 102304. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102304> PMID: 33748695
5. Lee AS, de Lencastre H, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-Kumar S, Peschel A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Prim.* 2018; 4: 18033. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.33> PMID: 29849094
6. Turner NA, Sharma-Kuinkel BK, Maskarinec SA, Eichenberger EM, Shah PP, Carugati M, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nat Rev Microbiol.* 2019; 17: 203–218. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0147-4> PMID: 30737488
7. Kourtis AP, Hatfield K, Baggs J, Mu Y, See I, Epton E, et al. Vital Signs: Epidemiology and Recent Trends in Methicillin-Resistant and in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections—United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2019; 68: 214–219. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6809e1> PMID: 30845118
8. Adalbert JR, Varshney K, Tobin R, Pajaro R. Clinical outcomes in patients co-infected with COVID-19 and *Staphylococcus aureus*: a scoping review. *BMC Infect Dis.* 2021; 21: 985. <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06616-4> PMID: 34548027
9. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod.* 2016; 79: 629–661. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055> PMID: 26852623
10. Ali SM, Siddiqui R, Khan NA. Antimicrobial discovery from natural and unusual sources. *J Pharm Pharmacol.* 2018; 70: 1287–1300. <https://doi.org/10.1111/jphp.12976> PMID: 30003546
11. Monciardini P, Iorio M, Maffioli S, Sosio M, Donadio S. Discovering new bioactive molecules from microbial sources. *Microb Biotechnol.* 2014; 7: 209–220. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12123> PMID: 24661414
12. Demain AL, Gómez-Ortiz B, Ruiz-Villafán B, Rodríguez-Sanoja R, Sánchez S. Recent findings of molecules with anti-infective activity: screening of non-conventional sources. *Curr Opin Pharmacol.* 2019; 48: 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2019.04.003> PMID: 31078095
13. Stincone P, Brandelli A. Marine bacteria as source of antimicrobial compounds. *Crit Rev Biotechnol.* 2020; 40: 306–319. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1710457> PMID: 31992085
14. Liu M, El-Hossary EM, Oelschlaeger TA, Donia MS, Quinn RJ, Abdelmohsen UR. Potential of marine natural products against drug-resistant bacterial infections. *Lancet Infect Dis.* 2019; 19: e237–e245. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30711-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30711-4) PMID: 31031171

