



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y MOLECULAR DE BACTERIAS AISLADAS
EN LA CIUDAD DE MÉXICO; DE LA COMUNIDAD A LA
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

JANETH MICHELLE VALDÉS HERNÁNDEZ



CDMX

2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: BONILLA ESPINOSA EDUARDO

VOCAL: Profesor: COELLO COUTIÑO MARTHA PATRICIA

SECRETARIO: Profesor: ROMERO RODRIGUEZ ALBA ICXIUH

1er. SUPLENTE: Profesor: RUIZ VILLAFAN BEATRIZ

2° SUPLENTE: Profesor: MANERO BRITO SILVIA MONICA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

(nombre y firma)

Dra. Alba Romero Rodríguez

SUPERVISOR TÉCNICO (Si lo hay):

(nombre y firma)

SUSTENTANTE:

Janeth Michelle Valdés Hernández

Para mi amada familia, quienes han sido mi apoyo incondicional y mi fuente constante de inspiración. A ustedes, por su amor, paciencia y aliento en cada paso de este camino. Gracias por estar siempre a mi lado. Este logro es tan suyo como mío. Con gratitud y amor,

Janeth

AGRADECIMIENTOS

Técnicos

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (Proyecto PAPIIT IA206823) por el financiamiento otorgado para la realización de este proyecto.

Agradecimiento formal por la ayuda técnica en los experimentos de microdilución para la determinación de susceptibilidad antimicrobiana a Yanet Teresa Cruz.

Personales

A la Dra. Alba Romero Rodríguez por su guía experta y dedicación en la dirección de este trabajo de investigación. Agradezco su paciencia, sabiduría y compromiso para impulsar mi crecimiento académico y personal. Gracias por ser una mentora excepcional y por brindarme la oportunidad de crecer bajo su dirección.

A mi madre Judith Hernández, por sus palabras de aliento y amor infinito que han sido mi mayor impulso en este camino. Agradezco tu fuerza, presencia, paciencia, constante apoyo y comprensión a lo largo de toda mi vida que me han permitido llegar a donde estoy. Tu dedicación y cariño han sido mi mayor inspiración. ¡Gracias por ser la luz de mi vida y por ser la mejor madre del mundo!

A mi padre Abelardo Valdés, por su amor incondicional y respaldo que han sido mi roca en este trayecto. Agradezco tu constante guía, apoyo, motivación, paciencia y comprensión a lo largo de toda mi vida que me han permitido llegar a donde estoy. ¡Gracias por ser mi fuente de sabiduría y por ser el mejor padre del mundo!

A mi hermana Thais Valdés, por su constante apoyo, aliento y sabios consejos que han sido un faro en este camino. Agradezco profundamente tu guía y paciencia a lo largo de toda mi vida. Tu ejemplo de determinación y compromiso ha sido mi inspiración. ¡Gracias por ser mi mejor amiga y por ser la mejor hermana del mundo!

A mi abuela Maria Luisa Villeda y a mi tío Gerardo Hernández, por haber sido una segunda madre y un segundo padre para mí. Su presencia ha sido una fuente inagotable de apoyo, consejos sabios y amor incondicional. ¡Gracias por ser ejemplo y mi refugio!

A mis amigxs, por ser mi fuente de apoyo y alegría durante este camino. Su amistad ha hecho de esta etapa algo inolvidable. Sobre todo gracias a Delia, Mariana, Mayte Michelle, Miguel y Montse, por demostrarme el verdadero significado de la amistad.

A Dios, por cada bendición recibida. Tu amor incondicional guía cada paso de mi vida.

ÍNDICE

Índice de figuras.....	10
Índice de tablas.....	12
Abreviaturas.....	13
Resumen.....	14
Abstract.....	16
Introducción.....	18
Microbiología ambiental y salud humana perspectiva desde una salud	18
Las aguas residuales como vía de contaminación.....	20
Resistoma bacteriano a antimicrobianos.....	22
Mecanismos moleculares de resistencia a antimicrobianos.....	25
Mecanismos de transferencia horizontal de genes en bacterias.....	29
Antecedentes	32
Justificación.....	32
Hipótesis	32
Objetivos.....	33
Objetivo general	33
Objetivos particulares.....	33
Materiales y métodos.....	34
Biológico.....	34
Muestra	34

Métodos.....	34
Cepas y condiciones de cultivo bacteriano.....	34
Caracterización microscópica.....	35
Caracterización morfológica.....	35
Medio de cultivo para la cepa JVH47.....	35
Determinación de los límites de temperatura, pH y salinidad.....	35
Ensayo de movilidad, hemólisis y amilasa/proteasa.....	36
Formación de biopelícula.....	36
Microscopio Electrónico de Transmisión.....	37
Extracción de ADN.....	37
Amplificación del gen 16S ARNr y alineamiento BLAST.....	38
Ensamble de genoma completo.....	39
Construcción filogenias.....	39
Identidad de Nucleótidos Promedio (ANI).....	39
Anotación del genoma completo.....	40
Detección de genes de resistencia a antimicrobianos.....	40
Determinación de susceptibilidad antimicrobiana (MIC).....	40
Detección de elementos genéticos móviles.....	41
Detección de proteínas asociadas a la virulencia.....	41
Resultados y discusión.....	42
Aislamiento de bacterias resistentes a antimicrobianos.....	42

Caracterización molecular de colonias seleccionadas resistentes a múltiples antimicrobianos.....	44
Cepa JVH47.....	47
Caracterización morfológica de la cepa <i>Exiguobacterium chiriqhucha</i> JVH47	52
Perfil de tolerancia ambiental y metabólico de la cepa <i>Exiguobacterium chiriqhucha</i> JVH47.....	53
Motilidad de la cepa <i>Exiguobacterium chiriqhucha</i> JVH47.....	58
Formación de biopelícula de la cepa <i>Exiguobacterium chiriqhucha</i> JVH47..	60
Determinación de la concentración mínima inhibitoria de JVH47 y su comparación con una cepa aislada de Cuatro Ciénegas.....	61
Predicción bioinformática del resistoma de JVH47 y especies filogenéticamente relacionadas además de una cepa de Cuatro Ciénegas.	63
Genes de resistencia a antimicrobianos asociados a elementos móviles.....	66
Viruloma de la cepa <i>Exiguobacterium chiriqhucha</i> JVH47.....	68
Conclusiones.....	70
Perspectivas.....	71
Bibliografía.....	72
Anexos.....	83
I. Medios de cultivo.....	83
II. Type Strain Genome Server.....	86
III. Gráficas de determinación de susceptibilidad antimicrobiana.....	87
IV. Reconstrucción filogenética de macrólidos fosfotransferasas.....	90
V. Proteínas de virulencia.....	91

VI. ISFinder.....	97
VII. PlasFlow.....	98
Apéndice.....	99
I. Protocolo de extracción de ADN para bacterias Gram positivas.....	99
II. Protocolo electroforesis en gel de agarosa.....	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.0. Mecanismo de acción de los beta-lactámicos.

Figura 2.0. Mecanismo de resistencia a macrólidos.

Figura 3.0. Mecanismos moleculares de la resistencia a los antimicrobianos.

Figura 4.0. Mecanismos hgt en bacterias.

Figura 5.0. Ciclo del PCR utilizando un termociclador de Applied Biosystems (GeneAmp PCR System).

Figura 6.0. Resultados del estudio de resistencia por grupo de antimicrobiano.

Figura 7.0. Presencia e integridad del ADN genómico y del producto de PCR.

Figura 8.0. Construcción filogenética a partir de las secuencias del 16S ARNr de todas las especies del género *Exiguobacterium* registradas en BLAST.

Figura 9.0. Comparación de genoma completo de las cepas JVH47, RW2, 8N y IMTB-3094 para la identidad promedio de nucleótidos (ANI).

Figura 10.0. Gráfico del genoma de la cepa RW2 utilizando Proksee.

Figura 11.0. Caracterización morfológica del aislado JVH47.

Figura 12.0. Efecto de la temperatura en la cepa JVH47.

Figura 13.0. Efecto del pH en la cepa JVH47.

Figura 14.0. Efecto de la salinidad en la cepa JVH47.

Figura 15.0. Prueba de proteasa, amilasa y hemólisis.

Figura 16.0. Motilidad de la cepa JVH47.

Figura 17.0. Contexto génico alrededor del gen *mphN*.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.0. Resumen resultados en BLAST de la cepa JVH47

Tabla 2.0. Análisis del valor de corte (ODc) para la formación de biopelícula de la cepa JVH47 y cepa P4526.

Tabla 3.0. Resumen de los resultados de determinación de susceptibilidad antimicrobiana.

Tabla 4.0. Resistoma de distintas cepas del género *Exiguobacterium*.

ABREVIATURAS

BHI: Infusión Cerebro Corazón
XLD: Xilosa, Lisina, Desoxicolato
CLED: Cistina, Lactosa Deficiente en electrolitos
LIA: Agar Hierro Lisina
VB: Verde Brillante
McC: Mac Conkey
TSI: Hierro Triple Azúcar
MS: Manitol y Sal
SyB: Sulfito y bismuto
CHL: Cloranfenicol
APR: Apramicina
SPT: Espectinomicina
STR: Estreptomicina
NEO: Neomicina
GEN: Gentamicina
KAN: Kanamicina
NAL: Ácido nalidíxico
FOX: Cefoxitina
CSN: Cicloserina
AMP: Ampicilina
ERI: Eritromicina
ThS: Tioestreptón
RIF: Rifampicina
Multi: Mezcla de todos los antimicrobianos
RAM: Resistencia a los antimicrobianos
ARG: Genes de resistencia a antimicrobianos
NCBI: National Center for Biotechnology Information
pb: Pares de bases
hgt: Transferencia genética horizontal

RESUMEN

En el 2017 se ha estimado, a nivel mundial, que al menos 700,000 personas mueren anualmente como resultado de infecciones resistentes, cifra que se prevé aumente a 10 millones de muertes anuales para el año 2050 si no se altera la trayectoria actual [8]. Por ello, trazar las rutas de diseminación de la resistencia a antimicrobianos es de vital importancia para controlar la dispersión de patógenos multirresistentes a antimicrobianos.

El desbordamiento de aguas residuales, ocasionado por fenómenos naturales y actividad humana, pone en riesgo a las comunidades que se encuentran en estrecho contacto con estos materiales. Dichas aguas contienen un alto contenido de materia fecal así como residuos de antimicrobianos y desinfectantes que actúan como una presión de selección para las bacterias ambientales y comensales presentes en ellas. Este contacto, podría contribuir en la diseminación de bacterias multirresistentes a antimicrobianos provocando incluso cambios en el resistoma intestinal humano.

En el presente trabajo, nos enfocamos en evaluar la resistencia y el resistoma de bacterias cultivables aisladas a partir de una muestra de sedimento resultado de la mezcla de aguas pluviales y residuales. Se realizó un aislamiento, caracterización y conservación de 74 colonias bacterianas. Asimismo, se evaluó su resistencia contra 14 antimicrobianos y a una mezcla de ellos, obteniéndose 26 colonias multirresistentes. Se extrajo el DNA de una de ellas, denominada JVH47 y se le realizó una caracterización microbiológica donde se incluía la tinción de Gram, determinación de límite de pH, temperatura y salinidad, movilidad, hemólisis, formación de biopelícula y presencia de amilasa como proteasa. Se realizó una caracterización molecular a nivel de género mediante la amplificación del gen 16s ARNr y su posterior secuenciación por el método de Sanger. Posteriormente, se realizó la secuenciación y alineamiento del genoma completo para identificar genes de resistencia a antimicrobianos y genes de virulencia. Una vez identificados algunos genes de resistencia se comprobaron las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC). Los patrones de resistencia fueron comparados con una cepa del mismo género pero aislada de Cuatro Ciénegas, un ambiente con poca

contaminación humana. Adicionalmente, se realizó un análisis de panresistoma en especies cercanas. Se identificó la presencia del gen *mphN* que aparentemente fue adquirido mediante un evento de transferencia horizontal de genes. Al ser una bacteria resistente a múltiples antimicrobianos y con características que la predisponen al intercambio de información génica evaluamos la presencia de factores de virulencia.

Se encontró una bacteria multirresistente con probabilidad de ser patógena que presenta un gen de resistencia diferente al del genoma central de su especie el cual pudo haberlo adquirido a través del contacto con otras bacterias o por la presión de selección que ejercen estas aguas residuales.

ABSTRACT

In 2017, it was estimated globally that at least 700,000 people die annually because of drug-resistant infections, a number projected to increase to 10 million annual deaths by 2050 if the current trajectory is not altered [8]. Therefore, mapping the pathways of antimicrobial resistance dissemination is of vital importance to control the spread of multi-drug-resistant pathogens.

The overflow of wastewater, caused by natural phenomena and human activity, poses a risk to communities in close contact with these materials. Such waters contain a high concentration of fecal matter as well as residues of antimicrobials and disinfectants that act as a selective pressure on environmental and commensal bacteria present in them. This contact could contribute to the spread of multi-drug-resistant bacteria, potentially leading to changes in the human intestinal resistome.

In this study, our focus was on evaluating the resistance and resistome of cultivable bacteria isolated from a sample of sludge resulting from the mixture of rainwater and wastewater. We isolated, characterized, and preserved 74 colonies. Additionally, we assessed their resistance to 14 antimicrobials and a mixture of them, resulting in 26 multi-drug-resistant colonies. DNA was extracted from one of them, named JVH47, and a microbiological characterization was performed, including Gram staining, pH limit determination, temperature and salinity tolerance, mobility, hemolysis, biofilm formation, and the presence of amylase as a protease. A molecular characterization at the genus level was carried out by amplifying the 16s ARNr gene and subsequent Sanger sequencing. Subsequently, complete genome sequencing and alignment were performed to identify antimicrobial resistance genes and virulence genes. Once some resistance genes were identified, minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined. Resistance patterns were compared with a strain of the same genus but isolated from Cuatro Ciénegas, an environment with low human contamination. Additionally, a pan-resistome analysis was conducted in closely related species. The presence of the *mphN* gene was identified, apparently acquired through horizontal gene transfer events. Being a multi-antibiotic-resistant bacterium

with characteristics that predispose it to gene exchange, we assessed the presence of virulence factors.

A multi-drug-resistant bacterium with a probability of being pathogenic was found, which carries a resistance gene different from the core genome of its species, possibly acquired through contact with other bacteria or due to the selective pressure exerted by these wastewater.

INTRODUCCIÓN

Microbiología ambiental y salud humana perspectiva desde una salud

Los microorganismos, incluidas las bacterias, están ampliamente distribuidos en todo el planeta y se encuentran en prácticamente todos los entornos en los que residimos. Estos organismos son increíblemente abundantes y pueden adaptarse a una amplia variedad de condiciones ambientales. Aunque muchos de estos microorganismos son inofensivos o incluso beneficiosos, algunos también pueden ser patógenos y causar enfermedades en humanos y otros seres vivos [1].

El término microbiota se utiliza para describir la comunidad de microorganismos, como bacterias, virus, hongos, entre otros; que habitan en un entorno específico. Este concepto es fundamental para comprender las complejas relaciones que existen entre los microorganismos y sus respectivos hábitats. Dentro del amplio contexto de la microbiota, se pueden identificar diferentes tipos o categorías, según el entorno en el que se encuentren. Uno de estos tipos es la "microbiota ambiental", que hace referencia a la comunidad de microorganismos presentes en el medio ambiente en general, incluyendo suelos, cuerpos de agua, aire, y otros ecosistemas naturales o creados por el ser humano [2]. Por otro lado, la "microbiota humana" se refiere a la comunidad de microorganismos que habitan en el cuerpo humano. Este término engloba los microorganismos que colonizan diversos nichos dentro del cuerpo humano, como la piel, el tracto gastrointestinal, las vías respiratorias y otros sistemas del cuerpo [2].

Las bacterias, microorganismos procariotas unicelulares, constituyen una vasta diversidad, con menos del 1% de sus especies conocidas hasta ahora, incluso se estima que un gramo de tierra puede contener hasta mil millones de bacterias, aunque esta cifra puede variar según el tipo de suelo y otros factores ambientales. Su relevancia se debe a su presencia ubicua y su función vital en una amplia gama de procesos esenciales para el equilibrio del planeta. Como ejemplo, algunas bacterias se encuentran involucradas en el proceso de degradación y detoxificación de contaminantes como el plomo y cadmio. Esto lo llevan a cabo debido a que poseen una resistencia natural, determinada por su información genética, que

incluye grupos de genes que les permiten eliminar estos metales como mecanismo de defensa por medio de procesos de precipitación, volatilización, modificación (etilación o metilación) y captura de los metales con el uso de proteínas especializadas [2].

En los últimos años se ha demostrado que los desastres naturales (geofísicos, hidrológicos, climatológicos, meteorológicos o biológicos) y los provocados por el hombre (conflictos, accidentes industriales, accidentes de transporte, degradación ambiental o contaminación), además de causar efectos sobre los humanos, alteran la población bacteriana en el área afectada. Estas alteraciones conducen a que existan nuevas interacciones ecológicas para muchas especies, incluidos los humanos, con consecuencias adversas [17]. La Sociedad Americana de Microbiología estableció en el 2021 un campo de estudio propuesto centrado en los impactos microbianos de tormentas severas y desastres naturales, al cual le denominaron como "microbiología de desastres". Este campo busca comprender cómo estos desastres naturales impulsan a la adaptación de los microorganismos ambientales, alteran las interacciones microbianas con los humanos, y cómo ambos combinados tienen implicaciones para la salud humana [18]. Además, la Organización Mundial de la Salud (OMS) promueve el concepto de "Una Salud", que se basa en el reconocimiento de que la salud de las personas está estrechamente vinculada con la salud de los animales y el entorno que compartimos [75]. Si bien "Una Salud" no es un concepto nuevo, ha adquirido una relevancia creciente en los últimos años debido a diversos cambios que han influido en las interacciones entre las personas, los animales, las plantas y nuestro entorno común. Por un lado, el crecimiento de la población humana ha llevado a una expansión hacia nuevas áreas geográficas. Esto ha resultado en un mayor contacto entre las personas y animales, tanto salvajes como domésticos, que desempeñan un papel fundamental en nuestras vidas, ya sea como fuente de alimentos, materias primas, medios de subsistencia, compañía o para otros propósitos [75]. Esta mayor proximidad entre personas y animales crea oportunidades adicionales para la transmisión de enfermedades entre ambos grupos. Por otro lado, se han producido cambios significativos en el clima y en la utilización de la tierra, como la deforestación y prácticas agrícolas intensivas. Estos cambios en las condiciones ambientales y en los hábitats pueden propiciar nuevas oportunidades para la transmisión de

enfermedades entre animales. Además, el aumento en los desplazamientos de personas, animales y productos de origen animal, impulsado por los viajes internacionales y el comercio global, ha generado la posibilidad de que las enfermedades se propaguen rápidamente a través de fronteras y a nivel mundial.

En resumen, el concepto de "Una Salud" se vuelve cada vez más relevante debido a estos factores, que modifican las dinámicas de interacción entre los seres humanos, los animales y el entorno, y crean desafíos significativos en el ámbito de la salud [75].

Los desastres naturales como los ciclones, los tsunamis, las inundaciones y los tornados traen consigo crisis de salud pública debido a que ponen a los humanos en contacto directo con microorganismos con los que de otro modo no habrían entrado en contacto ocasionando principalmente enfermedades infecciosas [19]. En el 2020, se reportó que las inundaciones afectaron a casi 35 millones de personas en todo el mundo dando como resultado la inundación de tierras las cuales en su normalidad se encuentran secas, con agua de ríos, arroyos, océanos o residuales. Como consecuencia de estas inundaciones, es que se introducen microorganismos en un entorno donde tengan la capacidad de establecer un nuevo nicho ecológico que derive a una facultad de causar enfermedades aún en años posteriores a la finalización del desastre [20].

Las aguas residuales como vía de contaminación

Las aguas residuales generalmente se conducen por sistemas de alcantarillado y son tratadas en plantas de aguas residuales para su purificación antes de su vertido sin embargo, de acuerdo con el Banco Mundial, más de 300 millones de habitantes de ciudades en Latinoamérica producen 225,000 toneladas de residuos sólidos cada día y menos del 5% de las aguas de alcantarillado de las ciudades reciben tratamiento [22]. Las inundaciones pueden conllevar a que las plantas de tratamiento o el sistema de drenaje de aguas residuales se desborden; estas aguas traen consigo impurezas procedentes de diferentes orígenes, principalmente urbano, con materia fecal e industriales, con residuos de productos químicos como pesticidas, sustancias tensoactivas (detergentes), desinfectantes, medicamentos (antimicrobianos), entre otros [21]. Con ello, las aguas residuales son una mezcla

compleja y dinámica de bacterias que provienen de diversas fuentes que están expuestas a múltiples presiones de selección. Pueden desempeñar un papel beneficioso al participar en la degradación de materia orgánica y contaminantes presentes en las aguas; sin embargo, también se encuentran presentes algunas bacterias potencialmente peligrosas para la salud y el medio ambiente. Por ejemplo, un estudio realizado por Wakelin y colaboradores realizado en mayo del 2008 puso de manifiesto cómo la continua liberación de efluentes en combinación con niveles elevados de nutrientes en el lecho de sedimentación aguas abajo de una planta de tratamiento de aguas residuales en Australia tuvo un impacto significativo en la comunidad bacteriana presente en dicho sedimento, generando un aumento notable en la diversidad microbiana [73]. En un contexto similar, se llevó a cabo una investigación en zonas rurales de Bangladesh que evidenció la contaminación antropogénica del agua subterránea extraída de pozos tubulares poco profundos, identificando la presencia de bacterias de origen fecal pertenecientes a los géneros *Shigella* y *Vibrio*. Estos hallazgos señalan claramente el potencial riesgo de contaminación fecal del entorno natural a través de efluentes generados por actividades humanas [74].

Dado el estrecho contacto entre bacterias patógenas y bacterias ambientales en el contexto de las aguas residuales, existe una posibilidad significativa de promover la transferencia de genes de resistencia a antimicrobianos y otros mecanismos de resistencia. Cabe mencionar que las plantas de tratamiento de aguas residuales son consideradas puntos críticos para la proliferación de genes de resistencia a antimicrobianos y la propagación de bacterias en el entorno [65]. La presencia de bacterias resistentes a antimicrobianos también aumenta el riesgo potencial de que estos genes sean transferidos a bacterias no resistentes. Varias bacterias ambientales tienen una predisposición a desarrollar resistencia a múltiples fármacos, y ejemplos de estas incluyen *Acinetobacter sp.*, *Aeromonas sp.* y *Pseudomonas sp.*. Estas bacterias, adaptadas a diversos y húmedos entornos, forman parte integral de las comunidades microbianas presentes en las plantas de tratamiento de aguas residuales municipales, como lo confirmó Zhang y su equipo al identificar un aumento de *Acinetobacter sp.* resistente a antimicrobianos en dichas instalaciones [58] pero otro tipo de bacterias que podrían jugar un papel en la movilización de genes de resistencia o ser patógenos han sido poco descritas.

Resistoma bacteriano a antimicrobianos

La resistencia bacteriana a antimicrobianos se refiere a la habilidad de las bacterias para sobrevivir en presencia de estas moléculas, lo que les proporciona una ventaja para adaptarse y multiplicarse en diversos entornos, incluyendo hospitales y el medio ambiente [3].

La resistencia a los antimicrobianos se define clínicamente en función de los puntos de corte de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI). La CMI es la concentración más baja in vitro de un agente antibacteriano (expresada en mg/L) que impide completamente el crecimiento visible de la cepa de prueba de un organismo; por lo tanto, una cepa más resistente tiene una CMI más alta [16].

Aunque la resistencia a los antimicrobianos es una característica natural para muchos grupos bacterianos, que se desarrolló antes de la era de los antimicrobianos [8, 9], el uso generalizado de estos medicamentos cambió de manera significativa los requisitos para la evolución y diseminación de la resistencia. El uso indebido y excesivo de antimicrobianos creó presiones de selección sin precedentes, afectando no solo a los patógenos sino también a los componentes del microbioma presente en seres humanos, animales y en el entorno [8].

Hoy en día, la resistencia a los antimicrobianos (RAM) representa un problema de gran relevancia que plantea desafíos significativos en lo que respecta a la prevención y el tratamiento efectivo de un espectro cada vez más amplio de infecciones causadas por bacterias patógenas que ya no responden a los antimicrobianos convencionales [10]. De acuerdo con el Informe sobre Amenazas por Resistencia a los Antimicrobianos en los Estados Unidos de 2019 del CDC (Informe de Amenazas por AR de 2019), se estima que se producen alrededor de 2.8 millones de infecciones resistentes a los antimicrobianos en los Estados Unidos cada año, y más de 35,000 personas fallecen como resultado de estas infecciones [10].

Las bacterias pueden desarrollar resistencia a antimicrobianos de forma natural o adquirirla a través de mutaciones o por transferencia horizontal de genes, un proceso que suscita preocupación debido a la posibilidad de que estos genes se propaguen entre bacterias del entorno, en la flora habitual del cuerpo o en bacterias patógenas. Esto, a su vez, puede resultar en infecciones intratables debido a la

resistencia a múltiples antimicrobianos. A raíz de esta problemática, la resistencia bacteriana se clasifica de varias maneras en función de sus características y origen. En general, se dividen en tres categorías principales [5]:

Resistencia natural o intrínseca: Es la resistencia que algunas especies bacterianas presentan de forma inherente debido a características genéticas o estructurales específicas de su grupo. Estas bacterias son naturalmente resistentes a ciertos antimicrobianos como por ejemplo debido a que presentan una falta del blanco. Este tipo de resistencia es la que una bacteria ya presenta antes de haber estado expuesta a un antimicrobiano particular. Como ejemplo, las bacterias Gram negativas a menudo son resistentes a los antimicrobianos beta-lactámicos como la penicilina y la amoxicilina debido a que cuentan con la presencia de una membrana externa que dificulta la penetración de estos [76].

Resistencia adquirida: Se refiere a la resistencia que una bacteria adquiere a lo largo del tiempo mediante la ganancia de genes a través de procesos de transferencia horizontal de material genético o a través de mutaciones. Esto significa que una bacteria que originalmente era susceptible a un antimicrobiano puede volverse resistente después de haber estado expuesta a ese mismo antimicrobiano, a otro de la misma categoría o con mecanismos de acción similares.

La resistencia adquirida a los antimicrobianos a través de la transferencia horizontal de genes es un fenómeno por el cual las bacterias obtienen genes de resistencia de otras bacterias, incluso de diferentes especies. Esto puede ocurrir a través de diversos mecanismos, como la conjugación, la transformación y la transducción [67].

La resistencia adquirida a los antimicrobianos debido a mutaciones es un fenómeno en el que las bacterias desarrollan la capacidad de resistir la acción de un antibiótico específico a través de cambios en su material genético. Estas mutaciones pueden afectar a genes que codifican las proteínas de las bacterias o las enzimas responsables de la acción del antibiótico. A medida que las bacterias se reproducen y transmiten su material genético a las generaciones posteriores, las mutaciones pueden persistir y acumularse, lo que conduce a una población de bacterias resistentes. Esto puede ocurrir de manera espontánea en condiciones naturales, pero también puede ser inducida por la exposición repetida a dosis subletales del

antimicrobiano. Esto crea una presión selectiva que favorece el crecimiento de bacterias que han adquirido mutaciones de resistencia [77].

La resistencia adaptativa: También conocida como resistencia fenotípica, se presenta cuando las bacterias que originalmente son sensibles a los antimicrobianos adquieren temporalmente resistencia. Este tipo de resistencia implica una adaptación en términos de características observables cuando las bacterias se enfrentan a situaciones de estrés, y una de sus particularidades es que no es uniforme en toda la población bacteriana. Los mecanismos involucrados en esta adaptación fenotípica pueden comprender la detención del crecimiento, la variabilidad en la expresión de genes y procesos que resultan de combinaciones estocásticas. Ejemplos típicos de esta forma de resistencia incluyen la formación de células persistentes, la adaptación al enjambre y la creación de biopelículas.

Las células persistentes se refieren a una subpoblación de bacterias que exhiben una menor susceptibilidad a los antimicrobianos en el seno de una población clonal susceptible, es decir, genéticamente idéntica. Estas células emergen como resultado de una variación fenotípica no heredable, que se debe principalmente a un crecimiento lento o a la detención de este, lo que conlleva a una menor absorción de antimicrobianos o a una disminuida actividad sobre su blanco específico [21]. Las células persistentes son las responsables de la aparición de infecciones recurrentes [22] y del surgimiento de la resistencia a los antimicrobianos [23].

Asimismo, ciertas bacterias tienen la capacidad de soportar la presencia de antimicrobianos a través de la activación de su movilidad [24]. El fenómeno de enjambre implica la necesidad de una migración rápida y coordinada de células altamente especializadas en enjambre, las cuales son alargadas y poseen múltiples flagelos. El enjambre constituye un comportamiento colectivo que exige que las células de enjambre permanezcan en estrecho contacto y se desplacen de manera concertada, siendo que su funcionamiento depende en gran medida de la presencia de flagelos y de la densidad poblacional [13, 14].

Mecanismos moleculares de resistencia a antimicrobianos

Los antimicrobianos son moléculas, en su mayoría, derivadas de compuestos naturales que ocasionan la muerte bacteriana a través de una variedad de mecanismos, los cuales varían según la naturaleza de cada antibiótico. Por ejemplo, los antimicrobianos beta-lactámicos, como la penicilina, actúan interfiriendo con la síntesis de la pared celular bacteriana. No obstante, las bacterias han evolucionado para desarrollar una serie de mecanismos (Ver Figura 3.0.) para eludir o contrarrestar los efectos de los antimicrobianos cuyos mecanismos se describen detalladamente a continuación [67]:

1. Inactivación de los antimicrobianos: Las bacterias a menudo producen enzimas, que pueden descomponer o modificar a los antimicrobianos antes de que estos lleguen a su blanco y tengan la oportunidad de ejercer su acción. Un ejemplo de ello son las beta-lactamasas, las cuales tienen la capacidad de modificar o romper la estructura de las penicilinas y las cefalosporinas, que contienen un anillo químico llamado "beta-lactámico". Esta modificación del antimicrobiano impide que este último se una y se enlace de manera efectiva a su objetivo dentro de la bacteria, la cual es una enzima llamada "transpeptidasa", necesaria para la construcción de la pared celular bacteriana. (Ver Figura 1.0.) Por lo tanto, cuando las beta-lactamasas alteran las penicilinas u otros antimicrobianos relacionados, estos ya no pueden inhibir la actividad de la transpeptidasa y, en consecuencia, la bacteria conserva su capacidad para sintetizar y fortalecer su pared celular. Esto hace que el antimicrobiano sea ineficaz contra esa bacteria en particular [4].

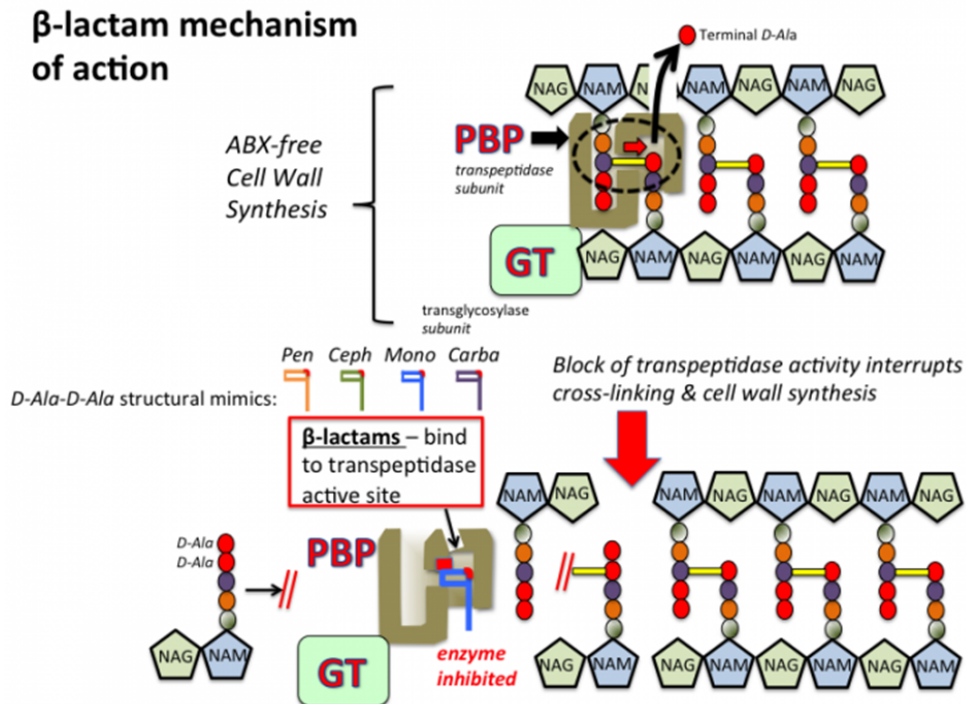


Figura 1.0. Mecanismo de acción de los beta-lactámicos [78]. Estos antimicrobianos se unen a proteínas llamadas proteínas de unión a penicilina (PBP por sus siglas en inglés), que son enzimas involucradas en la síntesis de la pared celular. Al unirse a las PBP, los beta-lactámicos impiden la formación de enlaces cruzados entre las cadenas de peptidoglicano, una parte esencial de la pared celular bacteriana.

2. Alteración del sitio blanco: Este mecanismo de resistencia se basa en una adaptación genética de las bacterias, donde estas desarrollan cambios estructurales en el sitio blanco al cual se une el antimicrobiano. El sitio blanco es la región específica en la bacteria que el antimicrobiano debe atacar para ejercer su efecto antibacteriano. Cuando las bacterias modifican el sitio blanco, lo hacen de manera que el antimicrobiano ya no puede unirse con la misma afinidad o efectividad que antes. Esto significa que el antimicrobiano pierde su capacidad para inhibir la función normal del sitio blanco y, como resultado, la bacteria puede sobrevivir y reproducirse sin verse afectada por el antimicrobiano. Como ejemplo de este tipo de resistencia son los macrólidos, los cuales representan una clase de antimicrobianos que funcionan al unirse a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano. (Ver Figura 2.0) Esta unión normalmente inhibe la síntesis de proteínas en las bacterias, lo que resulta en su muerte o inhibición de crecimiento. Sin embargo, algunas bacterias, han desarrollado resistencia a los macrólidos mediante mutaciones que cambian

sutilmente la estructura del ribosoma de la bacteria, de tal manera que los macrólidos ya no pueden unirse al sitio diana con la misma eficacia. Como resultado, los macrólidos pierden su capacidad para inhibir la síntesis de proteínas en estas bacterias específicas [7].

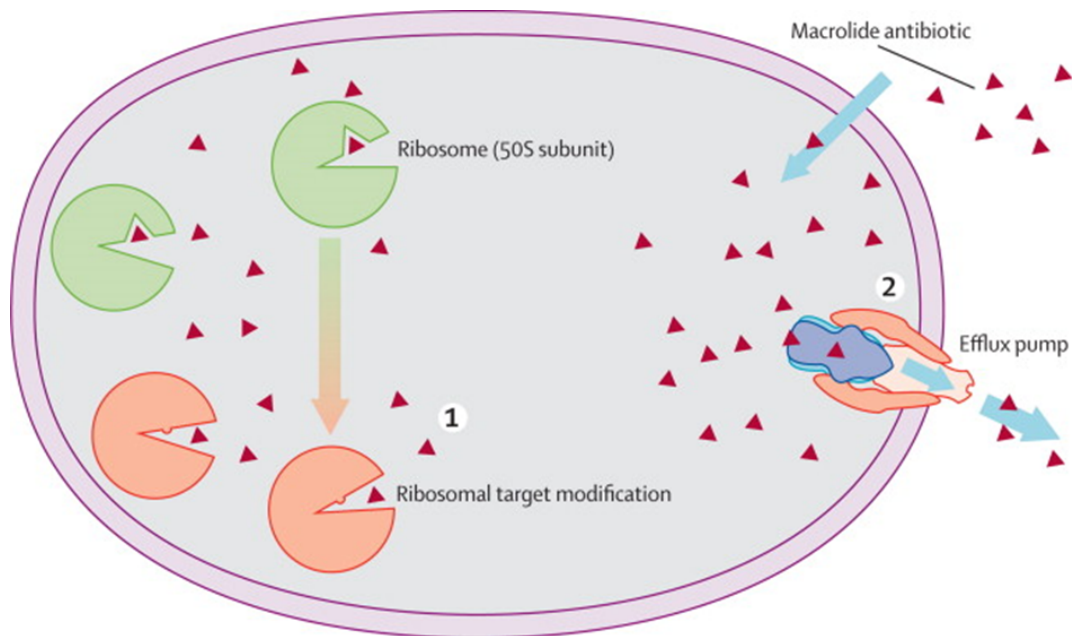


Figura 2.0. Mecanismo de resistencia a los macrólidos[79]. La resistencia a los macrólidos ocurre cuando las bacterias modifican su ribosoma o los expulsan por medio de bombas, reduciendo así la efectividad de estos medicamentos.

3. Derivación del blanco: En este mecanismo, las bacterias pueden desarrollar proteínas alternativas que realizan funciones similares a las del sitio blanco original del antimicrobiano. Este nuevo blanco no es necesariamente una modificación directa del sitio blanco original. Como resultado, el antimicrobiano se une a estas proteínas en lugar de su objetivo previsto, lo que limita su capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano. Un ejemplo es la resistencia a la estreptomicina, donde algunas bacterias desarrollan una proteína alterna que cumple con las características del ribosoma, objetivo de la estreptomicina. En este caso, el antimicrobiano se une a la proteína alterna en lugar del ribosoma, lo que permite que la bacteria continúe con su síntesis de proteínas [4].

4. Disminución del influjo: Algunas bacterias pueden disminuir la cantidad de antimicrobianos que ingresan a su interior a través de diversos procesos y

adaptaciones. Uno de los procesos comunes involucrados en la disminución del influjo es la disminución de la permeabilidad de la membrana celular. Las bacterias pueden alterar su membrana externa de manera que sea más difícil para los antimicrobianos atravesarla. Esto puede incluir la reducción del tamaño de los poros en la membrana o la modificación de las proteínas transportadoras que facilitan el ingreso de sustancias, como los antimicrobianos. Como ejemplo de este tipo de resistencia, se encuentra la resistencia a los betalactámicos en ciertas bacterias Gram-negativas. Estas bacterias pueden desarrollar porinas que tienen un tamaño reducido o están bloqueadas, lo que limita la entrada de los betalactámicos a través de la membrana externa [4].

5. Flujo de salida activo: En este mecanismo, las bacterias desarrollan sistemas de transporte especializados que expulsan activamente los antimicrobianos fuera de la célula después de que estos hayan ingresado. De esta manera, estas pueden desarrollar proteínas transportadoras específicas, conocidas como bombas de eflujo, que reconocen y expulsan los antimicrobianos fuera de la célula contra un gradiente de concentración. Un ejemplo bien conocido de flujo de salida activo es la resistencia a los antimicrobianos del grupo de las fluoroquinolonas en bacterias como *Escherichia coli*. Estas bacterias pueden poseer bombas de eflujo que expulsan activamente las fluoroquinolonas fuera de la célula, lo que reduce significativamente la concentración intracelular de estos antimicrobianos y, en consecuencia, su efectividad [7].

6. Protección del blanco: En algunos casos, las bacterias pueden producir proteínas o moléculas específicas que se unen al sitio blanco del antimicrobiano, bloqueando su acceso o reduciendo su afinidad por ese objetivo. Esto protege al blanco y limita la eficacia del antimicrobiano. Es especialmente común en el caso de los antimicrobianos que tienen como objetivo a componentes específicos de la célula bacteriana, como enzimas o proteínas esenciales. Como es el caso de los antimicrobianos que actúan sobre ribosomas bacterianos, como los aminoglucósidos y los macrólidos. Algunas bacterias pueden producir proteínas protectoras que se unen a los ribosomas y evitan que los antimicrobianos se unan y ejerzan su acción [4].

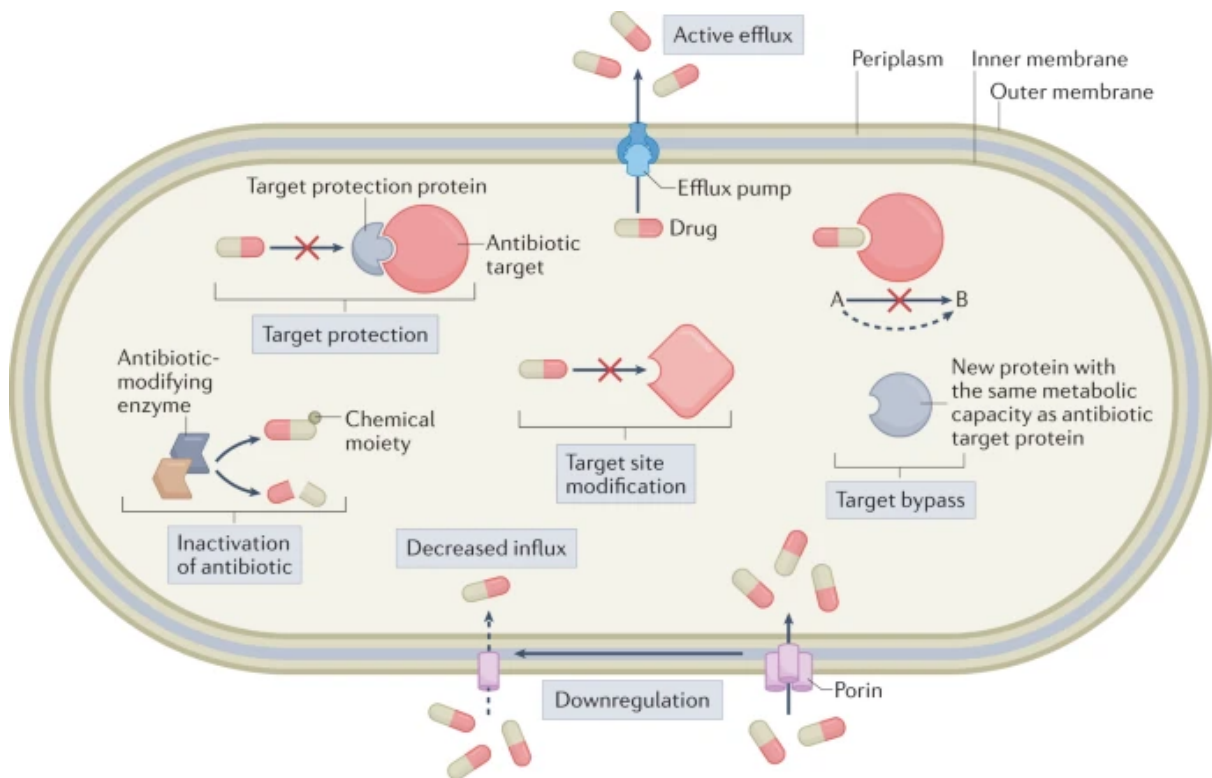


Figura 3.0. Mecanismos moleculares de la resistencia a los antimicrobianos [67]. La resistencia a los antimicrobianos ocurre cuando las bacterias modifican sus objetivos, producen enzimas inactivadoras, expulsan los fármacos o presentan cambios genéticos para sobrevivir a los tratamientos.