15. Godoy-Lozano EE, Escobar-Zepeda A, Raggi L, Merino E, Gutierrez-Rios RM, Juarez K, et al. Bacterial diversity and the geochemical landscape in the southwestern Gulf of Mexico. *Front Microbiol.* 2018; 9: 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02528> PMID: 30405581
16. Escobedo-Hinojosa W, Pardo-López L. Analysis of bacterial metagenomes from the Southwestern Gulf of Mexico for pathogens detection. *Pathog Dis.* 2017; 75: 1–9. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftx058> PMID: 28535299
17. Silby MW, Winstanley C, Godfrey SAC, Levy SB, Jackson RW. *Pseudomonas* genomes: Diverse and adaptable. *FEMS Microbiol Rev.* 2011; 35: 652–680. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x> PMID: 21361996
18. Laursen JB, Nielsen J. Phenazine natural products: Biosynthesis, synthetic analogues, and biological activity. *Chem Rev.* 2004; 104: 1663–1685. <https://doi.org/10.1021/cr020473j> PMID: 15008629
19. Rumbaugh KP. Genomic complexity and plasticity ensure *Pseudomonas* success. *FEMS Microbiol Lett.* 2014; 356: 141–143. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12517> PMID: 25060810
20. Muriel-Millán LF, Rodríguez-Mejía JL, Godoy-Lozano EE, Rivera-Gómez N, Gutierrez-Rios R-M, Morales-Guzmán D, et al. Functional and Genomic Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* Strain Isolated From the Southwestern Gulf of Mexico Reveals an Enhanced Adaptation for Long-Chain Alkane Degradation. *Front Mar Sci.* 2019; 6: 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00572>
21. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test. 13th ed. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
22. Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc.* 2008; 3: 163–175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521> PMID: 18274517
23. Durand GA, Raoult D, Dubourg G. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *Int J Antimicrob Agents.* 2019; 53: 371–382. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.11.010> PMID: 30472287
24. Akbar N, Siddiqui R, Sagathevan K, Khan NA. Gut bacteria of animals living in polluted environments exhibit broad-spectrum antibacterial activities. *Int Microbiol.* 2020; 23: 511–526. <https://doi.org/10.1007/s10123-020-00123-3> PMID: 32124096
25. Khan NA, Osman K, Goldsworthy GJ. Lysates of *Locusta migratoria* brain exhibit potent broad-spectrum antibacterial activity. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 62: 634–635. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn239> PMID: 18552339
26. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Ćirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis.* 2007; 115: 891–899. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x PMID: 17696944
27. Essar DW, Eberly L, Hadero A, Crawford IP. Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: Interchangeability of the two anthranilate synthase and evolutionary implications. *J Bacteriol.* 1990; 172: 884–900. <https://doi.org/10.1128/jb.172.2.884-900.1990>
28. Pailin T, Kang DH, Schmidt K, Fung DYC. Detection of extracellular bound proteinase in EPS-producing lactic acid bacteria cultures on skim milk agar. *Lett Appl Microbiol.* 2001; 33: 45–49. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2001.00954.x> PMID: 11442814
29. Loh JMS, Adenwalla N, Wiles S, Proft T. *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A streptococcus. *Virulence.* 2013; 4: 419–428. <https://doi.org/10.4161/viru.24930> PMID: 23652836
30. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* 1991; 173: 697–703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991> PMID: 1987160
31. Hall TA. BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser.* 1999; 41: 95–98.
32. McGinnis S, Madden TL. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32: W20–W25. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh435> PMID: 15215342
33. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010. Available: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
34. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014; 30: 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170> PMID: 24695404
35. Wick RR, Judd LM, Holt KE. Performance of neural network basecalling tools for Oxford Nanopore sequencing. *Genome Biol.* 2019; 20: 129. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1727-y> PMID: 31234903
36. De Coster W, D'Hert S, Schultz DT, Cruts M, Van Broeckhoven C. NanoPack: visualizing and processing long-read sequencing data. Berger B, editor. *Bioinformatics.* 2018; 34: 2666–2669. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty149> PMID: 29547981

37. Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. Phillippy AM, editor. PLOS Comput Biol. 2017; 13: e1005595. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595> PMID: 28594827
38. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. Bioinformatics. 2013; 29: 1072–1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086> PMID: 23422339
39. Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. Genome Res. 2015; 25: 1043–1055. <https://doi.org/10.1101/gr.186072.114> PMID: 25977477
40. Brettin T, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Olsen GJ, et al. RASTik: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. Sci Rep. 2015; 5: 8365. <https://doi.org/10.1038/srep08365> PMID: 25666585
41. Medema MH, Blin K, Cimermancic P, de Jager V, Zakrzewski P, Fischbach MA, et al. antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. Nucleic Acids Res. 2011; 39: W339–W346. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr466> PMID: 21672958
42. Gilchrist CLM, Chooi Y-H. Clinker & clustermap.js: Automatic generation of gene cluster comparison figures. Robinson P, editor. Bioinformatics. 2021; 37: 2473–2475. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab007> PMID: 33459763
43. Chaumeil P-A, Mussig AJ, Hugenholtz P, Parks DH. GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database. Hancock J, editor. Bioinformatics. 2019. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz848> PMID: 31730192
44. Ondov BD, Treangen TJ, Melsted P, Mallonee AB, Bergman NH, Koren S, et al. Mash: fast genome and metagenome distance estimation using MinHash. Genome Biol. 2016; 17: 132. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0997-x> PMID: 27323842
45. Richter M, Rosselló-Móra R, Oliver Glöckner F, Peplies J. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. Bioinformatics. 2016; 32: 929–931. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv681> PMID: 26576653
46. Meier-Kolthoff JP, Göker M. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. Nat Commun. 2019; 10: 2182. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10210-3> PMID: 31097708
47. Vesth T, Lagesen K, Acar Ö, Ussery D. CMG-Biotools, a Free Workbench for Basic Comparative Microbial Genomics. de Crécy-Lagard V, editor. PLoS One. 2013; 8: e60120. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060120> PMID: 23577086
48. Minkin I, Patel A, Kolmogorov M, Vyahhi N, Pham S. Sibelia: A Scalable and Comprehensive Synteny Block Generation Tool for Closely Related Microbial Genomes. 2013. pp. 215–229. https://doi.org/10.1007/978-3-642-40453-5_17
49. Krzywinski M, Schein J, Birol I, Connors J, Gascoyne R, Horsman D, et al. Circos: An information aesthetic for comparative genomics. Genome Res. 2009; 19: 1639–1645. <https://doi.org/10.1101/gr.092759.109> PMID: 19541911
50. Mavrodi D V, Bonsall RF, Delaney SM, Soule MJ, Phillips G, Thomashow LS. Functional Analysis of Genes for Biosynthesis of Pyocyanin and Phenazine-1-Carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Downloaded from <http://jb.asm.org/> on September 19, 2015 by SREE CHITRA TIRUNAL INST FOR. J Bacteriol. 2001; 183: 6454–6465. <https://doi.org/10.1128/JB.183.21.6454>
51. Jayaseelan S, Ramaswamy D, Dharmaraj S. Pyocyanin: Production, applications, challenges and new insights. World J Microbiol Biotechnol. 2014; 30: 1159–1168. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1552-5> PMID: 24214679
52. Michel-Briand Y, Baysse C. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. Biochimie. 2002; 84: 499–510. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(02\)01422-0](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(02)01422-0) PMID: 12423794
53. Richter M, Rosselló-Móra R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. Proc Natl Acad Sci. 2009; 106: 19126–19131. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906412106> PMID: 19855009
54. Nouioui I, Sangal V. Advanced prokaryotic systematics: the modern face of an ancient science. New Microbes New Infect. 2022;49–50: 101036. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2022.101036> PMID: 36425013
55. Hesse C, Schulz F, Bull CT, Shaffer BT, Yan Q, Shapiro N, et al. Genome-based evolutionary history of *Pseudomonas* spp. Environ Microbiol. 2018; 20: 2142–2159. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14130> PMID: 29633519
56. Gomila M, Peña A, Mulet M, Lalucat J, García-Valdés E. Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. Front Microbiol. 2015; 6: 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00214> PMID: 26074881