Mecanismos de transferencia horizontal de genes en bacterias

La resistencia adquirida, en su mayoría, se basa en la adquisición de información genética adicional a través de mecanismos de transferencia horizontal de genes (HGT). (Ver Figura 4.0) Estos mecanismos permiten que las bacterias adquieran nuevos genes de resistencia de otras bacterias, incluso de especies diferentes. Además de estos mecanismos de transferencia horizontal de genes, la resistencia adquirida también puede resultar de mutaciones en genes específicos del cromosoma bacteriano.

Los principales mecanismos de transferencia horizontal de genes involucrados en la resistencia a los antimicrobianos son [11]:

Transformación: La transformación es un proceso mediante el cual una bacteria toma fragmentos de ADN directamente del entorno que la rodea. Esto puede incluir

material genético de bacterias que han muerto y liberado su ADN en el entorno. Si el ADN capturado contiene genes de resistencia a los antimicrobianos, la bacteria receptora puede integrar estos genes en su propio genoma.

Transducción: La transducción es un proceso que involucra la transferencia de material genético de una bacteria a otra a través de virus bacteriófagos. Esta forma de transferencia de genes contribuye a la diversidad genética en poblaciones bacterianas, así como a la adquisición de características beneficiosas o incluso de genes de resistencia a los antimicrobianos.

Conjugación: La conjugación es un proceso en el que las bacterias pueden transferir material genético directamente de una célula a otra mediante la formación de un puente de conjugación, que es un tubo de conexiones formado por un pilus. A través de este tubo, se transfiere una copia del plásmido, que puede llevar genes de resistencia, de una célula a otra.

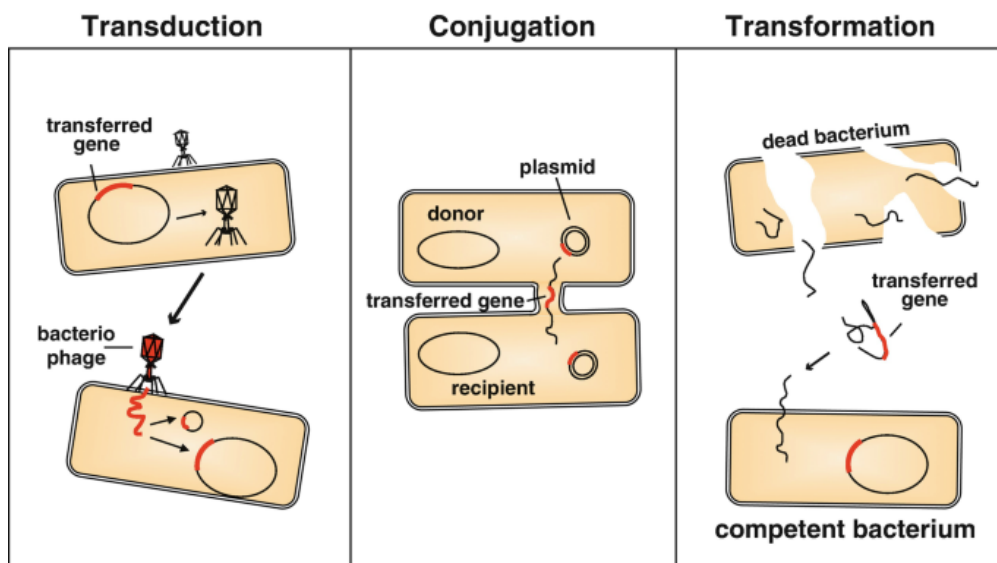


Figura 4.0. Mecanismos hgt en bacterias [80].

La información genética que se transfiere a través de los mecanismos de transferencia horizontal de genes frecuentemente se aloja en elementos genéticos móviles (EGM). Algunos ejemplos de elementos genéticos móviles son [12]:

1. Plásmidos: Son la vía más común para la transferencia de material genético. Estos son pequeños fragmentos de ADN circular que pueden replicarse de manera independiente del cromosoma bacteriano.

2. Integrones: Los integrones son secuencias de ADN que pueden capturar, expresar y movilizar genes de resistencia. Están formados por una plataforma de integración y una región llamada "casete de resistencia". Los integrones pueden integrar genes de resistencia en su estructura y luego transferirlos a otros plásmidos o al cromosoma bacteriano. Esto les permite acumular y transmitir rápidamente genes de resistencia a diferentes antimicrobianos.

3. Transposones: Los transposones son secuencias de ADN que tienen la capacidad de moverse dentro del genoma bacteriano o entre plásmidos y el cromosoma. Pueden contener genes de resistencia y, cuando se activan, se pueden escindir de su ubicación original y reinsertarse en otra parte del ADN bacteriano. Esto facilita la dispersión de genes de resistencia a través de la población bacteriana.

4. Islas genómicas: Las islas genómicas son segmentos de ADN más grandes que pueden integrarse en el cromosoma bacteriano. Estas islas pueden contener una variedad de genes, incluyendo aquellos relacionados con la resistencia a los antimicrobianos. Cuando una isla genómica que contiene genes de resistencia se integra en el genoma de una bacteria, mediante procesos que pueden involucrar la recombinación específica, la participación de elementos móviles como transposones o integrones, o enzimas específicas; puede proporcionarle una resistencia adicional a los antimicrobianos [25].

En conjunto, estos elementos genéticos móviles, como los plásmidos, integrones, transposones e islas genómicas, permiten que las bacterias adquieran y compartan genes de resistencia de manera eficiente. Esto contribuye a la propagación de la resistencia a los antimicrobianos entre diferentes bacterias [20].

ANTECEDENTES

Estudios han demostrado que la Ciudad de México sufre de una continua degradación y pérdida del acuífero subyacente con una tasa de hundimiento de 300 mm por año [54] que entre sus consecuencias, sumado a una deficiencia en el sistema de drenaje, se encuentra una mayor incidencia de inundaciones.

El grupo de la Dra. Alba I Romero Rodríguez, se dedica al estudio de la resistencia a antimicrobianos en comensales y patógenos intestinales así como en muestras ambientales contaminadas por actividad humana (p. ej. descarga de drenajes). En el año 2021 se recolectó una muestra de sedimento producto de inundaciones urbanas en la alcaldía Tlahuac, Ciudad de México.

JUSTIFICACIÓN

El vertido de aguas residuales en las comunidades (asentamientos urbanos) afecta a los microbiomas presentes en los suelos, agua, e incluso animales y humanos. Las presiones de selección encontradas en las aguas residuales podrían favorecer la supervivencia de bacterias con mecanismos de resistencia a antimicrobianos y desinfectantes, así como el intercambio de información génica. Si la movilización de genes de resistencia ocurre en patógenos o patógenos oportunistas de humanos o animales podrían ocurrir infecciones asociadas a bacterias multirresistentes. En este proyecto evaluamos la resistencia de bacterias aisladas de una muestra de sedimento extraída de inundaciones en la Ciudad de México y analizamos el potencial patogénico de una bacteria multirresistente.

HIPÓTESIS

Las bacterias aisladas a partir de un sedimento colectado tras la liberación de aguas residuales con agua pluvial tendrán genes de resistencia a antimicrobianos, a agentes desinfectantes, así como varios mecanismos de resistencia, como la capacidad de movilización, donde algunos de estos genes pueden estar alojados en elementos genéticos móviles.

OBJETIVOS

Objetivo general.

Caracterizar fenotípica y molecularmente bacterias aisladas a partir de una muestra de sedimento obtenida después de una inundación con aguas residuales en la Ciudad de México para la búsqueda de genes de resistencia a antimicrobianos movilizables.

Objetivos particulares.

1. Aislamiento de bacterias a partir de una muestra de sedimento.
2. Selección de bacterias resistentes a múltiples antimicrobianos.
3. Caracterización microbiológica de bacterias multirresistentes.
4. Amplificación de gen ARN ribosomal 16S para identificación taxonómica.
5. Secuenciación del genoma completo de un aislado de interés.
6. Predicción de genes de resistencia a antimicrobianos y elementos móviles.
7. Determinación de susceptibilidad antimicrobiana bajo estándares internacionales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Biológico

Muestra

En agosto de 2021 se recolectó una muestra de sedimento en la alcaldía Tláhuac, Ciudad de México. La muestra fue obtenida después de una descarga de aguas residuales en la comunidad derivado del desbordamiento del sistema de drenaje ocasionado por precipitación pluvial. El sedimento es una mezcla compleja cuya composición exacta se desconoce pero que puede incluir tierra, basura y materia orgánica. La muestra se mantuvo en congelación hasta su uso.

Métodos

Cepas y condiciones de cultivo bacteriano

La muestra se descongeló, se pesó y se homogeneizó para posteriormente realizar diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-8} de la muestra de sedimento (0.01 g/mL) en medio BHI. Se tomó de referencia hasta la dilución 10^{-3} para sembrar masivamente en los distintos medios diferenciales y selectivos (XLD, CLED, LIA, VB, McC, TSI, MS y SyB) aislandose una colección morfológicamente diversa de bacterias (Ver Anexo I). Los aislamientos se procedieron a examinar durante 24 horas a 25 °C en placas de selección con estreptomina (8 µg/mL), gentamicina (16 µg/mL), kanamicina (32 µg/mL), espectinomicina (128 µg/mL), neomicina (16 µg/mL), apramicina (32 µg/mL), tiostreptón (10 µg/mL), cloranfenicol (32 µg/mL), ácido nalidíxico (32 µg/mL), rifampicina (32 µg/mL), cicloserina (10 µg/mL), cefoxitina (32 µg/mL), ampicilina (32 µg/mL), por separado y en conjunción a la cual se le denominó multi. Las colonias resistentes se almacenaron en caldo BHI con glicerol al 25% a -80°C. Se seleccionó la cepa JVH47 para estudios adicionales.

Caracterización microscópica

Las evaluaciones microscópicas se llevaron a cabo mediante tinciones de Gram que fueron observadas en un microscopio óptico Carl Zeiss de campo claro. Se determinó tamaño, forma y agrupación.

Caracterización morfológica

La evaluación morfológica se llevó a cabo en medio BHI tomando en cuenta su tamaño, forma, consistencia, textura, superficie, comportamiento con respecto a la luz y color.

Medio de cultivo para la cepa JVH47

Se llevó a cabo una evaluación del crecimiento del aislado JVH47 en diversos medios de cultivo, con el propósito de que nos permitiera ajustar la cantidad de NaCl y modificar el pH. Durante la estancia de Karen Santos, se implementó el medio EM (medio para *Exiguobacterium*) diseñado específicamente para el crecimiento de esta bacteria.

Determinación de los límites de temperatura, pH y salinidad

Una colonia aislada de la cepa JVH47 se inoculó en 2 mL de caldo EM que contenía (5 %, p/vol) NaCl, (3 %, p/vol) extracto de levadura, (2 %, p/vol) glucosa, (2.5 %, p/vol) fosfato de sodio dibásico anhidro, (16 %, peso/vol) peptona de caseína, y se cultivó durante la noche a 25 °C. Para el crecimiento a diferentes pH, temperaturas y concentraciones de NaCl, del cultivo se tomaron 500 µL y se diluyeron en 5 mL de medio EM y se incubó a 37 °C durante 40 min con agitación a 100 rpm hasta una DO_{600} de 0.1 utilizando un espectrofotómetro eppendorf BioPhotometer plus. Posteriormente, se inocularon 3 mL de la suspensión del cultivo celular en un matraz Erlenmeyer de 125 mL con 30 mL de caldo exiguo. El crecimiento microbiano se controló midiendo la DO_{600} cada 24, 48 y 72 horas sin agitación se evaluó el efecto del pH y NaCl, mientras que con agitación a 100 rpm se evaluó el efecto de la

temperatura. Para todas las condiciones, la DO_{600} del medio exiguo se usó como blanco y los tres ensayos se realizaron por triplicado. Las determinaciones basadas en la temperatura se realizaron a 0, 4, 25, 30, 37, 40, 45 y 55 °C; las determinaciones basadas en el pH, a 37 °C en pasos de 1 unidad desde pH 4,0 a pH 11,0 utilizando tampón citrato- Na_2HPO_4 (pH 4.0 a 7.0), tampón Tris (pH 7.5 a 9.0) y tampón $NaHCO_3$ - Na_2CO_3 (pH 9.5 a 11.0); y las evaluaciones de salinidad a 0, 0.5, 2, 3, 5, 7 % de NaCl a 37 °C.

Ensayo de movilidad, hemólisis y amilasa/proteasa.

Para los ensayos de movilidad, hemólisis y amilasa/proteasa se utilizó una colonia aislada, cultivada durante 24 h para sembrar las placas que contenían medio EM con (0.3 %, p/vol) de agar para evaluar la movilidad, agar sangre con (5 %, p/vol) de sangre de carnero para capacidad hemolítica y agar EM suplementado con leche descremada (2 %, p/vol) y almidón (0.4 %, p/vol) para el ensayo de amilasa/proteasa. Se determinó que una reacción era positiva cuando las zonas transparentes eran fácilmente visibles alrededor de las colonias para determinar hemólisis o detectadas después de la coloración con solución de yodo de Lugol para amilasa/proteasa y un crecimiento extendido alrededor del punto de siembra que se encuentra en el medio de la placa para movilidad.

Formación de biopelícula

El ensayo de biopelícula se realizó cultivando una colonia aislada, para cada cepa probada, durante toda la noche a 37°C en medio exiguo. Se centrifugó a 7000 rpm por 5 minutos y el pellet se resuspendió en 5 mL de etanol al 70 % y se incubó a 37°C hasta alcanzar una DO_{600} de 0.1. Posteriormente, 300 μ L de las suspensiones bacterianas, así como de medio exiguo, se transfirieron a pocillos de placas de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos estériles, por triplicado. La placa se incubó durante 72 h a 37°C, pasado este tiempo se lavó 2 veces con agua destilada estéril suavemente y se tiñó con cristal violeta al 1 % durante 45 min a oscuridad. Los pocillos se lavaron dos veces con agua desionizada estéril y se secaron. El tinte cristal violeta unido a las células adherentes se resuspendió en 200 μ L de etanol al 95 % y se transfiere la suspensión colorada a otra placa. Las lecturas de DO de los

pocillos respectivos se determinaron a 595 nm y cada ensayo se determinó tres veces. La DO_{595} media de los pocillos no inoculados que contenían el medio se resta de la DO de los pocillos de prueba y se determinan los valores medios de la DO_{595} por cepa. La formación de biopelícula se clasificó como negativa, débil, moderada o fuerte. El valor de corte (ODc) se definió como el valor medio de OD por encima de tres desviaciones estándar (SD) del control negativo: $ODc = OD \text{ promedio del control negativo} + (3 \times SD \text{ del control negativo})$. Cada aislamiento se clasificó de la siguiente manera: $OD < ODc =$ no productores de biopelícula (categoría 0); $ODc < OD < 2ODc =$ productores de biopelículas débiles (categoría 1); $2ODc < OD < 4ODc =$ productores moderados de biopelícula (categoría 2); y $OD > 4ODc =$ fuertes productores de biopelículas (categoría 3) [49].

Microscopio Electrónico de Transmisión

El ensayo de microscopía electrónica de transmisión (TEM) se realizó en el laboratorio del Dr. Horacio Merchant Larios colocando un cultivo overnight de la JVH47 a una temperatura de 25 °C para posteriormente, lavarlas con agua ultra purificada para eliminar cualquier contaminante. Se resuspendieron las células hasta obtener una densidad óptica OD_{600} igual a 0.5 y se transfirieron 10 μ L de la suspensión a una rejilla de carbón recubierto de níquel. Se dejó la muestra reposar en la rejilla durante un periodo de 10 minutos y se procedió a secar la muestra utilizando un proceso que involucra drenar el exceso de líquido con papel filtro y permitir que se seque al aire. Una vez seca la muestra, se observó en el microscopio electrónico de transmisión operando a una energía de 80 kV.

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó mediante el protocolo de extracción para Gram positivo, que consiste en centrifugar un cultivo durante la noche durante 5 min a 8000 rpm. Se resuspendió en 250 μ L de tampón TES y 50 μ L de lisozima (10 mg/mL). El tubo se dejó incubando a 37°C por 30 min y luego se agregaron 60 μ L de SDS al 10 % y 5 μ L de proteinasa K (20 mg/mL). Se dejó otra incubación por 20 min a 55°C y se procedió a una extracción con fenol-cloroformo. Posteriormente se adicionó 1/10 de volumen de NaCl 5 M y 1 mL de etanol absoluto frío, incubando a

-20°C por 15 min. Se centrifugó por 10 min a 14,000 rpm y se lavó con etanol al 70 %, centrifugando nuevamente por 10 min a 14,000 rpm. Finalmente se secó a temperatura ambiente y se le añadieron 30 µL de H₂O con 4 % de ARNasa para almacenarlo a 4 °C.

Amplificación del gen 16S ARNr y alineamiento BLAST

El gen 16S ARNr se amplificó por PCR utilizando un conjunto de cebadores de oligonucleótidos con la siguiente secuencia 16S ARNr For (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') y 16S ARNr Rev (5'-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3') con un tamaño de amplicón de 1500 pb. El programa de PCR se configuró en un termociclador a 94 °C durante 2 min, seguido de 25 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, hibridación a 60 °C durante 30 s, extensión a 72 °C durante 1 min, seguido de extensión final a 72 °C durante 5 min. Las concentraciones óptimas de reactivos de PCR fueron 0,2 mM de cada dNTP, 1,0 µM de cada cebador, solución de MgCl₂ 4,0 mM, 1,25 U Taq polimerasa, 1 µL de plantilla de ADN y 1x tampón. El tubo se colocó en un termociclador de Applied Biosystems (GeneAmp PCR System) y el programa de PCR se ejecutó como se mencionó anteriormente.

El amplicón se precipitó con 1/10 de NaCl 5 M y 2x de etanol absoluto, luego se visualizó con el uso de agarosa al 1.2 % para electroforesis. Se realizó una secuenciación Sanger en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y se alinearon los resultados utilizando BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) empleando bases de datos estándar y secuencias altamente similares (megablast).

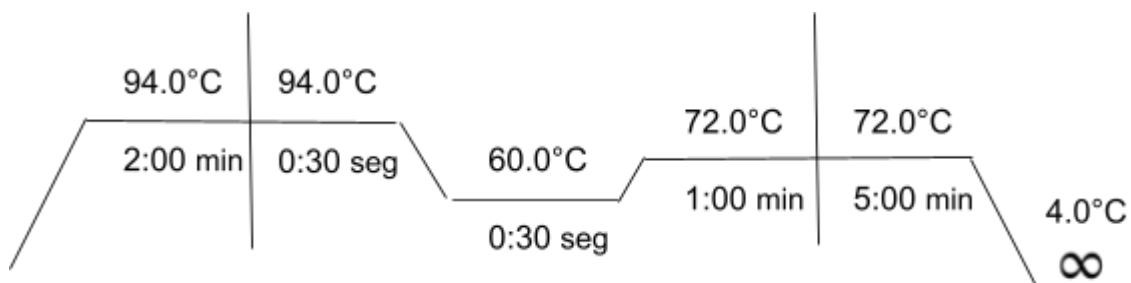


Figura 5.0. Ciclo del PCR utilizando un termociclador de Applied Biosystems (GeneAmp PCR System).

Ensamble de genoma completo

El ADN genómico extraído se usó para la secuenciación del genoma completo en una plataforma Illumina HiSeq 2000 en Seqcenter. Las bibliotecas de muestras se prepararon con el kit Illumina DNA Prep y los índices UDI de 10 pb de IDT, y se secuenciaron en un Illumina NextSeq 2000, produciendo lecturas de 2x151 pb. Se realizó demultiplexación, control de calidad y recorte del adaptador con bcl-convert (v3.9.3) obteniendo un 91.381 % pb > Q30. Las lecturas de mala calidad se filtraron utilizando el software Trimmomatic 0.36. Se utilizaron lecturas con puntuaciones de calidad de secuenciación superiores a 28 y longitudes superiores a 36 pb para el ensamblaje *de novo* de lecturas de Illumina con SPAdes (v3.13.1) con tamaños de k-mer de 21, 33, 55 y 77.

Construcción de filogenias

La secuencia del gen 16S ARNr se extrajo del ensamblaje del genoma completo usando ContEst16S [27], luego las secuencias de genes 16S ARNr de las 21 cepas tipificadas de *Exiguobacterium spp.* se descargaron de NCBI y 3 cepas tipificadas de *Bacillus spp.* como exogrupos. Estas secuencias se alinearon usando MUSCLE con configuraciones predeterminadas para hacer una reconstrucción de filogenia a través del método de máxima verosimilitud con 1000 de arranque usando configuraciones MEGA.

Adicionalmente, el ensamble de JVH47 también fue analizado en la plataforma Type (Strain) Genome Server (TYGS) que combina información importante sobre las especies con herramientas de análisis genómico avanzado en una configuración de alto rendimiento para crear representaciones filogenéticas basadas en datos genómicos básicos (GBDP) a escala genómica y la secuencia del gen 16S ARNr. Esto con la finalidad de confirmar la identidad al nivel género y especie del aislado.

Identidad de Nucleótidos Promedio (ANI)

Se realizó una identidad de nucleótidos promedio (ANI) con las cepas JVH47, 8N, IMTB-3094, and RW2 usando el genoma completo reportado en GenBank que corresponde a los siguientes accesos GCA_025234665.1, GCA_025234795.1,

GCA_000416965.1, respectivamente. Debe de existir una similitud mayor al 95-96% con uno o ambos métodos (MUMer o blast) y también se debe realizar el análisis de tetranucleótidos (TETRA) con un valor mayor al 99% (Richter & Roselló-Mora 2009) para determinar si pertenecen a la misma especie.

Anotación del genoma completo

Se anotó el genoma utilizando Prokka (v1.14.6) con los parámetros predeterminados para bacterias Gram-positivas. También se utilizó Proksee para visualizar la anotación de Prokka y predecir marcos de lectura abiertos (ORF) del genoma ensamblado con parámetros predeterminados como el contenido/sesgo de GC y los resultados de BLAST con la cepa RW-2.

Detección de genes de resistencia a antimicrobianos

La detección de genes de resistencia a antimicrobianos fue llevada a cabo por medio de RGI [26] ya que es capaz de predecir resistomas a partir de datos de proteínas o nucleótidos basados en modelos de homología y sustituciones de un nucleótido (SNP) y ABRicate [51] que compara las secuencias genéticas en bases de datos con las secuencias genómicas de interés. Se empleó el ensamblado en contigs obtenido de SPAdes.

Determinación de susceptibilidad antimicrobiana (MIC)

Se probaron un total de 6 antimicrobianos: penicilina (0.12-512 µg/mL), eritromicina (0.12-512 µg/mL), tetraciclina (0.12-512 µg/mL), ciprofloxacino (0.12-512 µg/mL), cloranfenicol (0.12-512 µg/mL) y estreptomina (0.12-512 µg/mL). Las placas AG ADVANGENE de 96 pocillos precargadas con caldo Mueller-Hinton catión ajustado y los antimicrobianos, se utilizaron para la prueba de microdilución en caldo. Se prepararon pre-inóculos de aislamientos de la cepa JVH47 a partir de cultivos durante la noche. En tubos limpios con 10 mL de agua destilada estéril, se adicionaron alícuotas de 200 µL del microorganismo hasta alcanzar visualmente una turbidez de 0.5 del estándar de McFarland (1.5×10^8 CFU/mL) y una OD₆₀₀ de 0.1 para posteriormente dispensar 100 µL por pocillo en la placa de microtitulación.

Cada placa incluía un control positivo (sin antimicrobiano añadido) y un control negativo (solo caldo MH, sin cultivo agregado). Las placas inoculadas se incubaron a 35°C durante 24 h con agitación a 100 rpm y observadas a una OD₆₀₀ en un Cytation3 Reader (v.3.04.17). Las CIM de las cepas se determinaron con base a las pautas y recomendaciones del CLSI M100-M02/M07 (Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio) [34].

Detección de elementos genéticos móviles

Se realizó la búsqueda del gen de resistencia a los macrólidos (*mphN*) dentro del genoma completo de la cepa JVH47. Los datos obtenidos se cargaron en tres bases de datos específicas:

ISFinder: Es una base de datos especializada en la identificación y clasificación de secuencias de inserción (IS) [66].

PlasFlow: Herramienta que se utiliza para identificar plásmidos en secuencias genéticas.

Detección de proteínas asociados a la virulencia

La detección de genes de virulencia fue llevado a cabo utilizando un enfoque integrado de máquina de vectores de soporte (SVM) y modelo oculto de Markov (HMM) por medio del servidor web MP3 para la predicción de proteínas patógenas [28]. Es decir, realiza una búsqueda de proteínas que se conoce que desempeñan un papel crucial en la capacidad para invadir, colonizar y dañar al organismo huésped. Se empleó el conjunto de datos de aminoácidos en el formato fasta (.faa) de la anotación en Prokka.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de bacterias resistentes a antimicrobianos

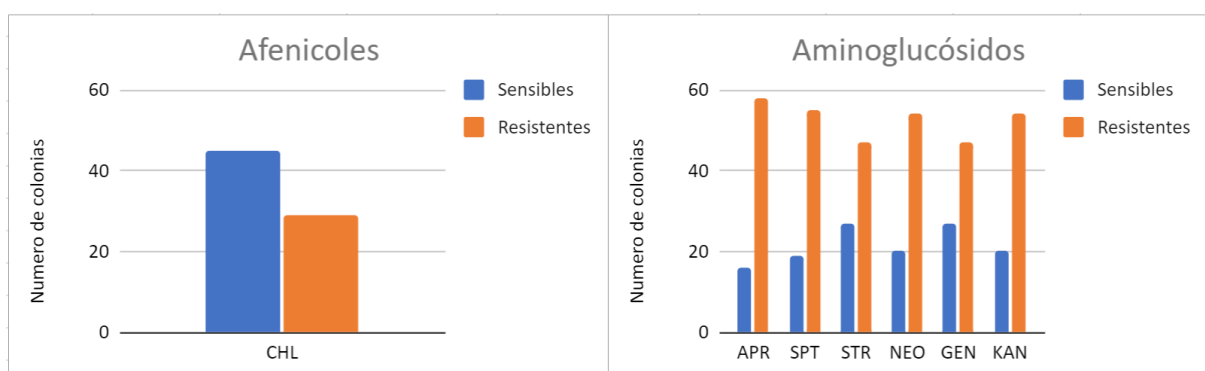
En un primer paso, se inoculó la muestra de sedimento en el medio de cultivo BHI. Para lograrlo, se efectuaron diluciones seriadas, y la dilución 10^{-3} fue seleccionada, ya que generó colonias individuales que pudieron ser cuantificadas. Posteriormente, se identificaron las bacterias resistentes a antimicrobianos mediante la selección en medio con antimicrobianos de manera individual y en combinación. Se evaluó un total de 14 antimicrobianos los cuales fueron Cloranfenicol (CHL) del grupo de los anfenicoles; Kanamicina (KAN), Gentamicina (GEN), Neomicina (NEO), Estreptomicina (STR), Espectinomicina (SPT) y Apramicina (APR) del grupo de los aminoglucósidos; Eritromicina (ERI) del grupo de los macrólidos; Tioestreptón (ThS) del grupo de los tiopéptidos, Ácido nalidíxico (NAL) del grupo de las quinolonas, Ampicilina (AMP), Cefoxitina (FOX) y Cicloserina (CSN) del grupo de los betalactámicos; y por último la Rifampicina (RIF) del grupo de las rifamicinas. De igual manera, se evaluó su resistencia a la mezcla de todos los antimicrobianos que fue denominada MR.

Se lograron aislar 74 colonias con patrones distintos de resistencia a diferentes antimicrobianos, pero al menos resistentes a un antibiótico. De los 74 aislados, 46 fueron sensibles a ampicilina (Ver Figura 6.0.). Estos resultados sugieren que alrededor del 10.8 % de colonias aisladas son sensibles al grupo de los betalactámicos los cuales inhiben la síntesis de la pared bacteriana por medio de dos mecanismos: interfiriendo en la síntesis del peptidoglicano mediante un bloqueo en la última etapa de su producción (transpeptidación) y al activar la autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglicano. De esta manera, este antimicrobiano tiene la capacidad de actuar contra gram positivos y negativos siendo esta una de las posibles razones por la cual se presentó una mayor sensibilidad entre las cepas.

Interesantemente, la resistencia a la rifampicina y apramicina fue muy elevada, como se observa en la figura 6.0. en ambos casos 58 colonias presentaron crecimiento en los medios de selección con dichos antimicrobianos. La apramicina

se une a la subunidad ribosómica 30S e interfiere en la síntesis de proteínas, sin embargo, es conocido que el mecanismo de resistencia más importante frente a este antimicrobiano es la producción de enzimas modificantes que suelen estar codificadas por genes de resistencia en plásmidos [28]. Por otro lado, la rifampicina tiene la capacidad de unirse a la ARN polimerasa interfiriendo con la síntesis de ARN durante la transcripción. Se ha encontrado que la resistencia a la rifampicina se asocia a determinadas mutaciones en una región de 81 bp del gen *rpoB* que codifica la subunidad beta de la ARN polimerasa [29]. La resistencia a la rifampicina es un fenómeno que se ha observado en bacterias presentes en el suelo [37]. La presencia de rifampicina en el suelo es frecuente debido a actividades humanas como la agricultura o la liberación de residuos. Dado que la muestra debe contener bacterias de suelo, es normal encontrar que la resistencia a la rifampicina fue elevada.

Con respecto a la mezcla de antimicrobianos (MR), al estar compuesta de 7 grupos de antimicrobianos: afenicoles, aminoglucósidos, quinolonas, betalactámicos, macrólidos, tiopeptidos y rifamicina; se esperaba que ninguna colonia fuera capaz de crecer sin embargo 26 colonias lograron crecer en ella. Por ello, estas fueron probadas en cada antimicrobiano por separado, encontrando que de igual manera presentaron la capacidad de crecer en ellos. Sin embargo, es importante considerar que las MIC elegidas para cada antimicrobiano fue con respecto a la reportada como resistente para el grupo de enterobacterias por lo que estas colonias podrían tener una MIC superior a las evaluadas.



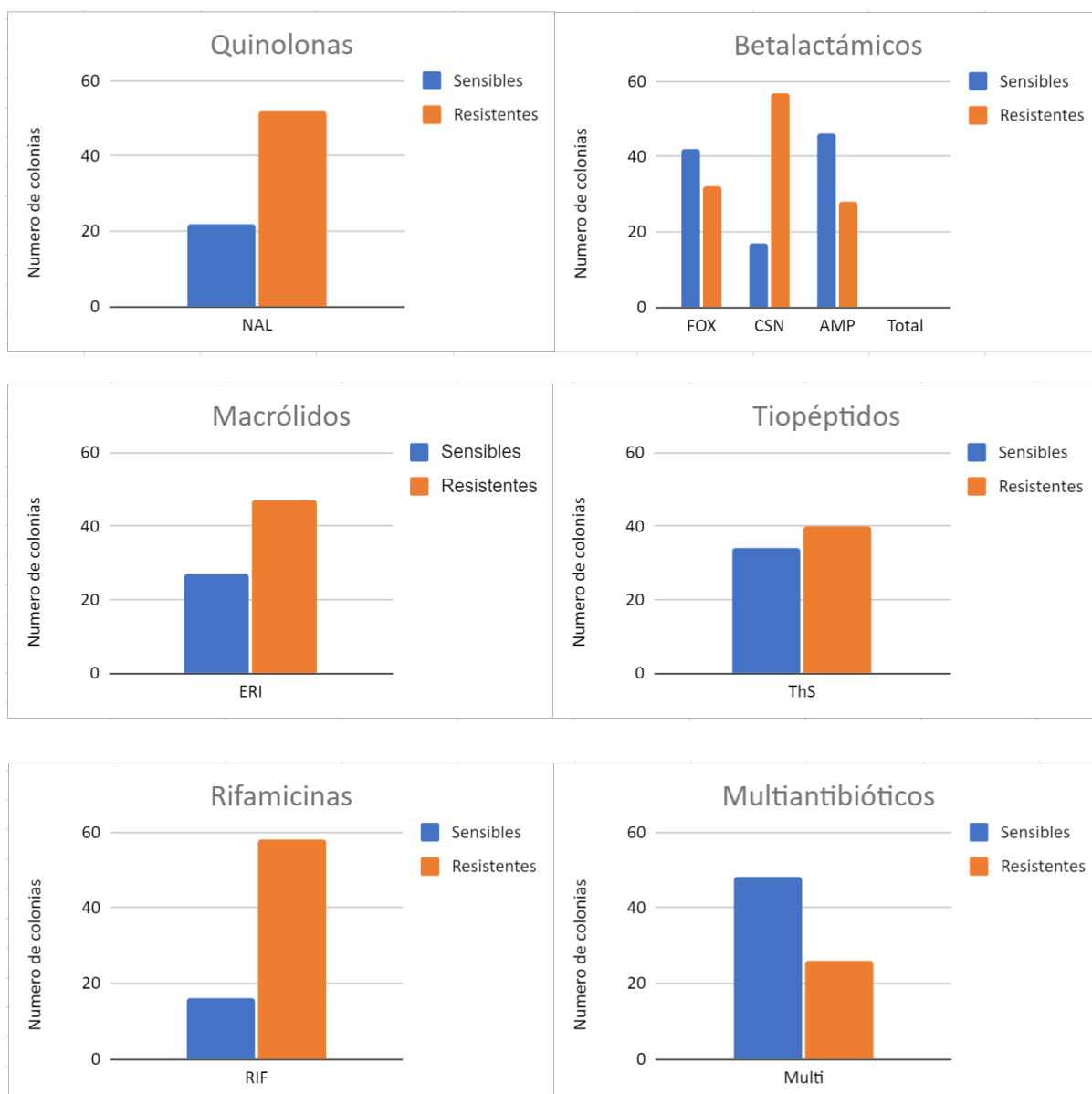


Figura 6.0. Resultados del estudio de resistencia por grupo de antimicrobiano. Se muestra la cantidad de colonias que exhibieron resistencia a cada uno de los antimicrobianos, de acuerdo a su grupo.

Caracterización molecular de colonias seleccionadas resistentes a múltiples antimicrobianos

De las 26 colonias que se aislaron en presencia de la mezcla MR, se seleccionaron 4 colonias que potencialmente podrían pertenecer a una especie distinta dadas las diferencias colonias observadas. La cepa JVH3 presentó una colonia rosa, la cepa

JVH46 presentaba una colonia amarilla; mientras que la cepa JV17 tenía una colonia rosa claro. La cepa JVH47 crecía a colonias pigmentadas de color naranja (Ver Figura 11.0.) además, en la estancia realizada por Victor Hugo Tecla Mena en el laboratorio de la Dra. Alba se reportó que al realizarle un pretratamiento con etanol al 70 % a la muestra un aislado con las mismas características se obtenía nuevamente. Las colonias seleccionadas se crecieron en medio líquido para proceder a extraer y a observar la presencia e integridad de su ADN genómico. Posteriormente se obtuvo el producto purificado del PCR con un tamaño de amplicón de 1467 pb que corresponde a la amplificación del gen 16S ARNr (Ver Figura 7.0.) obtenido con los cebadores 16S ARNr For y 16S ARNr Rev.

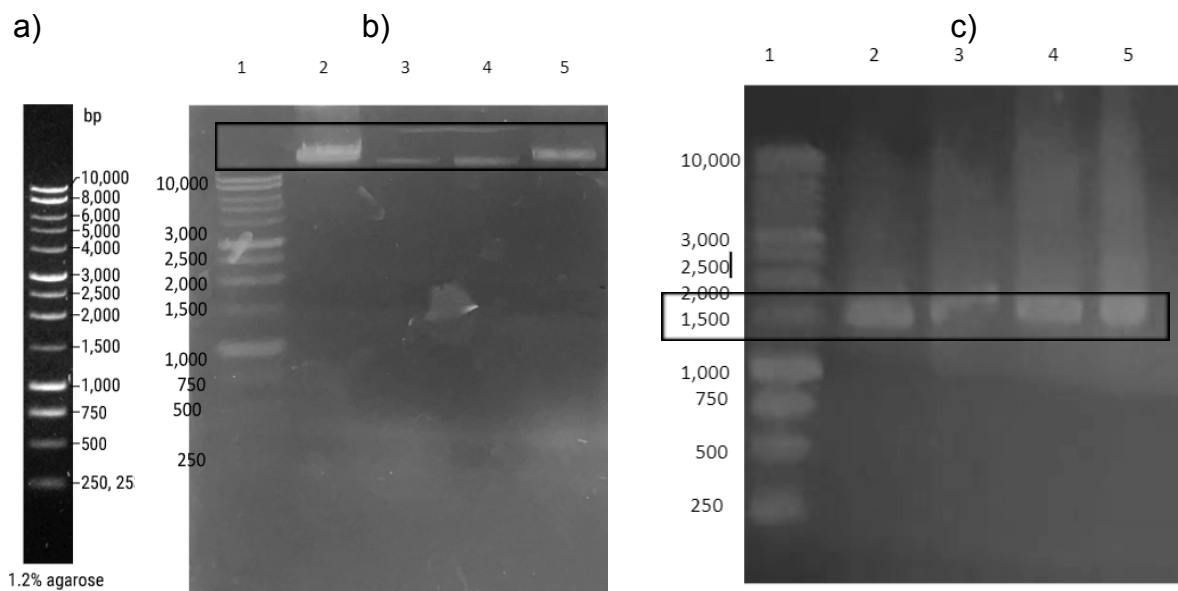


Figura 7.0. Presencia e integridad del ADN genómico y del producto de PCR. a) Representación gráfica del marcador de peso molecular utilizado de la marca Promega que corresponde a trece fragmentos de extremos romos de 250 a 10 000 pb. b) Gel de agarosa al 1.2 % teñido con bromuro de etidio del DNA genómico de distintas cepas en donde el carril 1 le corresponde al marcador de pares de bases, el 2 a JVH3, el 3 a JVH17, el 4 a JVH46 y el 5 a JVH47. c) Gel de agarosa al 1.2 % teñido con bromuro de etidio del producto de PCR donde el carril 1 le corresponde al ladder, el 2 a JVH3, el 3 a JVH17, el 4 a JVH46 y el 5 a JVH47.

Los resultados de la secuenciación Sanger del 16S ARNr alineados en BLAST da como resultado preliminar que el aislado JVH47 tiene una similitud con el género

Exiguobacterium con una identidad máxima del 96.52 % y una cobertura del 98 % es decir, la secuencia del gen 16S ARNr de la cepa JVH47 tiene el 96.52 % de los nucleótidos en la misma posición que *Exiguobacterium sp.* P2 y abarca el 98 % de la longitud total de la secuencia correspondiente. Las cepas JVH3 y JVH46 presentaron una similitud con el género *Enterococcus* con un 98.04 % y 90.91 % de identidad y una cobertura del 98 % y 97 %, respectivamente. Por último, la cepa JVH17 tuvo una similitud con el género *Oerskovia* con una identidad del 96.56 % y cobertura del 98 %.

Los *Enterococcus* son bacterias comunes en el ambiente y se encuentran en el intestino de humanos y animales. Son conocidos debido a su resistencia intrínseca a condiciones adversas (altas concentraciones de sal y variaciones de pH) permitiéndoles sobrevivir y proliferar en distintos entornos. Algunas de sus cepas pueden ser patógenas y causar enfermedades en ciertas condiciones además de presentar resistencias a antimicrobianos como la vancomicina [59].

Las especies de *Oerskovia* están presentes principalmente en el suelo y el agua, representan microorganismos grampositivos en forma de bastón, que se aislaron por primera vez y se describieron como *Nocardia* móvil. Rara vez son patógenas para enfermedades humanas sin embargo han existido especies que han causado bacteriemia [60].

El género *Exiguobacterium* se describió por primera vez en 1983 [33] y desde entonces se han encontrado 20 especies [35]. Los miembros del género *Exiguobacterium* son anaerobios facultativos Gram positivos bajos en G + C en forma de bastones cortos y rectos [36] que tienen una distribución amplia ya que se han encontrado en diversos ambientes, desde marinos, de agua dulce, permafrost hasta aguas termales con un amplio intervalo de temperatura, pH, salinidad y concentraciones de metales pesados [39]. Actualmente, investigadores han comenzado a utilizar como modelo cepas del género *Exiguobacterium*, debido a que estimulan el crecimiento de las plantas y combaten la salinidad en los campos agrícolas para contribuir al aumento en la producción mundial de alimentos [41].

El género *Exiguobacterium* ha demostrado tener la capacidad de colonizar el tracto gastrointestinal de los recién nacidos en los primeros días de vida, mostrando una abundancia del 62%. Posteriormente esta abundancia va disminuyendo gradualmente hasta desaparecer con el avance de la edad [48]. Además, se han descrito como patógenos oportunistas en personas inmunocomprometidas y sanas

causando infecciones desde piel hasta bacteremias [47,50].

Debido a su capacidad de crecer en diferentes ambientes incluyendo pretratados con etanol al 70 %, el haber presentado una frecuencia de aislamiento del 48.4 %, por presentar multiresistencia a antimicrobianos y a la existencia de reportes que demuestran su potencial para colonizar e infectar a humanos llegando incluso a provocar su muerte. Para todos los estudios posteriores; se seleccionó a la cepa JVH47.

Cepa JVH47

Como se mencionó previamente, se optó por la elección del aislado denominado JVH47 para llevar a cabo su caracterización microbiológica y molecular.