57. Barco RA, Garrity GM, Scott JJ, Amend JP, Nealson KH, Emerson D. A Genus Definition for Bacteria and Archaea Based on a Standard Genome Relatedness Index. *Giovannoni SJ, editor. MBio.* 2020; 11. <https://doi.org/10.1128/mBio.02475-19> PMID: 31937639
58. Price-Whelan A, Dietrich LEP, Newman DK. Rethinking "secondary" metabolism: Physiological roles for phenazine antibiotics. *Nat Chem Biol.* 2006; 2: 71–78. <https://doi.org/10.1038/nchembio764> PMID: 16421586
59. Koumoutsis A, Chen X-H, Henne A, Liesegang H, Hitzeroth G, Franke P, et al. Structural and Functional Characterization of Gene Clusters Directing Nonribosomal Synthesis of Bioactive Cyclic Lipopeptides in *Bacillus amyloqueliciens* Strain FZB42. *J Bacteriol.* 2004; 186: 1084–1096. <https://doi.org/10.1128/JB.186.4.1084-1096.2004>
60. Karimi E, Geslain E, KleinJan H, Tanguy G, Legeay E, Corre E, et al. Genome Sequences of 72 Bacterial Strains Isolated from *Ectocarpus subulatus*: A Resource for Algal Microbiology. *Ochman H, editor. Genome Biol Evol.* 2020; 12: 3647–3655. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz278> PMID: 31841132
61. Kreuzer MF, Kage H, Nett M. Structure and Biosynthetic Assembly of Cupriachelin, a Photoreactive Siderophore from the Bioplastic Producer *Cupriavidus necator*H16. *J Am Chem Soc.* 2012; 134: 5415–5422. <https://doi.org/10.1021/ja300620z> PMID: 22381697
62. Scholz-Schroeder BK, Soule JD, Gross DC. The sypA, sypB, and sypC Synthetase Genes Encode Twenty-Two Modules Involved in the Nonribosomal Peptide Synthesis of Syringopeptin by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B301D. *Mol Plant-Microbe Interact.* 2003; 16: 271–280. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.4.271> PMID: 12744455
63. Michelsen CF, Watrous J, Glaring MA, Kersten R, Koyama N, Dorrestein PC, et al. Nonribosomal Peptides, Key Biocontrol Components for *Pseudomonas fluorescens* In5, Isolated from a Greenlandic Suppressive Soil. *Greenberg EP, editor. MBio.* 2015; 6. <https://doi.org/10.1128/mBio.00079-15> PMID: 25784695
64. Pereira MF, Rossi CC, Da Silva GC, Rosa JN, Bazzolli DMS. *Galleria mellonella* as an infection model: An in-depth look at why it works and practical considerations for successful application. *Pathog Dis.* 2020; 78: 1–15. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftaa056> PMID: 32960263
65. Veetilvalappil V V., Manuel A, Aranjani JM, Tawale R, Koteswara A. Pathogenic arsenal of *Pseudomonas aeruginosa*: an update on virulence factors. *Future Microbiol.* 2022; 17: 465–481. <https://doi.org/10.2217/fmb-2021-0158> PMID: 35289684
66. Lau GW, Hassett DJ, Ran H, Kong F. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol Med.* 2004; 10: 599–606. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.10.002> PMID: 15567330
67. Gross H, Loper JE. Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Nat Prod Rep.* 2009; 26: 1408–1446. <https://doi.org/10.1039/b817075b> PMID: 19844639
68. Kung VL, Ozer EA, Hauser AR. The Accessory Genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010; 74: 621–641. <https://doi.org/10.1128/mmb.00027-10> PMID: 21119020
69. Liu Y-C, Young L-S, Lin S-Y, Hameed A, Hsu Y-H, Lai W-A, et al. *Pseudomonas guguanensis* sp. nov., a gammaproteobacterium isolated from a hot spring. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013; 63: 4591–4598. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.047712-0>
70. Yumoto I, Yamazaki K, Hishinuma M, Nodasaka Y, Suemori A, Nakajima K, et al. *Pseudomonas alcaliphila* sp. nov., a novel facultatively psychrophilic alkaliphile isolated from seawater. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001; 51: 349–355. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-2-349> PMID: 11321079
71. Lee D-S, Eom S-H, Jeong S-Y, Shin HJ, Je J-Y, Lee E-W, et al. Anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) substance from the marine bacterium *Pseudomonas* sp. UJ-6. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2013; 35: 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.11.011> PMID: 23434522
72. Isnansetyo A, Horikawa M, Kamei Y. In vitro anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* activity of 2,4-diacetylphloroglucinol produced by *Pseudomonas* sp. AMSN isolated from a marine alga. *J Antimicrob Chemother.* 2001; 47: 724–725. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jac.a002694> PMID: 11328799
73. Needham J, Kelly MT, Ishige M, Andersen RJ. Andrimid and Moiramides A-C, Metabolites Produced in Culture by a Marine Isolate of the Bacterium *Pseudomonas fluorescens*: Structure Elucidation and Biosynthesis. *J Org Chem.* 1994; 59: 2058–2063. <https://doi.org/10.1021/jo00087a020>
74. Faucher SP, Matthews S, Nickzad A, Vounba P, Shetty D, Bédard É, et al. Toxoflavin secreted by *Pseudomonas alcaliphila* inhibits the growth of *Legionella pneumophila* and *Vermamoeba vermiformis*. *Water Res.* 2022; 216: 118328. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118328> PMID: 35364354
75. Patteson JB, Putz AT, Tao L, Simke WC, Bryant LH, Britt RD, et al. Biosynthesis of fluopisin C, a copper-containing antibiotic from *Pseudomonas aeruginosa*. *Science (80-).* 2021; 374: 1005–1009. <https://doi.org/10.1126/science.abj6749> PMID: 34793213