En la Tabla 1.0 se muestran los resultados obtenidos del BLAST de acuerdo con la secuencia de su gen 16S ARNr. Con ello, se logró determinar que el aislado pertenece al género *Exiguobacterium* sin embargo, no se logra identificar la especie por lo que se optó por realizar una secuenciación de genoma completo.

Tabla 1.0. Resumen resultados en BLAST de la cepa JVH47

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<i>Exiguobacterium</i> sp. P2(2012) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Exiguobacterium</i> sp. P2	2394	2394	98 %	0.0	96.52 %	1443	JX083293.1
<i>Exiguobacterium mexicanum</i> strain YL-125 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Exiguobacterium mexicanum</i>	2412	2412	99 %	0.0	96.48 %	1461	OK135833.1
<i>Exiguobacterium aquaticum</i> strain A10-77 16S ribosomal RNA gene, partial	<i>Exiguobacterium aquaticum</i>	2410	2410	99 %	0.0	96.36 %	1467	MF592291.1

sequence								
<i>Exiguobacterium</i> sp. strain C10-614 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Exiguobacterium</i> sp.	2407	2407	99 %	0.0	96.35 %	1469	MG757526 1

El ADN del aislado JVH47 se extrajo y se evaluó su integridad utilizando un gel de agarosa (Figura 7.0.). A continuación, se determinó su pureza mediante la relación 260/280 obteniéndose un valor de 1.82 utilizando un espectrofotómetro Nanodrop para posteriormente llevar a cabo la secuenciación del genoma utilizando la plataforma Illumina HiSeq 2000. Con las secuencias obtenidas, el genoma fue ensamblado y anotado, realizándose un árbol filogenético utilizando el análisis del genoma completo de la cepa JVH47 y el de las 20 especies del género *Exiguobacterium* registradas en el NCBI colocando a *Bacillus* spp. como exogrupo por su relación filogenética cercana [40]. En la Figura 8.0. se observa que la cepa JVH47 se agrupa en el clado de *Exiguobacterium chiriquucha* RW2, *Exiguobacterium mexicanum* 8N y *Exiguobacterium aquaticum* IMTB-3094. Con ello, se logra confirmar que la cepa estudiada corresponde al género *Exiguobacterium* y que se relaciona más cercanamente con tres de sus especies. Al tener el genoma completo, se decidió realizar otros análisis para poder asignar una especie al aislado. Con este fin se llevó a cabo un ensayo de una identidad de nucleótidos promedio (ANI) que calcula un valor de identidad promedio de nucleótidos entre las secuencias, lo que permite determinar que tan relacionados genéticamente están los organismos. De acuerdo al análisis, se determinó que las cepas JVH47, 8N e IMTB-3094 presentan una similitud <95 % en la identidad nucleotídica promedio concluyendo que no son la misma especie, por el contrario, las cepas RW2 y JVH47 tienen una similitud >96 % en el nucleótido (ANI) y un >99.9 % de similitud en tetranucleótido (TETRA) determinando que corresponden a la misma especie de *Exiguobacterium chiriquucha* (Ver Figura 9.0.).

Además del análisis por ANI se empleó el algoritmo del servidor Type (Strain) Genome Server (TYGS), cuyos resultados coinciden con la filogenia anterior (Ver Anexo II).

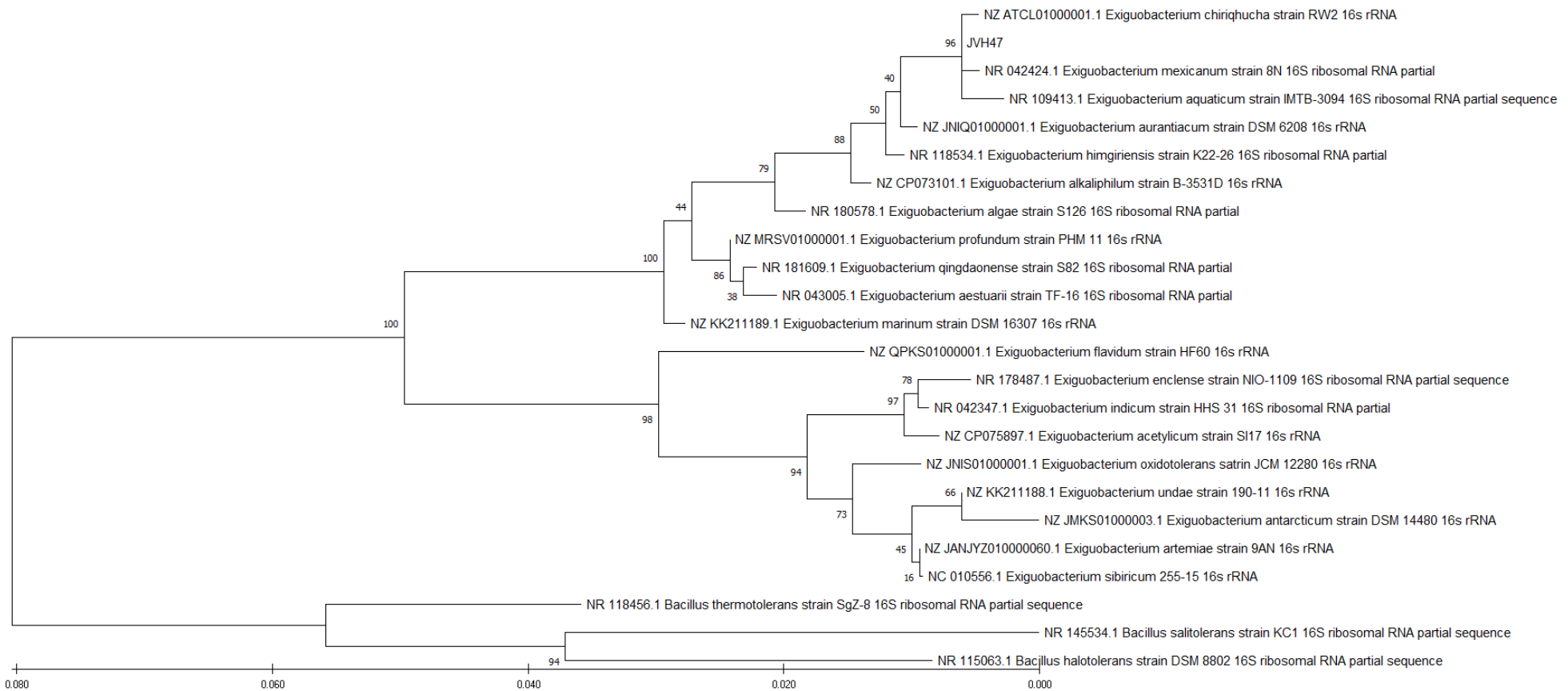


Figura 8.0. Construcción filogenética a partir de las secuencias del 16S ARNr de todas las especies del género *Exiguobacterium* registradas en BLAST. La cepa JVH47 se encuentra en el subclado que contiene a las cepas 8N, IMTB-3094 y RW2.

Las cepas reportadas de esta especie se han aislado de un origen en común que son de lagos (Los Lagos Andinos de Gran Altura (HAAL) y lago Pavilion) de ahí su nombre 'Chiri qhucha' que en quechua significa 'lago frío' [43]. Es llamativo que nuestro aislado procede de una megápolis y a diferencia de Los Lagos Andinos ha estado expuesto a las actividades humanas. Esto sugiere una alta adaptabilidad de este género bacteriano a diversas condiciones ambientales.

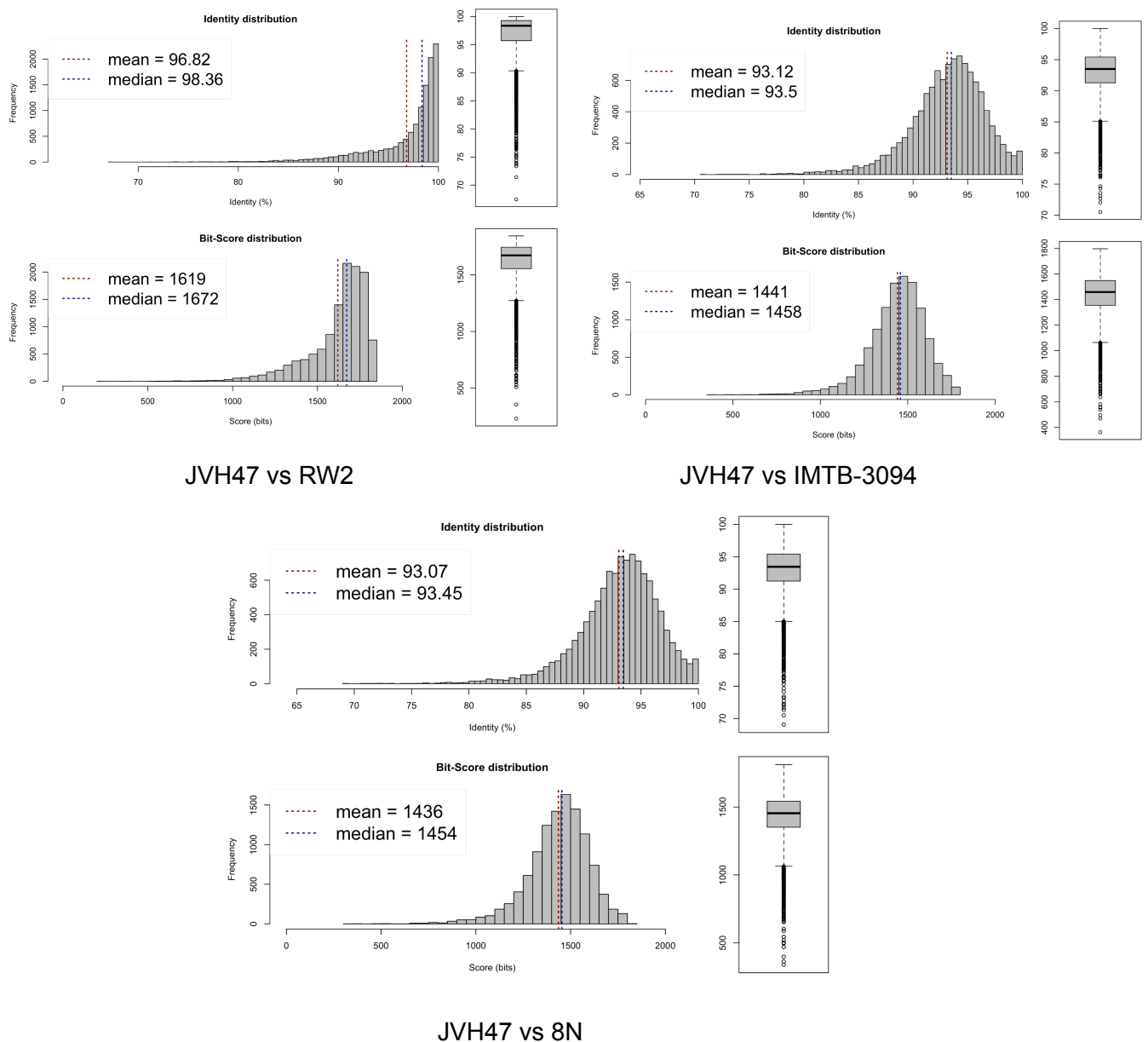


Figura 9.0. Comparación de genoma completo de las cepas JvH47, RW2, 8N y IMTB-3094 para la identidad promedio de nucleótidos (ANI). Las cepas RW2 y JvH47 tienen una similitud >96 % en el nucleótido (ANI) y un >99.9 % de similitud en tetranucleótido (TETRA) determinando que son la misma especie.

Adicionalmente, con la anotación del genoma se pudo realizar su visualización por medio de Proksee (Ver figura 10.0.) donde se resalta que existe una diferencia en el tamaño del genoma de 3,019,018 pb a 2,983,231 pb respectivamente, entre la cepa RW2 y JVH47. La diferencia entre los tamaños de genoma se puede deber a la calidad con la que se realizó el ensamblaje que conlleva a un cromosoma no cerrado al existir regiones no secuenciadas o fragmentos faltantes en la secuencia de ADN y para ello, sería necesario realizar otros programas de ensamblaje o incluso utilizar otra tecnología de secuenciación para realizar un ensamblaje híbrido que nos permita cerrar el cromosoma.

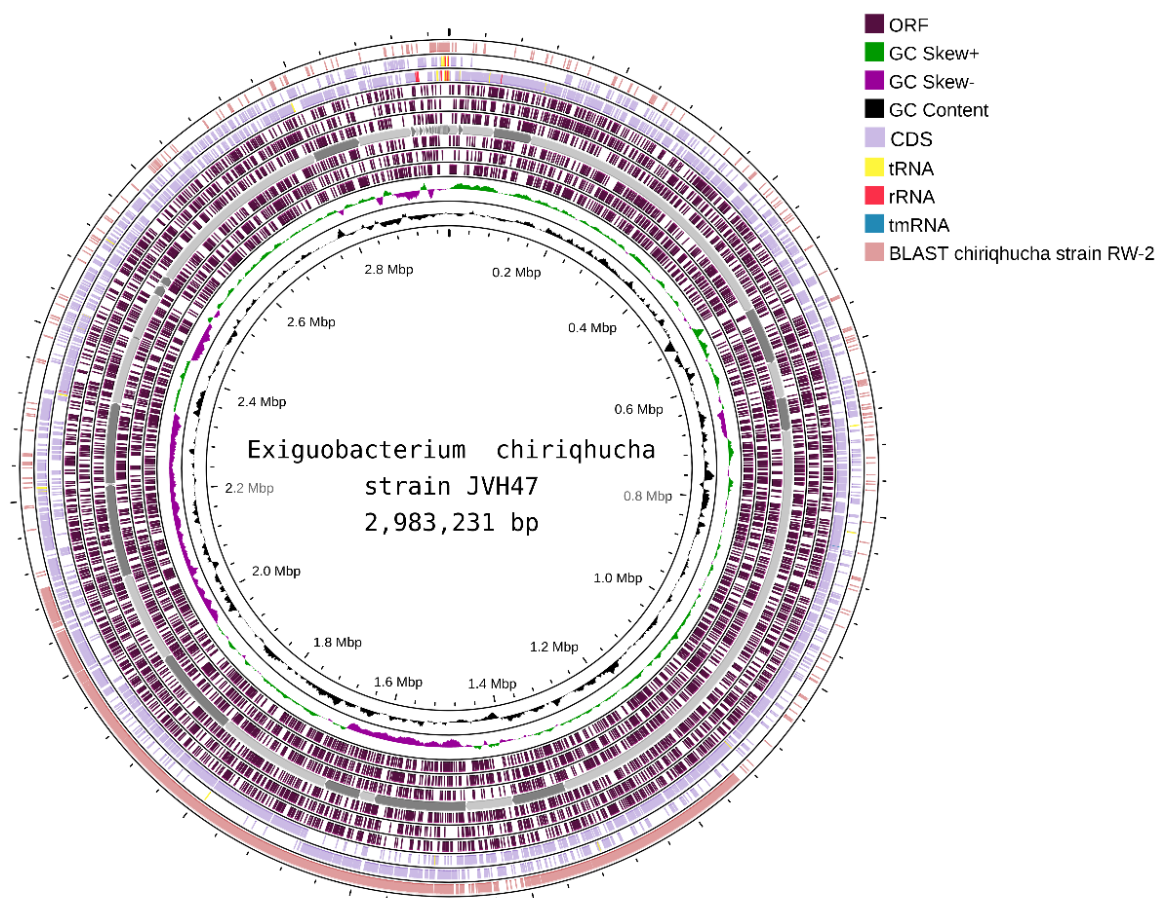


Figura 10.0. Gráfico del genoma de la cepa RW2 utilizando Proksee. Visualización por medio de Proksee de la anotación de Prokka donde se predicen marcos de lectura abiertos (ORF) con parámetros del contenido/sesgo de GC y los resultados de BLAST con la cepa RW-2.

El genoma de la bacteria JVH47 encontrado en la figura 10.0 muestra un bajo contenido de GC lo que implica una composición de bases desequilibrada en su genoma que puede influir en su estructura de ADN, resistencia a la temperatura, clasificación taxonómica y su adaptación a entornos particulares [80]. Contiene además 21 RNAt, 10 RNAr y una mayor presencia de ORF que CDS. Esto último, se puede pensar que es algo normal ya que no todos los ORFs se traducen en proteínas funcionales, y no todas las secuencias de ADN con el potencial de codificar proteínas se traducen y expresan de manera efectiva [81].

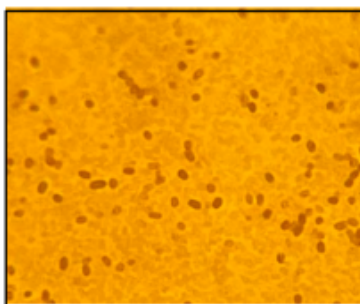
Caracterización morfológica de la cepa *Exiguobacterium chiriquucha* JVH47

La cepa RW2 de *Exiguobacterium chiriquucha* es un aerobio Gram-positivo que es facultativamente anaerobio formador de colonias circulares, lisas y de color naranja brillante que suelen tener entre 3 y 4 mm de diámetro [42]. Conociendo esto, se procedió a realizar la caracterización morfológica del aislado JVH47.

En medio BHI la cepa JVH47 forma colonias coloración anaranjada con un tamaño de 3.5 mm de diámetro, brillante, lisa y circular con borde completo. Es un anaerobio facultativo y la tinción de Gram, indica que es una bacteria Gram positiva en forma de bacilo corto no formadora de esporas (Ver Figura 11.0.). Estas son características comunes de todas las bacterias del género *Exiguobacterium*. Particularmente, la coloración anaranjada se debe a la producción del pigmento carotenoide C₃₀.

Dentro de su genoma se encuentra el gen *spo0A*, que codifica para el regulador maestro de la esporulación [61], pero como ocurre con muchas bacterias del Filo de los Firmicutes pueden conservar algunos genes involucrados en la esporulación sin que esta pueda llevarse a cabo. Precisamente por la relevancia de este gen en el control de la esporulación, es posible que se haya mantenido en el genoma mientras que los otros genes se han ido perdiendo durante la evolución.

a)



b)

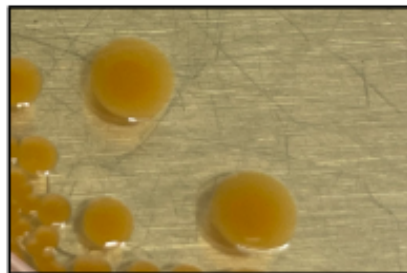


Figura 11.0. Caracterización morfológica del aislado JVH47. a) Vista microscópica con objetivo 100x del Gram realizado a la cepa JVH47 donde se aprecian bacterias Gram positivas en forma de bastón corto que no forma esporas. b) Vista macroscópica de las colonias de la cepa JVH47 donde se observan colonias pigmentadas de color naranja, de 3.5 mm de diámetro, brillantes, lisas y circulares de borde completo.

Perfil de tolerancia ambiental y metabólico de la cepa *Exiguobacterium chiriquucha* JVH47

Las bacterias del género *Exiguobacterium* se han aislado de diferentes ambientes y se postula que tienen una amplia capacidad de adaptación mediante la tolerancia a temperaturas, salinidad, pH y entre otros. Como ejemplo, *Exiguobacterium chiriquucha* RW2, cepa filogenéticamente más cercana a JVH47, se aisló de una estera de cianobacterias microbianas dentro de un lago Pavilion en el sureste de Columbia Británica es un formador de biopelículas, que puede crecer en un intervalo de salinidad del 0-7 % y exhibe el intervalo de crecimiento térmico más alto (4 a 50 °C) como el intervalo de crecimiento de pH más amplio (5 a 11 pH) jamás informados para el género *Exiguobacterium* [42] por lo tanto, en este estudio probamos la capacidad de nuestro aislado de crecer en dichas condiciones.

Para las determinaciones de efecto de temperatura, pH y salinidad, se diseñó el medio EM el cual nos permitió ajustar los valores de pH y cantidades de NaCl. Esto debido a su incapacidad de crecer en el medio más utilizado para el crecimiento de bacterias Luria-Bertani (LB).

Se realizó un ensayo de crecimiento en diferentes temperaturas para caracterizar la termotolerancia de la cepa. Se evaluaron 7 temperaturas que cubrían de los 0 a los 55 C. La cepa JVH47 tiene una temperatura óptima de crecimiento de 37 °C (Ver

figura 12.0.) por lo que se le puede clasificar con base en la temperatura como mesófila, al crecer en temperaturas dentro del intervalo 20 °C - 45 °C [30]. Con ello, tiene la posibilidad de encontrarse en animales de sangre caliente y en ambientes acuáticos como terrestres que presenten una temperatura en torno a los 36.5°C a 37.5°C [31].

En contraste con la cepa filogenéticamente más próxima, que fue aislada en el frío Lago Pavilion, donde las temperaturas del agua pueden descender significativamente, incluso alcanzando valores de 0°C o menos durante el invierno, nuestro aislado no pudo replicarse en dichas condiciones.

Pese a que no crece a altas temperaturas, en su genoma se encuentra una enzima proteolítica que tiene la capacidad de ejercer su actividad en un intervalo de temperatura que va desde aproximadamente de los 50°C hasta 75°C [38] sin embargo queda pendiente comprobar su funcionalidad.

De esta manera nuestro aislado maneja un intervalo de temperatura menor a la cepa de *Exiguobacterium chiriquucha RW2* lo que indica que ha desarrollado adaptaciones genéticas que le permiten sobrevivir en ambientes más cálidos. Esto le confiere la habilidad de prosperar a la temperatura corporal humana (35°C), lo que le concede la capacidad de colonizar y, posiblemente, causar infecciones en el cuerpo humano.