76. Núñez-Montero K, Lamilla C, Abanto M, Maruyama F, Jorquera MA, Santos A, et al. Antarctic *Streptomyces fildesensis* So13.3 strain as a promising source for antimicrobials discovery. *Sci Rep*. 2019; 9: 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43960-7> PMID: 31097761
77. Thirumurugan D, Vijayakumar R, Vadivalagan C, Karthika P, Alam Khan MK. Isolation, structure elucidation and antibacterial activity of methyl-4,8-dimethylundecanate from the marine actinobacterium *Streptomyces albogriseolus* ECR64. *Microb Pathog*. 2018; 121: 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.05.025> PMID: 29775727
78. Sarker SD, Nahar L, editors. *Natural Products Isolation*. Totowa, NJ: Humana Press; 2012. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1>
79. Saadouli I, El Euch IZ, Trabelsi E, Mosbah A, Redissi A, Ferjani R, et al. Isolation, characterization and chemical synthesis of large spectrum antimicrobial cyclic dipeptide (L-leu-l-pro) from *streptomyces missionensis* 16r3y1 bacteria extracts. a novel 1H NMR metabolomic approach. *Antibiotics*. 2020; 9: 1–13. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9050270> PMID: 32455784
80. Xie Y, Peng Q, Ji Y, Xie A, Yang L, Mu S, et al. Isolation and Identification of Antibacterial Bioactive Compounds From *Bacillus megaterium* L2. *Front Microbiol*. 2021; 12: 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.645484> PMID: 33841370
81. Skariyachan S, Rao AG, Patil MR, Saikia B, Bharadwaj Kn V, Rao Gs J. Antimicrobial potential of metabolites extracted from bacterial symbionts associated with marine sponges in coastal area of Gulf of Mannar Biosphere, India. *Lett Appl Microbiol*. 2014; 58: 231–241. <https://doi.org/10.1111/lam.12178> PMID: 24138171
82. El-Naggar NEA, El-Bindary AAA, Abdel-Mogib M, Nour NS. In vitro activity, extraction, separation and structure elucidation of antibiotic produced by *Streptomyces anulatus* NEAE-94 active against multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biotechnol Biotechnol Equip*. 2017; 31: 418–430. <https://doi.org/10.1080/13102818.2016.1276412>
83. Li Y, Rebuffat S. The manifold roles of microbial ribosomal peptide-based natural products in physiology and ecology. *J Biol Chem*. 2020; 295: 34–54. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.006545> PMID: 31784450
84. Vidal JM, Fonseca A, Ruiz P, Sepúlveda D, Carrasco C, Scilipoti S, et al. Genomic features of *Pseudomonas* sp. RGM2144 correlates with increased survival of rainbow trout infected by *Flavobacterium psychrophilum*. *J Fish Dis*. 2022. <https://doi.org/10.1111/jfd.13713> PMID: 36130050
85. Wackett LP. Microbial β -lactone natural products. *Microb Biotechnol*. 2017; 10: 218–220. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12600> PMID: 28032693
86. Wells JS, Hunter JC, Astle GL, Sherwood JC, Ricca CM, Trejo WH, et al. Distribution of beta-lactam and beta-lactone producing bacteria in nature. *J Antibiot (Tokyo)*. 1982; 35: 814–821. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.35.814> PMID: 7174535
87. Robinson SL, Christenson JK, Wackett LP. Biosynthesis and chemical diversity of β -lactone natural products. *Nat Prod Rep*. 2019; 36: 458–475. <https://doi.org/10.1039/C8NP00052B> PMID: 30191940
88. Agrawal S, Acharya D, Adholeya A, Barrow CJ, Deshmukh SK. Nonribosomal peptides from marine microbes and their antimicrobial and anticancer potential. *Front Pharmacol*. 2017; 8: 1–26. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00828> PMID: 29209209
89. Lavermicocca P, Sante Iacobellis N, Simmaco M, Graniti A. Biological properties and spectrum of activity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* toxins. *Physiol Mol Plant Pathol*. 1997; 50: 129–140. <https://doi.org/10.1006/pmpp.1996.0078>