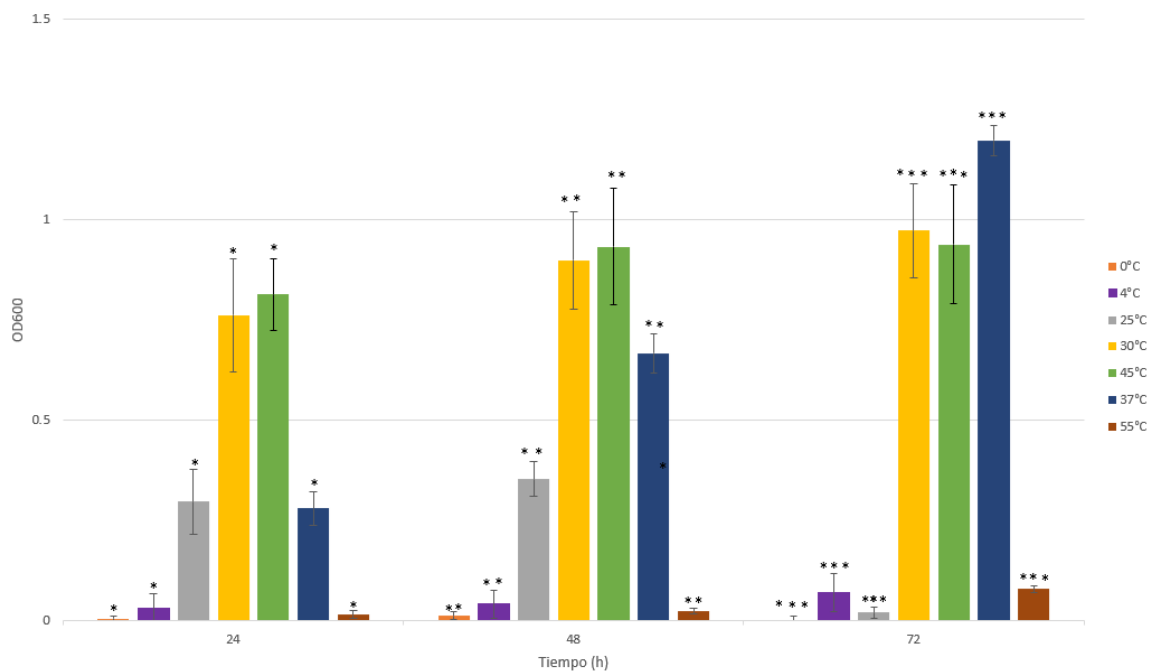


Figura 12.0. Efecto de la temperatura en la cepa JVH47. El análisis se llevo a cabo a 24, 48 y 72 h a temperaturas de 0 °C (naranja), 4 °C (morado), 25 °C (gris), 30 °C (amarillo), 37 °C

(azul), 45 °C (verde) y 55 °C (café). El análisis estadístico ANOVA (análisis de varianza) muestra que hay diferencia significativa entre todos los grupos por tiempo.* $p \leq 0.05$.

Otra característica interesante del género *Exiguobacterium* es la capacidad de crecer en diversas concentraciones de iones hidrógeno. Como se observa en la Figura 13.0. la cepa JVH47 tiene la capacidad de crecer en pH neutro y alcalino teniendo un pH óptimo de crecimiento en 9 clasificándose como alcalófilo [30]. Esto nos indica que como cualquier alcalófilo, la cepa se ha adaptado a través de la modificación evolutiva de la estructura lipídica y proteica y de mecanismos compensatorios para mantener la fuerza motriz protónica en un ambiente alcalino como puede ser que la obtención de energía se obtenga a partir de un gradiente iónico Na^+ en lugar de una fuerza motriz protónica como lo presenta *Bacillus firmus*. Además, muchas enzimas de alcalófilos tienen un punto isoeléctrico mayor, debido a un incremento en el número de aminoácidos básicos, que las enzimas homólogas de neutrófilos [31]. La cepa JVH47 presenta dentro de su genoma genes que codifican para transportadores antiporte de Na^+ , Li^+ , K^+ / H^+ lo que le permite por ejemplo, bombear iones de sodio hacia afuera de la célula y, al mismo tiempo, llevar iones de hidrógeno hacia el interior de la célula. Esto mantiene el pH intracelular permitiéndole adaptarse a diferentes condiciones como ambientes alcalinos. Este sistema de transporte podría estar involucrado en la supervivencia en pH elevados.

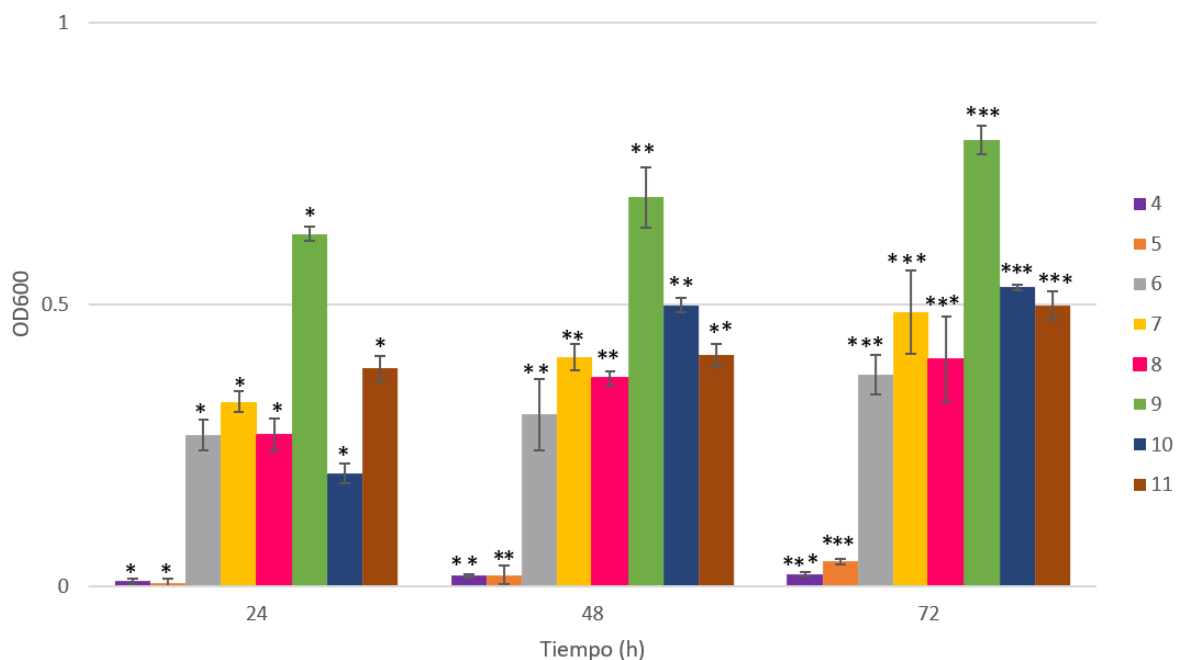


Figura 13.0. Efecto del pH en la cepa JVH47. El análisis se llevó a cabo a 24, 48 y 72 h a

pH 4 (morado), 5 (naranja), 6 (gris), 7 (amarillo), 8 (rosa), 9 (verde), 10 (azul) y 55 °C (café). El análisis estadístico ANOVA (análisis de varianza) muestra que hay diferencia significativa entre todos los grupos por tiempo. *p ≤ 0.05.

Otra de las características más estudiadas del género *Exiguobacterium* es su tolerancia al estrés salino. Para ello, la cepa JVH47 se creció en medio EM con concentraciones diferentes de NaCl. La prueba de salinidad observada en la figura 14.0. muestra que la cepa JVH47 crece mejor en presencia de NaCl por lo cual se le clasifica como un halófilo con una concentración óptima de NaCl observada del 3 %. La concentración óptima de NaCl del microorganismo depende del hábitat y se ha demostrado que los microorganismos marinos crecen mejor con NaCl entre el 1 % y el 4 % [31].

Por otro lado, tiene la capacidad de crecer en un intervalo de salinidad del 0.5-7 % lo que nos habla de que ha desarrollado mecanismos para tolerar altas concentraciones de sal. Esta capacidad de crecer en un intervalo alto de salinidad al parecer es una propiedad intrínseca del género debido a que la cepa RW2 también lo presenta.

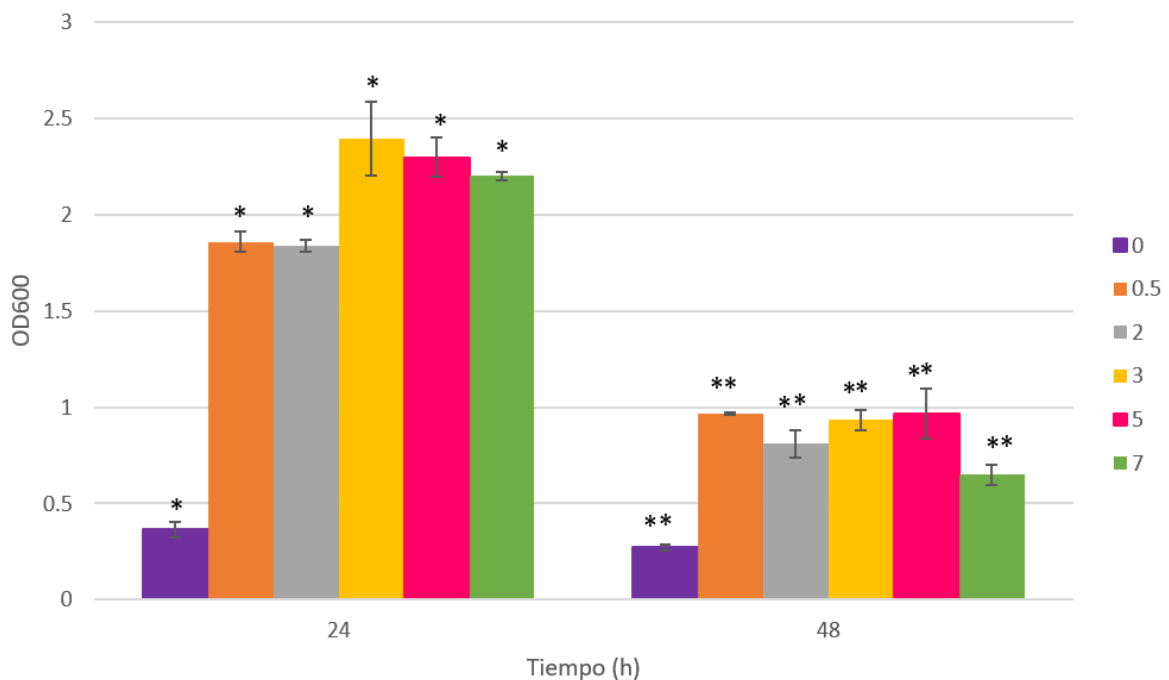


Figura 14.0. Efecto de la salinidad en la cepa JVH47. El análisis se llevo a cabo a 24 y 48 h a porcentaje de salinidad del 0 % (morado), 0.5 % (naranja), 2 % (gris), 3 % (amarillo), 5 % (rosa) y 7 % (verde). El análisis estadístico ANOVA (análisis de varianza) muestra que hay

diferencia significativa entre todos los grupos por tiempo.* $p \leq 0.05$.

Las actividades metabólicas que permiten el empleo y asimilación de fuentes de carbono y nitrógeno son también mecanismos claves para la adaptación y supervivencia de las bacterias. Por ello, se realizó la prueba de amilasa, proteasa y hemólisis al aislado (Ver Figura 15.0.). La cepa JVH47 demostró ser amilasa positivo, lo que significa que tiene la capacidad de digerir los carbohidratos al tener la enzima encargada de catalizar la hidrólisis de enlaces glicosídicos α -1,4 presentes en el almidón, glicógeno y otros polisacáridos. Se encontró dentro de su genoma que cuenta con la *alpha* y *beta* amilasa permitiéndole generar fragmentos de carbohidratos más cortos y maltosa como producto final [62]. Esto le permite adaptarse a diversos sustratos lo que le proporciona una ventaja competitiva al tener la capacidad de aprovechar distintas fuentes de energía que otras bacterias no pueden degradar. También es proteasa positiva, es decir hidroliza las proteínas en proteínas más pequeñas o unidades proteicas más pequeñas, como péptidos o aminoácidos proporcionándole una fuente de nutrientes diversificada.

La cepa JVH47 es gamma-hemolítico, no produce hemolisinas que son enzimas extracelulares encargadas de la lisis de los glóbulos rojos de la sangre lo que quiere decir que tiene la capacidad de adquirir el hierro por otras vías. En el genoma de la cepa JVH47 se encuentran las proteínas YfiZ y YfiY involucradas en el transporte y unión de sideróforos los cuales son moléculas secretadas por microorganismos para capturar y transportar hierro del entorno circundante.

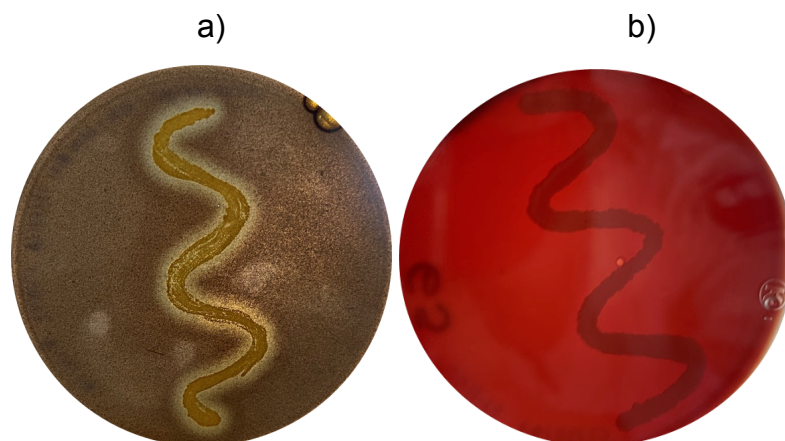


Figura 15.0. Prueba de proteasa, amilasa y hemólisis. a) Vista macroscópica de la placa con agar exiguo suplementado con leche descremada (2 %, p/vol) y almidón (0,4 %, p/vol) inoculada con la cepa JVH47 y revelado con solución de yodo de Lugol después de 24 h a

37 °C. b) Vista macroscópica de la cepa JVH47 inoculado por 24 h a 37 °C en placa con agar sangre con (5 %, p/vol) de sangre de carnero para capacidad hemolítica.

Motilidad de la cepa *Exiguobacterium chiriqhucha* JVH47

La capacidad de movimiento, conocida como motilidad, desempeña un papel crucial en la supervivencia de las bacterias. Esta habilidad les permite adaptarse y responder a su entorno de manera eficaz. En particular, la motilidad se convierte en un mecanismo esencial cuando las bacterias se enfrentan a situaciones de estrés ambiental, como la presencia de antimicrobianos u otras condiciones adversas. Esto les confiere la ventaja de alejarse del estímulo, buscar nutrientes y nichos ecológicos adecuados

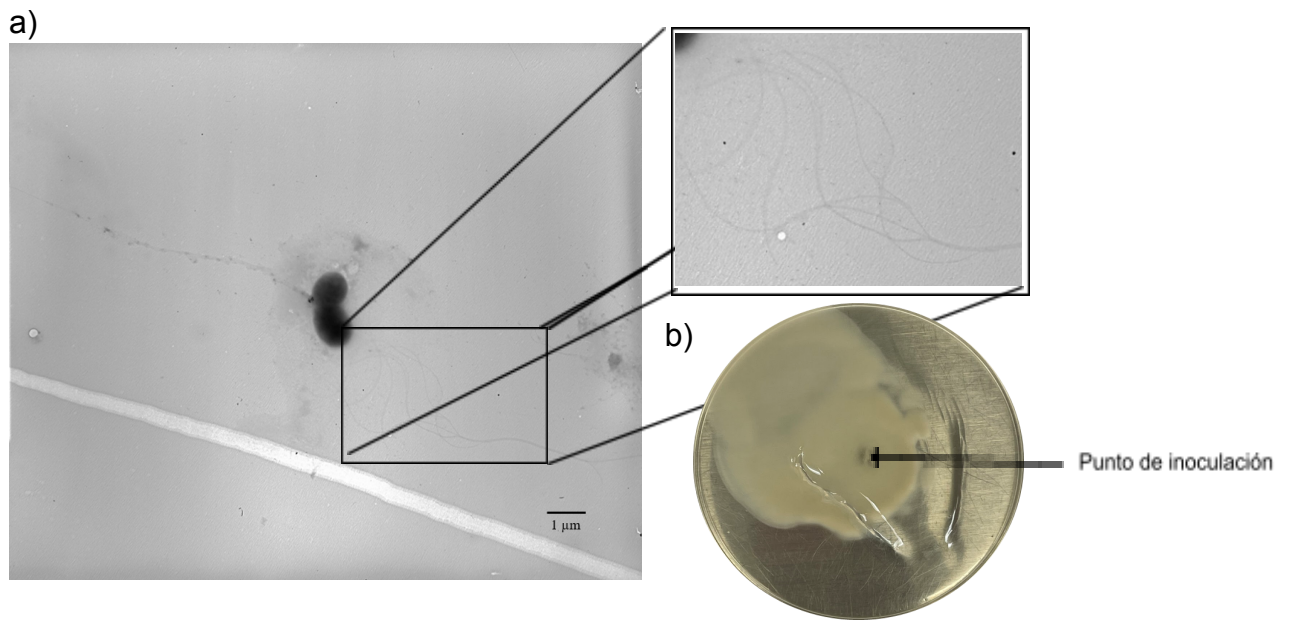
Con respecto a la prueba de movilidad, la cepa JVH47 muestra tener la capacidad de ser móvil (Figura 16.0) con una disminución en la producción de su pigmento naranja (panel a). Adicionalmente, mediante el TEM se logra observar la presencia de flagelos lofotricos es decir, presenta múltiples flagelos que están agrupados en un solo extremo de la célula. Estos flagelos pueden funcionar de manera coordinada para proporcionar una movilidad rápida y direccional.

Es muy interesante que, acompañado a la movilidad, se observó una disminución del carotenoide naranja que se ha probado que tiene efectos antibacteriales [42]. Siendo probable que dado el costo metabólico que implica la producción del pigmento y el mecanismo de motilidad, la bacteria seleccione uno de ambos mecanismos.

Genotípicamente se encontraron genes involucrados en la formación y función del flagelo como *motB*, *fliG*, *fliE*, *fliW*, entre otros (panel c). Además de los genes involucrados en la formación del flagelo, en el genoma se identificaron los genes que codifican para las proteínas SwrC y SwrD involucradas en la motilidad de swarming [63,64]. El swarming es un fenómeno observado en algunas bacterias cuando se agrupan y se mueven en una capa extensa y altamente coordinada sobre una superficie sólida o semisólida lo que le confiere ventajas para colonizar superficies, producción de biopelícula y defensa contra otras especies microbianas.

La capacidad de movilidad de la cepa JVH47, ya sea por medio de flagelos o swarming, le confiere varias ventajas adaptativas que pueden beneficiar su supervivencia y éxito en diferentes entornos ya que le permite buscar nutrientes e

incluso colonizar en nuevos nichos.



c)

Código de identificación	Descripción	Código de identificación	Descripción
>EGHCFAJG_00450	Flagellar basal-body rod protein FlgG	>EGHCFAJG_01860	Flagellar biosynthetic protein FliP
>EGHCFAJG_00798	Flagellar assembly factor FliW	>EGHCFAJG_01861	Flagellar biosynthetic protein FliQ
>EGHCFAJG_00812	Flagellin	>EGHCFAJG_01862	Flagellar biosynthetic protein FliR
>EGHCFAJG_00815	Flagellar hook-associated protein 2	>EGHCFAJG_01863	Flagellar biosynthetic protein FliB
>EGHCFAJG_00816	Flagellar secretion chaperone FliS	>EGHCFAJG_01864	Flagellar biosynthesis protein FliA
>EGHCFAJG_01832	Flagellar biosynthetic protein FliB	>EGHCFAJG_01865	Flagellar biosynthesis protein FliF
>EGHCFAJG_01842	Flagellar basal body rod protein FlgB	>EGHCFAJG_01866	Flagellum site-determining protein YlxH
>EGHCFAJG_01843	Flagellar basal-body rod protein FlgC	>KBGJMGP0_00851	Swarming motility protein SwrC
>EGHCFAJG_01844	Flagellar hook-basal body complex protein FliE	>KBGJMGP0_01450	Swarming motility protein SwrD
>EGHCFAJG_01846	Flagellar motor switch protein FliG	>EGHCFAJG_01856	Flagellar motor switch protein FliM

Figura 16.0. Motilidad de la cepa JVH47. a) Vista en el microscopio electrónico de transmisión de la cepa JVH47 donde se observan flagelos lofotricos. b) Vista macroscópica

de la placa con medio exiguo con (0,3 %, p/vol) de agar para evaluar movilidad e inoculada al centro con la cepa JVH47 por 48 h a 37 °C. c) Listado de proteínas asociadas a la formación del flagelo y al proceso de swarming obtenidos de la anotación en prokka.

Formación de biopelícula de la cepa *Exiguobacterium chiriqhucha* JVH47

La formación de biopelículas es un proceso mediante el cual comunidades microbianas, como bacterias y otros microorganismos, se adhieren a superficies sólidas o interfaces líquido-sólido y forman estructuras multicelulares y adherentes. Su importancia radica en que actúa como una defensa contra factores ambientales adversos facilitando de esta manera la supervivencia de las bacterias que la componen. En términos de patogenicidad, las biopelículas pueden aumentar la virulencia de las bacterias al permitirles adherirse firmemente a las células huésped o a las superficies en el cuerpo humano. Esto facilita la colonización y la propagación de infecciones, además, la resistencia a antimicrobianos es una característica importante de las biopelículas, lo que las convierte en un desafío significativo en la gestión de infecciones.

Para medir la producción de biopelícula se empleó la cepa JVH47 y se comparó con un aislado ambiental perteneciente al mismo género. La cepa que empleamos para comparar pertenece al género *Exiguobacterium* y fue aislada por el grupo de la Dra. Valeria Souza del Instituto de Ecología en Cuatro Ciénegas, Coahuila. Cuatrociénegas es una región que se caracteriza por poseer una serie de cuerpos de agua, como lagunas y manantiales, rodeados por un paisaje semiárido y desértico. Se encuentra alejada de centros urbanos y áreas industriales, lo que limita la exposición a contaminantes ambientales y actividades humanas que podrían perturbar a las bacterias residentes.

Se obtuvo que la cepa JVH47 es un fuerte productor de biopelícula (categoría 3) mientras que la *Exiguobacterium* sp. P4526 es un productor moderado de biopelículas (categoría 2) como se observa en la tabla 2.0. A pesar de que ambas especies pueden formar biopelículas el aislado JVH47, tiene una mayor capacidad para hacerlo. Sería interesante determinar si existen diferencias a nivel genético o de expresión de las proteínas y moléculas de adhesión que le permiten adherirse con mayor eficacia en comparación con otras cepas como el aislado de Cuatro Ciénegas.

Esta capacidad de formación de biopelícula fuerte le otorga una ventaja de supervivencia ya que le permite concentrar nutrientes proporcionando además una protección frente a fluctuaciones medioambientales de humedad, temperatura y pH. De igual manera, esta estructura altamente organizada le funciona como una barrera que facilita su resistencia frente a la desecación, oxidantes, biocidas y algunos antimicrobianos [32].

Tabla 2.0. Análisis del valor de corte (ODc) para la formación de biopelícula con la cepa JVH47 y cepa P4526.

RESULTADOS JVH47			
OD CONTROL -		OD 70 % JVH47	
3 VECES LA DESVIACION	0.0015	PROMEDIO OD	0.23608
DO DEL CONTROL -	0.0433	RESULTADO	OD >4ODC
ODC	0.0448		
2ODC	0.0895		
4ODC	0.1790		
Categoría 3 (fuerte productor de biopelícula)			
RESULTADOS Cepa P4526			
OD CONTROL -		OD 70 % Exiguo P4526	
3 VECES LA DESVIACION	0.0015	PROMEDIO OD	0.12075
DO DEL CONTROL -	0.0428	RESULTADO	2ODC < OD < 4ODC
ODC	0.0443		
2ODC	0.0885		
4ODC	0.1770		
Categoría 2 (productor moderado de biopelícula)			

Determinación de la concentración mínima inhibitoria de JVH47 y su comparación con una cepa aislada de Cuatro Ciénegas

La cepa JV47 fue seleccionada en principio por su capacidad de crecer en presencia de 14 antimicrobianos, por lo que se procedió a realizar un estudio de determinación de susceptibilidad antimicrobiana siguiendo las directrices del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI) y comparándolo con la cepa P4526. En la tabla 3.0. se muestra que la *Exiguobacterium chiriqhucha* JVH47 es resistente, según las MIC reportadas en un estudio realizado a *Exiguobacterium* sp. S3-2 [39], a la Penicilina (1 µg/mL), Eritromicina (32 µg/mL), Estreptomycin y Ciprofloxacino, estos últimos dos sin llegar a un valor de corte en las concentraciones probadas. Los resultados de MIC obtenidos, indican una diferencia de resistencia entre la cepa JVH47 y P4526. El aislado JV47 muestra resistencia a la eritromicina, a diferencia de la cepa P4526, que es sensible a este antimicrobiano. Además, aunque ambas cepas son sensibles a tetraciclina, la JVH47 muestra ser más resistente al tener una MIC más

alta. Esto es interesante ya que Cuatro Ciénegas es famosa por albergar estromatolitos microbianos morfológicamente diversos que se asemejan a las condiciones de los océanos antiguos, y por lo tanto, estamos comparando con un antiguo reservorio de resistencia.

Para analizar estos resultados y para determinar si el genotipo es el mismo que el fenotipo, con ayuda de la anotación del genoma, se llevó a cabo el análisis del resistoma de las especies filogenéticamente más cercanas a JVH47 así como de la cepa P4526. El estudio incluyó el análisis de *Exiguobacterium chiriquucha* JVH47 y RW-2, *Exiguobacterium mexicanum*, *Exiguobacterium aquaticum* y *Exiguobacterium sp. P4526*, con el fin de comprender la diversidad de la totalidad de los genes de resistencia mediante predicciones bioinformáticas y compararlo con la información del fenotipo.

Tabla 3.0. Resumen de los resultados de determinación de susceptibilidad antimicrobiana.

Antimicrobiano	MIC (µg/mL) reportada [50]	<i>Exiguobacterium chiriquucha</i> JVH47		<i>Exiguobacterium sp.</i> P4526	
		MIC (µg/mL)	R/S	MIC (µg/mL)	R/S
Penicilina	≥0.25	1	R	1	R
Eritromicina	≥4	32	R	2	S
Tetraciclina	≥8	2	S	1	S
Estreptomicina	≥16	>512	R	>512	R
Ciprofloxacino	≥0.25	>512	R	>512	R

R: Resistente

S: Sensible

Predicción bioinformática del resistoma de JVH47 y especies filogenéticamente relacionadas además de una cepa de Cuatro Ciénegas

Como se observa en la tabla 4.0 el gen *qacG* se encuentra conservado en todas las secuencias analizadas desde una cepa primitiva como es la P4526 hasta la cepa JVH47 aislada de una Megapolis. Este gen codifica para una pequeña bomba de eflujo de resistencia a multidroga que confiere resistencia al cloruro de benzalconio y al bromuro de etidio. Este gen se encuentra ampliamente distribuido en distintas familias bacterianas y en la mayoría de los casos se encuentra fijo en el cromosoma, con excepción de algunos aislados de *Acinetobacter baumannii* donde se ha encontrado en plásmidos [44].

Asimismo, el gen *vanY* en el cluster *vanM* también se encuentra presente en todas las secuencias analizadas. El gen *vanY* está involucrado en la resistencia a los glicopéptidos, especialmente a la vancomicina, por medio de una enzima que modifica los precursores de la pared celular bacteriana [45]. En el contexto de *vanM*, *vanY* se asocia con la resistencia a la teicoplanina y a algunos otros antimicrobianos, además de la vancomicina. Este cluster, en comparación a otros clusters como *vanA*, el cual es el sistema de resistencia a la vancomicina más comúnmente encontrado en enterococos, generalmente se ha encontrado en *Staphylococcus aureus* resistente a la vancomicina (VRSA) y *Staphylococcus epidermidis* resistente a la vancomicina (VRE) [45]. Esto implicaría que las bacterias que albergan este gen específicamente en este cluster, como la JVH47, pueden tener la capacidad de resistir a múltiples antimicrobianos, dentro de los que se encuentran los glicopéptidos, lo que tiene implicaciones importantes en términos de salud pública y terapia antimicrobiana.

Por otro lado, se identificaron dos genes de resistencia en la cepa JVH47 que no estaban presentes en ninguna de las otras secuencias analizadas. Una de ellas fue encontrada debido a que se realizó la anotación del ensamble del genoma de la cepa JVH47 por medio de SPAdes pero sin realizar el proceso de trimming encontrando el gen que codifica a la resistencia a betalactámicos llamado *bla*_{TEM-116}. El *bla*_{TEM-116} es una beta-lactamasa de amplio espectro que se encuentra en muchas especies de bacterias. Concede resistencia a penicilinas, monobactámicos, carbapenémicos y cefalosporinas. El otro gen encontrado denominado *mphN* fue

encontrado bajo el proceso de trimming el cual codifica a una enzima fosfotransferasa de macrólidos. El gen *mphN* es conocido por conferir resistencia a macrólidos específicamente de 14 miembros de anillo de macrolactona, como la claritromicina y la roxitromicina. Los macrólidos varían según el número de anillos de macrolactona que contienen que van desde los 12 a 16 miembros [46] como es el caso de la eritromicina que tiene 16. El que nuestro aislado presente resistencia a la eritromicina nos indica que el gen *mphN* puede presentar mutaciones que ampliaron su espectro de resistencia a macrólidos de 14 a 16 miembros. Sería necesario corroborar esto mediante experimentos que involucren la expresión de este gen en un microorganismo susceptible y luego determinar si efectivamente le otorga resistencia.

La presencia de este gen podría explicar el porqué la cepa JVH47 es resistente a la eritromicina en comparación a la P4526. La presencia activa del gen *mphN* en el genoma de JVH47, le confiere resistencia fenotípica a la este. Por otro lado, la cepa P4526 carece de este gen, lo que la hace susceptible a la eritromicina que se encuentra dentro del grupo de los macrólidos. Además, la ausencia de este gen en la cepa RW2 sugiere que no forma parte del resistoma del género *Exiguobacterium*. Existen muy pocos estudios sobre la presencia de este gen sin embargo se ha encontrado que este gen está asociado con la resistencia observada en la clínica por medio de un estudio con una cepa de *Exiguobacterium* aislada de un sedimento de una piscifactoría [39]. Además, han encontrado que es probable que este homólogo del gen *mphN* puede haber sido capturado por elementos genéticos móviles al menos cinco veces independientes al no agruparse en el análisis filogenético (Ver Anexo IV) [46].

A modo de conclusión el resistoma del género *Exiguobacterium* en promedio tiene 4 genes de resistencia detectado por CARD, donde el aislado de Cuatro Ciénegas mostró una cantidad de genes menor, con solo 2 genes, en comparación con el aislado JVH47, que exhibió un total de 6 genes.

Adicional al análisis predictivo con CARD, el cual contiene información sobre una amplia variedad de genes de resistencia a antimicrobianos, una búsqueda manual nos permitió identificar los genes codificantes para proteínas de unión a penicilina (Pbp), PbpX para el aislado JVH47 y la proteína 2B para la cepa P4525, los cuales

se han encontrado estar involucradas en la resistencia a la penicilina [68]. Esto correlaciona con el análisis de MIC con respecto a la resistencia fenotípica que presenta la cepa JVH47 y la cepa P4526 hacia la penicilina.

Con respecto a la estreptomicina, el cual es un antibiótico aminoglucósido que actúa interfiriendo con la síntesis de proteínas en las bacterias, tiene una acción limitada contra bacterias Gram positivas debido a su estructura característica de pared celular gruesa la cual dificulta la entrada de la estreptomicina y otros aminoglucósidos, razón por la cual nuestro aislado pudo haber presentado resistencia. Por otro lado, preliminarmente no se encontraron genes o proteínas relacionadas con el mecanismo de resistencia hacia el ciprofloxacino por lo que quedaría pendiente la búsqueda de ellos ya que en los primeros análisis encontramos resistencia.

Tabla 4.0. Resistoma de distintas cepas del género *Exiguobacterium*.

ARO Term	Resistance Mechanism	<i>Exiguobacterium mexicanum</i> 8N	<i>Exiguobacterium aquaticum</i> IMTB-3094	<i>Exiguobacterium chiriquicha</i> RW-2	<i>Exiguobacterium chiriquicha</i> JVH47	<i>Exiguobacterium</i> sp. P4526
<i>vanY</i> gene in <i>vanA</i> cluster	Antibiotic target alteration	✓	✓		✓	
<i>qacG</i>	Antibiotic efflux	✓	✓	✓	✓	✓
<i>mphN</i>	Antibiotic inactivation				✓	
<i>vanY</i> gene in <i>vanM</i> cluster	Antibiotic target alteration	✓	✓	✓	✓	✓
<i>vanW</i> gene in <i>vanB</i> cluster	Antibiotic target alteration	✓	✓		✓	
<i>vanW</i> gene in <i>vanG</i> cluster	Antibiotic target alteration			✓		
<i>bla</i> _{TEM-116}	Antibiotic inactivation				✓	

Genes de resistencia a antimicrobianos asociados a elementos móviles

Como se mencionó previamente, se ha postulado que el gen *mphN* junto con otros miembros de esta familia, pueden ser capturados por elementos genéticos móviles, como, por ejemplo, plásmidos y transposones [46], se procedió a buscar la presencia de estos elementos. Primeramente, se analizó el contexto génico de 17,625 pb río arriba y abajo del gen (Ver Figura 17.0). Los elementos móviles a menudo contienen secuencias características que los distinguen de las secuencias genéticas regulares como secuencias terminales repetidas inversas, genes asociadas a la movilización o secuencias de reconocimiento de inserción; por ello el análisis del contexto génico nos permitirá buscar secuencias que se asemejan a elementos móviles conocidos.

Dentro de los resultados se encontró una hidrolasa bifuncional de la pared celular CwIT que se espera que desempeñe un papel importante en la propagación de los transposones [69]. De igual manera se destaca la proteína ComEC que es encargada de transportar el ADN monocatenario al citosol en el proceso de transformación [70] y la proteína ArdC con actividad de antirestricción que se ha demostrado que permite ampliar el rango de huéspedes de plásmidos [71].

De esta manera, nos enfocamos en la búsqueda de dos elementos móviles: transposón y plásmido. Los transposones están conformados principalmente por secuencias terminales repetidas (LTR) en ambos extremos y por el gen *transposa*. Por lo tanto se procedió a identificar elementos de inserción por medio de ISFinder [66] encontrándose una similitud a 6 familias IS (IS5, IS66, IS3, IS200, ISL3 e ISL30) (Ver Anexo VI). Sin embargo, el alineamiento determinó que no se encontraba una similitud por ninguna de las familias.

Los plásmidos están conformados principalmente por un origen de replicación (ORI) y por secuencias de promoción y regulación, por lo que se realizó un análisis empleando el programa PlasFlow. Este determinó que el nodo donde se encuentra el gen *mphN* es un plásmido no clasificado (Ver Anexo VII). Complementando esto con el análisis del genoma completo de la bacteria, se detectaron 4 tipos de proteínas que contienen un dominio similar a una inmunoglobulina (Ig). Estas proteínas se han detectado que se encuentran en las regiones de transferencia de

varios plásmidos ya que les permite reducir la motilidad celular facilitando el contacto entre células [72]. Solo se logró anotar 16 genes, pero todos ellos parecen estar relacionados con la movilización.

Al no encontrarse un origen de replicación, pero sí la presencia de una recombinasa/integrasa y una endonucleasa se deduce que el gen *mphN* pudo haber sido adquirido por medio de un plásmido con la posibilidad de haber tenido la capacidad de integrarse al genoma, sin embargo, sería necesario realizar el ensamble del plásmido y posteriormente una validación experimental para confirmar.

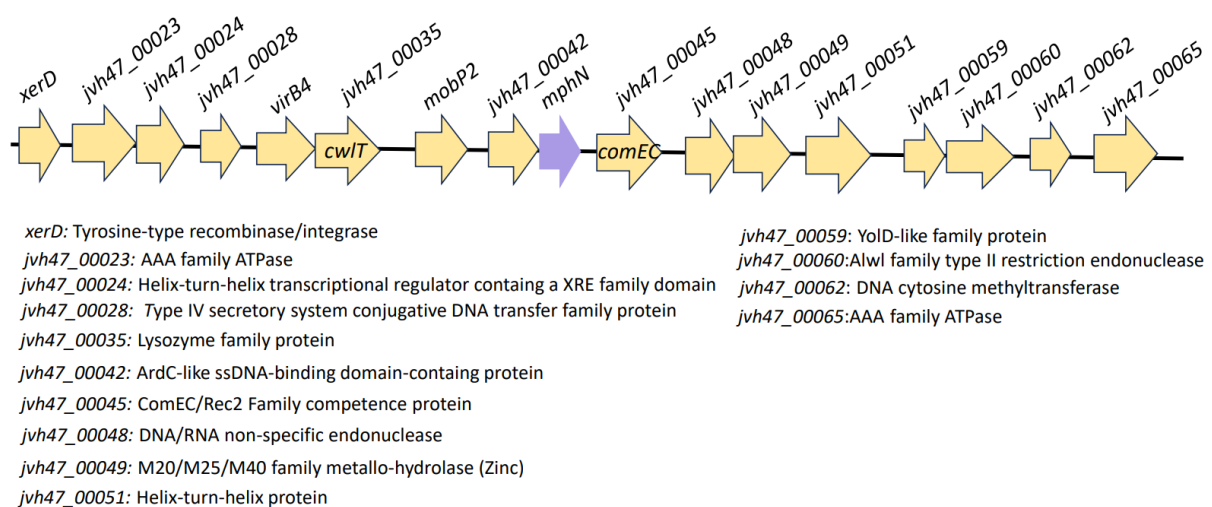


Figura 17.0. Contexto genómico alrededor del gen *mphN*. El gen de interés *mphN* se encuentra en morado y se destacan los genes *cwIT* y *comEC*.

Esto nos permite deducir que la cepa es capaz de adquirir material genético externo al presentar proteínas involucradas en el proceso de transformación y conjugación los cuales le permitieron posiblemente la adquisición de un plásmido que contenía el gen *mphN*. Este gen codifica para una enzima llamada nucleótido 2'-O-metiltransferasa la cual es responsable de la modificación de ribonucleótidos en el ribosoma bacteriano, evitando que los antimicrobianos se unan eficazmente al ribosoma y, por lo tanto, inhiban la síntesis de proteínas bacteriana.

De los 13 homólogos de *mph* que han sido validados experimentalmente en diferentes estudios [46], se ha demostrado que han sido capturados a través de elementos genéticos móviles lo que implica que tienen un alto riesgo de movilización. Esto coincide con los resultados mostrados en este trabajo, donde la

presencia del gen *mphN* fue adquirido por la cepa JVH47 posiblemente por medio de un plásmido. El que se encuentre en un plásmido da la pauta a la posibilidad de transferencia de este gen a otras bacterias dado a su capacidad de movilizarse por medio del proceso de conjugación o incluso transformación. Esto contribuye a la difusión de la resistencia a los antimicrobianos en la población bacteriana cuyo fenómeno podría complicar el tratamiento de infecciones al aumentar la presencia de bacterias resistentes a los antimicrobianos, lo que hace que el tratamiento sea más difícil o menos efectivo.

Viruloma de la cepa *Exiguobacterium chiriquucha* JVH47

Han existido reportes de infecciones graves asociadas al género *Exiguobacterium*, por lo tanto, se realizó una búsqueda de las proteínas de virulencia que presenta la cepa JVH47 para evaluar su probable patogenicidad tomando en cuenta sólo los resultados considerados como “patógenos” por ambas predicciones (HMM y SVM) para una determinación más confiable. El modelo de Markov Oculto (HMM) es un modelo estadístico que se utiliza para modelar secuencias de datos para inferir estados no observables a partir de datos observables. Mientras que la Máquina de Vectores de Soporte (SVM) utiliza algoritmos de aprendizaje supervisado para clasificar.

Se encontraron (Ver Anexo V) 101 proteínas y entre ellas están presentes las proteínas de resistencia a múltiples fármacos (EbrA y EbrB) que están asociadas con la resistencia a múltiples fármacos en bacterias ya que permiten la expulsión o evita la acción de estos, lo que resulta en una mayor tolerancia a los medicamentos. Adicionalmente se encuentra el sistema de secreción tipo IV (SST4) que le permite secretar proteínas para interactuar con las células del huésped permitiendo su adhesión o influir en las respuestas inmunológicas. Además, se ha encontrado que este sistema puede estar involucrado en la transferencia de genes entre bacterias permitiendo la transferencia de genes de virulencia.

Asimismo, se encontró la proteína BdlA que se encuentra involucrada en la formación y dispersión de biopelículas lo que le facilita una colonización hacia al huésped y una protección contra el sistema inmunológico como a los tratamientos médicos.

Dentro del viruloma también se encontraron dos proteínas denominadas N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa, las cuales son enzimas involucradas en la remodelación de la pared celular pero que también son importantes factores de virulencia en bacterias como *Mycobacterium tuberculosis*. Adicionalmente, también encontramos proteínas bacterianas que contienen dominios tipo Ig que desempeñan una amplia variedad de funciones que incluyen ser parte de las subunidades fimbriales, adhesinas, transportadores de membrana y en varias enzimas que también han sido reportados como factores de virulencia [72]. El papel patógeno de miembros del género *Exiguobacterium* ya ha sido reportado tanto en pacientes sanos como en pacientes inmunocomprometidos. Se han documentado casos de bacteriemia e infección de la piel, así como un caso fatal de neumonía adquirida en la comunidad y bacteriemia por *Exiguobacterium* sp. AT1b/GX59 en un paciente con diabetes mellitus tipo 2 (T2DM) [50]. El viruloma de *Exiguobacterium chiriquucha* JVH47 muestra algunas proteínas candidatas a ser factores de virulencia que requieren un análisis experimental.