RESEARCH ARTICLE

The *Salmonella* Typhimurium InvF-SicA complex is necessary for the transcription of *sopB* in the absence of the repressor H-NS

Luis E. Romero-González¹✉, Deyanira Pérez-Morales²✉, Daniel Cortés-Avalos¹✉, Edwin Vázquez-Guerrero¹✉, Denisse A. Paredes-Hernández¹, Paulina Estrada-de los Santos¹, Lourdes Villa-Tanaca¹, Miguel A. De la Cruz³, Víctor H. Bustamante², J. Antonio Ibarra¹*✉

1 Laboratorio de Genética Microbiana, Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México, **2** Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México, **3** Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México

✉ These authors contributed equally to this work.

* jaig19@gmail.com, jibarrag@ipn.mx



OPEN ACCESS

Citation: Romero-González LE, Pérez-Morales D, Cortés-Avalos D, Vázquez-Guerrero E, Paredes-Hernández DA, Estrada-de los Santos P, et al. (2020) The *Salmonella* Typhimurium InvF-SicA complex is necessary for the transcription of *sopB* in the absence of the repressor H-NS. PLoS ONE 15(10): e0240617. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240617>

Editor: Eric Cascales, Centre National de la Recherche Scientifique, Aix-Marseille Université, FRANCE

Received: July 30, 2020

Accepted: September 21, 2020

Published: October 29, 2020

Copyright: © 2020 Romero-González et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its [Supporting Information](#) files.

Funding: This work was supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto Apoyado por el Fondo Sectorial de Investigación para la Educación CONACYT A1-S-25438), Secretaría de Investigación y Posgrado

Abstract

Expression of virulence factors in non-typhoidal *Salmonella enterica* depends on a wide variety of general and specific transcriptional factors that act in response to multiple environmental signals. Expression of genes for cellular invasion located in the *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1) is tightly regulated by several transcriptional regulators arrayed in a cascade, while repression of this system is exerted mainly by H-NS. In SPI-1, H-NS represses the expression mainly by binding to the regulatory region of *hilA* and derepression is exercised mainly by HilD. However, the possible regulatory role of H-NS in genes downstream from HilD and HilA, such as those regulated by InvF, has not been fully explored. Here the role of H-NS on the expression of *sopB*, an InvF dependent gene encoded in SPI-5, was evaluated. Our data show that InvF is required for the expression of *sopB* even in the absence of H-NS. Furthermore, in agreement with previous results on other InvF-regulated genes, we found that the expression of *sopB* requires the InvF/SicA complex. Our results support that SicA is not required for DNA binding nor for increasing affinity of InvF to DNA *in vitro*. Moreover, by using a bacterial two-hybrid system we were able to identify interactions between SicA and InvF. Lastly, protein-protein interaction assays suggest that InvF functions as a monomer. Derived from these results we postulate that the InvF/SicA complex does not act on *sopB* as an anti-H-NS factor; instead, it seems to induce the expression of *sopB* by acting as a classical transcriptional regulator.

Introduction

Salmonella species are widely distributed and are the cause of gastroenteritis, diarrhea and typhoid fever around the globe [1,2]. These bacteria have a plethora of virulence factors mainly