El estudio del viruloma de la cepa JVH47 nos indica que nuestro aislado tiene la capacidad potencial para establecerse y provocar infecciones, lo que podría plantear un riesgo para la salud humana debido a su resistencia a varios tipos de medicamentos antimicrobianos, como ha ocurrido con bacterias como *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* que son bacterias cosmopolitas que una vez establecidos en el humano son difíciles de contrarrestar [82].

CONCLUSIONES

Como se propuso, se encontraron cepas bacterianas resistentes a varios antimicrobianos, y esto fue confirmado con las pruebas realizadas a las 26 cepas de bacterias aisladas a partir de una muestra de sedimento proveniente de una inundación con aguas mixtas (pluviales y residuales) en la Ciudad de México.

Para la cepa seleccionada, las caracterizaciones microbiológicas como moleculares permitieron determinar que es una cepa de la especie *Exiguobacterium chiriquucha* la cual fue denominada JVH47 con un tamaño de genoma de 2,983,231 bp. Es una bacteria Gram positiva, móvil, en forma de bacilo corto que no forma esporas y presenta colonias de color naranjas con un tamaño de 3.5 mm de diámetro. Tiene la capacidad de resistir temperaturas desde los 4 a 55 °C así como en valores de pH desde 6 a 11. Es un halófilo con una concentración óptima del 3 % de NaCl, amilasa y proteasa positivo y hemolítico negativo.

Se identificaron 101 proteínas dentro de su genoma involucradas a la virulencia entre ellas el BdlA y se demostró que se encuentra activa debido a que el aislado es un fuerte productor de biopelícula.

Dentro de su resistoma se encuentra un gen diferencial, en comparación con las demás *Exiguobacterium* evaluadas, denominado *mphN* el cual le otorga resistencia fenotípica activa a los macrólidos. Además, presenta una resistencia a la penicilina (1 µg/mL), eritromicina (32 µg/mL), estreptomina y ciprofloxacino, estos dos sin una MIC encontrada según las concentraciones probadas.

PERSPECTIVAS

La evaluación experimental de que los genes *mphN* y *bla*_{TEM116} confieren resistencia a los antimicrobianos en un organismo heterólogo.

Realizar pruebas con diferentes macrólidos para corroborar el amplio rango de *mphN*.

Llevar a cabo ensayos de HGT para evaluar la capacidad de movilización del gen *mphN* posiblemente asociado a un plásmido.

Determinar la virulencia de JVH47 en un modelo *in vitro*.

Cerrar el cromosoma del aislado JVH47 por medio de diferentes técnicas de secuenciación y/o por medio de la calidad del ensamble.

El estudio detallado de los genes de resistencia presentes para identificar la existencia de cambios en su secuencia como inserciones, deleciones e incluso mutaciones.

Realizar un análisis microbiológico y molecular de otra muestra de sedimento extraída del mismo sitio de muestreo realizada en el presente estudio, pero sin una previa inundación para ver si la cepa JVH47 se sigue encontrando presente y evaluar si existen diferencias fenotípicas y/o genotípicas. Esto con la finalidad de comprender si esta cepa solo es encontrada en ambientes con la presión de selección que ejerce la inundación con aguas pluviales y residuales.

Por otro lado, únicamente se estudió a fondo la cepa JVH47 sin embargo, es necesario analizar las 25 bacterias multirresistentes restantes encontradas al inicio del estudio para una investigación más detallada de los genes de resistencia que poseen. Además, hace falta que sea complementado con un estudio metagenómico de la muestra de sedimento para verificar la presencia de estos genes de resistencia.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Fierer, N., & Jackson, R. B. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(3), 626-631.
- [2] Guzmán Trampe, S. (2017). Los microbios y la ecología. *Ciencia-Academia Mexicana de Ciencias*, 68(2), 50-59.
- [3] Garza-Ramos, Ulises, Silva-Sánchez, Jesús, & Martínez-Romero, Esperanza. (2009). Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. *Salud Pública de México*, 51(Supl. 3), s439-s446. Recuperado en 06 de agosto de 2023, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-3634200900090009&lng=es&tlng=es.
- [4] Blair, J. M., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature reviews. Microbiology*, 13(1), 42–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
- [5] Abushaheen, M. A., Fatani, A. J., Alosaimi, M., Mansy, W., George, M., Acharya, S., ... & Jhugroo, P. (2020). Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *Disease-a-Month*, 66(6), 100971.
- [6] Bornbusch, S. L., & Drea, C. M. (2021). Antibiotic resistance genes in lemur gut and soil microbiota along a gradient of anthropogenic disturbance. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 9, 704070.
- [7] Reygaert W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS microbiology*, 4(3), 482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>

- [8] Crofts, T. S., Gasparrini, A. J., & Dantas, G. (2017). Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome. *Nature reviews. Microbiology*, 15(7), 422–434. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.28>
- [9] Aminov, R. I. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Front. Microbiol.*
- [10] de Melo, R. C., de Araújo, B. C., de Bortoli, M. C., & Toma, T. S. (2020). Prevention and control of antimicrobial stewardship: a review of evidence. *Pan American journal of public health*, 44, e35. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.26633/RPSP.2020.35>
- [11] Thomas, C., Nielsen, K. Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria. *Nat Rev Microbiol* 3, 711–721 (2005). <https://doi.org/10.1038/nrmicro1234>
- [12] Frost, L., Leplae, R., Summers, A. et al. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol* 3, 722–732 (2005). <https://doi.org/10.1038/nrmicro1235>
- [13] Wright GD (2010). The antibiotic resistome. *Expert Opin Drug Discov*, 5:779-788
- [14] Larsson, D. J., & Flach, C. F. (2022). Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology*, 20(5), 257-269.
- [15] Alcock, B. P. et al. CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res.* <https://doi.org/10.1093/nar/gkz935> (2019).
- [16] Forsberg, K. J., Reyes, A., Wang, B., Selleck, E. M., Sommer, M. O., & Dantas, G. (2012). The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *science*, 337(6098), 1107-1111.

[17] Smith, D. F. Q., & Casadevall, A. (2022). Disaster Microbiology—a New Field of Study. *mBio*, 13(4), e0168022. <https://doi.org/10.1128/mbio.01680-22>

[18] American Society for Microbiology. 2022. Microbes and climate change—science, people & impacts. <https://asm.org/Reports/Microbes-Climate-Change-Science,-People,-Impacts>.

[19] Waring SC, Brown BJ. 2005. The threat of communicable diseases following natural disasters: a public health response. *Disaster Manag Response* 3:41–47.

[20] Ritchie H, Roser R. 2014. Natural disasters. Our World in Data. <https://ourworldindata.org/natural-disasters>. Recuperado el 16 de abril de 2023.

[21] Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. (2018). Desarrollo de rutas de instrumentación de las contribuciones nacionalmente determinadas en materia de mitigación de gases y compuestos de efecto invernadero (GyCEI) del sector Aguas Residuales de México. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/461753/Aguas_residuales.pdf Recuperado el 16 de abril de 2023.

[22] Reynolds, K. A. (2001). Tratamiento de aguas residuales en Latinoamérica. *Latinoamérica*, 48-49.

[23] Signorello LB, Cohen SS, Williams DR, Munro HM, Hargreaves MK, Blot WJ. 2014. Socioeconomic status, race, and mortality: a prospective cohort study. *Am. J. Public Health* 104 :e98–107.

[24] Nadimpalli, ML, Marks, SJ, Montealegre, MC et al. (2020). Urban informal settlements as sources of resistance to antimicrobials and the need to stop environmental transmission. *Nat Microbiol* 5, 787–795.

[25] Juhas, M., van der Meer, J. R., Gaillard, M., Harding, R. M., Hood, D. W., & Crook, D. W. (2009). Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and

evolution. FEMS microbiology reviews, 33(2), 376–393.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00136.x>

[26] Alcock et al. 2023. CARD 2023: Expanded Curation, Support for Machine Learning, and Resistome Prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Research*, 51, D690-D699.

[27] Lee I, Chalita M, Ha SM, Na SI, Yoon SH, Chun J. (2017). ContEst16S: un algoritmo que identifica genomas procarióticos contaminados usando 16S RNA secuencias de genes *Int J Syst Evol Microbiol*. 67(6):2053-2057.

[28] Gupta, A., Kapil, R., Dhakan, D. B., & Sharma, V. K. (2014). MP3: a software tool for the prediction of pathogenic proteins in genomic and metagenomic data. *PloS one*, 9(4), e93907. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093907>.

[29] De La Iglesia, A. I., & Morbidoni, Y. H. (2006). Mecanismos de acción y de resistencia a rifampicina e isoniacida en *Mycobacterium tuberculosis*: nueva información sobre viejos conocidos. *Revista Argentina de microbiología*, 38(2), 97-109.

[30] Brock, T. D., Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2003). *Brock biology of microorganisms*. Upper Saddle River (NJ): Prentice-Hall, 2003.

[31] Parker, N., Schneegurt, M., Thi Tu, A. H., Foster, B. M., & Lister, P. (2016). *Microbiology (OpenStax)*. OpenStax.

[32] Lopes SP, Ceri H, Azevedo NF, Pereira MO. Antibiotic resistance of mixed biofilms in cystic fibrosis: impact of emerging microorganisms on treatment of infection. *Int J Antimicrob Agents* 2012;40:260-263

[33] Collins MD, Lund BM, Farrow JAE, and Schleifer KH. 1983. Chemotaxonomic study of an alkalophilic bacterium, *Exiguobacterium aurantiacum* gen. nov., sp. nov. *Microbiology* 129:2037–2042

[34] CLSI. 2010. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 20th informational supplement. CLSI document M100-S20. CLSI, Wayne, PA.

[35] Singh NK, Raichand R, Kaur I, Kaur C, Pareek S, and Mayilraj S. 2013. *Exiguobacterium himgiensis* sp. nov. a novel member of the genus *Exiguobacterium*, isolated from the Indian Himalayas. *Antonie Van Leeuwenhoek* 103:789–796.

[36] Vishnivetskaya, T. A., Kathariou, S., & Tiedje, J. M. (2009). The *Exiguobacterium* genus: biodiversity and biogeography. *Extremophiles : life under extreme conditions*, 13(3), 541–555. <https://doi.org/10.1007/s00792-009-0243-5>.

[37] Petra Sudzinová, Hana Šanderová, Tomáš Koval', Tereza Skálová, Nabajyoti Borah, Jarmila Hnilicová, Tomáš Kouba, Jan Dohnálek, Libor Krásný, What the Hel: recent advances in understanding rifampicin resistance in bacteria, *FEMS Microbiology Reviews*, 2022;, fuac051, <https://doi.org/10.1093/femsre/fuac051>

[38] Van den Burg, B., & Eijsink, V. (2004). Thermolysin and related *Bacillus* metallopeptidases. In *Handbook of proteolytic enzymes* (pp. 374-387). Academic Press.

[39] Yang, J., Wang, C., Wu, J., Liu, L., Zhang, G., & Feng, J. (2014). Characterization of a multiresistant mosaic plasmid from a fish farm sediment *Exiguobacterium* sp. isolate reveals aggregation of functional clinic-associated antibiotic resistance genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(4), 1482-1488.

[40] Zhang, D., Zhu, Z., Li, Y., Li, X., Guan, Z., & Zheng, J. (2021). Comparative Genomics of *Exiguobacterium* Reveals What Makes a Cosmopolitan Bacterium. *mSystems*, 6(4), e0038321. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00383-21>

[41] Gobierno de México. (2020). Identifican nueva cepa promotora del crecimiento en plantas (p. <https://www.tuxtla.tecnm.mx/identifican-nueva-cepa-promotora-del-crecimiento-en>

–plantas/). Centro de Ciencias Genómicas-UNAM- TecNM Tuxtla Gutiérrez: Departamento de Comunicación y Difusión.

[42] White III, R. A., Soles, S. A., Gavelis, G., Gosselin, E., Slater, G. F., Lim, D. S., ... & Suttle, C. A. (2019). The complete genome and physiological analysis of the eurythermal Firmicute *Exiguobacterium chiriquucha* strain RW2 isolated from a freshwater microbialite, widely adaptable to broad thermal, pH, and salinity ranges. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3189.

[43] Gutiérrez-Preciado, A., Vargas-Chávez, C., Reyes-Prieto, M., Ordoñez, O. F., Santos-García, D., Rosas-Pérez, T., Valdivia-Anistro, J., Rebollar, E. A., Saralegui, A., Moya, A., Merino, E., Farías, M. E., Latorre, A., & Souza, V. (2017). The genomic sequence of *Exiguobacterium chiriquucha* str. N139 reveals a species that thrives in cold waters and extreme environmental conditions. *PeerJ*, 5, e3162. <https://doi.org/10.7717/peerj.3162>.

[44] Heir, E., Sundheim, G., & Holck, A. L. (1999). The *qacG* gene on plasmid pST94 confers resistance to quaternary ammonium compounds in staphylococci isolated from the food industry. *Journal of applied microbiology*, 86(3), 378–388. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00672.x>.

[45] Xu, X., Lin, D., Yan, G., Ye, X., Wu, S., Guo, Y., Zhu, D., Hu, F., Zhang, Y., Wang, F., Jacoby, G. A., & Wang, M. (2010). *vanM*, a new glycopeptide resistance gene cluster found in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(11), 4643–4647. <https://doi.org/10.1128/AAC.01710-09>.

[46] Pawlowski, A. C., Stogios, P. J., Koteva, K., Skarina, T., Evdokimova, E., Savchenko, A., & Wright, G. D. (2018). The evolution of substrate discrimination in macrolide antibiotic resistance enzymes. *Nature communications*, 9(1), 112. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02680-0>.

[47] Tena, D., Martínez, N. M., Casanova, J., García, J. L., Román, E., Medina, M. J., & Sáez-Nieto, J. A. (2014). Possible *Exiguobacterium sibiricum* skin infection in

human. *Emerging infectious diseases*, 20(12), 2178–2179.
<https://doi.org/10.3201/eid2012.140493>

[48] Khan, A., Mi, H., Gao, F., Hu, Q., Gu, X., Ma, F., Qu, L., Li, S., Dai, Y., & Hao, H. (2023). Dynamic changes of the gut microbial colonization in preterm infants with different time points after birth. *Frontiers in microbiology*, 14, 1078426.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1078426>.

[49] Cui, P., Feng, L., Zhang, L., He, J., An, T., Fu, X., ... & Yang, X. (2020). Antimicrobial resistance, virulence genes, and biofilm formation capacity among *Enterococcus* species from Yaks in Aba Tibetan autonomous prefecture, China. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1250.

[50] Chen, X., Wang, L., Zhou, J., Wu, H., Li, D., Cui, Y., & Lu, B. (2017). *Exiguobacterium* sp. A1b/GX59 isolated from a patient with community-acquired pneumonia and bacteremia: genomic characterization and literature review. *BMC infectious diseases*, 17(1), 1-7.

[51] Seemann, T. (2016). ABRicate: mass screening of contigs for antibiotic resistance genes.

[52] Lin, Q., Xavier, BB, Alako, BTF et al. La detección de microbiomas globales implica límites ecológicos que afectan la distribución y diseminación de genes de resistencia a los antimicrobianos clínicamente relevantes. *Commun Biol* 5 , 1217 (2022). <https://doi.org/10.1038/s42003-022-04187-x>

[53] Maltezou, H. C. (2009). Metallo- β -lactamases in Gram-negative bacteria: introducing the era of pan-resistance?. *International journal of antimicrobial agents*, 33(5), 405-e1.

[54] Osmanoğlu, B., Dixon, T. H., Wdowinski, S., Cabral-Cano, E., & Jiang, Y. (2011). Mexico City subsidence observed with persistent scatterer InSAR. *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation*, 13(1), 1-12.

- [55] Baus, D. (2017). Overpopulation and the Impact on the Environment.
- [56] Uniyal, S., Paliwal, R., Kaphaliya, B., & Sharma, R. K. (2020). Human overpopulation: Impact on environment. In *Megacities and rapid urbanization: Breakthroughs in research and practice* (pp. 20-30). IGI Global.
- [57] Foster, S. S. D., & Chilton, P. J. (2003). Groundwater: the processes and global significance of aquifer degradation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 358(1440), 1957-1972.
- [58] Zhang Y, Marrs CF, Simon C, Xi C. Wastewater treatment contributes to selective increase of antibiotic resistance among *Acinetobacter* spp. *Sci. Total Environ.* 2009;407:3702–3706. doi: 10.1016/j.scitotenv.2009.02.013.
- [59] Kristich, C. J., Rice, L. B., & Arias, C. A. (2014). Enterococcal Infection—Treatment and Antibiotic Resistance. In M. S. Gilmore (Eds.) et. al., *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Massachusetts Eye and Ear Infirmary.
- [60] Oikonomou, K. G., McWilliams, C. S., & Moussa, M. M. (2018). *Oerskovia* Species Bacteremia in a Diabetic Patient. *Journal of global infectious diseases*, 10(2), 113–114. https://doi.org/10.4103/jgid.jgid_67_17
- [61] Molle, V., Fujita, M., Jensen, S. T., Eichenberger, P., González-Pastor, J. E., Liu, J. S., & Losick, R. (2003). The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology*, 50(5), 1683-1701.
- [62] Espitia-Rocha, C., Gutierrez-Rojas, I., & Espitia-Rivera, H. (2009). Producción de etanol a partir de cebada no malteada hidrolizada con α y β amilasas comerciales. *Universitas Scientiarum*, 14(2-3), 164-172.
- [63] Altarriba, M. (2003). Operones que codifican la flagelación polar de aeromonas spp (Doctoral dissertation, Universitat de Barcelona).

[64] Fraser, G. M., & Hughes, C. (1999). Swarming motility. *Current opinion in microbiology*, 2(6), 630-635.

[65] Rizzo L, et al. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. *Sci. Total Environ.* 2013;447:345–360. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.01.032.

[66] Siguier P. et al. (2006) ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res.* 34: D32-D36 (link pubmed) and the database URL (<http://www-is.biotoul.fr>)

[67] Darby, E. M., Trampari, E., Siasat, P., Gaya, M. S., Alav, I., Webber, M. A., & Blair, J. M. (2023). Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nature Reviews Microbiology*, 21(5), 280-295.

[68] Kunst, F. J., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., ... & Yoshikawa, H. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390(6657), 249-256.

[69] Xu, Q., Chiu, H. J., Farr, C. L., Jaroszewski, L., Knuth, M. W., Miller, M. D., Lesley, S. A., Godzik, A., Elsliger, M. A., Deacon, A. M., & Wilson, I. A. (2014). Structures of a bifunctional cell wall hydrolase CwIT containing a novel bacterial lysozyme and an NlpC/P60 DL-endopeptidase. *Journal of molecular biology*, 426(1), 169–184. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.09.011>

[70] Pimentel, Z. T., & Zhang, Y. (2018). Evolution of the natural transformation protein, ComEC, in bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 2980.

[71] González-Montes, L., Del Campo, I., Garcillán-Barcia, M. P., de la Cruz, F., & Moncalián, G. (2020). ArdC, a ssDNA-binding protein with a metalloprotease domain, overpasses the recipient hsdRMS restriction system broadening conjugation host range. *PLoS genetics*, 16(4), e1008750.

[72] Hüttener, M., Hergueta, J., Bernabeu, M., Prieto, A., Aznar, S., Merino, S., Tomás, J., & Juárez, A. (2022). Roles of Proteins Containing Immunoglobulin-Like Domains in the Conjugation of Bacterial Plasmids. *mSphere*, 7(1), e0097821. <https://doi.org/10.1128/msphere.00978-21>

[73] Wakelin SA, Colloff MJ, Kookana RS. Effect of wastewater treatment plant effluent on microbial function and community structure in the sediment of a freshwater stream with variable seasonal flow. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008;74:2659–2668. doi: 10.1128/AEM.02348-07

[74] Numberger, D., Ganzert, L., Zoccarato, L., Mühlendorfer, K., Sauer, S., Grossart, H. P., & Greenwood, A. D. (2019). Characterization of bacterial communities in wastewater with enhanced taxonomic resolution by full-length 16S ARNr sequencing. *Scientific reports*, 9(1), 9673.

[75] Centers for Disease Control and Prevention. (2023). One Health Basics. Recuperado el 18 de octubre de 2023 en <https://www.cdc.gov/onehealth/basics/index.html>

[76] López-Velandia, D. P., Torres-Caycedo, M. I., & Prada-Quiroga, C. F. (2016). Genes de resistencia en bacilos Gram negativos: Impacto en la salud pública en Colombia. *Universidad y salud*, 18(1), 190-202.

[77] Cruz, E. M. C. (2015). antimicrobianos vs. resistencia bacteriana. *Revista Electrónica Dr. Zoilo E. Marinello Vidaurreta*, 40(2).

[78] Acharya Tankeshwar. (2021). Beta-Lactam Antibiotics: Mechanism of Action, Resistance. Recuperado el 18 de octubre de 2023 en <https://microbeonline.com/beta-lactam-antibiotics-mechanism-action-resistance/>

[79] Serisier D. J. (2013). Risks of population antimicrobial resistance associated with chronic macrolide use for inflammatory airway diseases. *The Lancet. Respiratory medicine*, 1(3), 262–274. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(13\)70038-9](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(13)70038-9)

[80] Blokesch, M. (2015). Protocols for Visualizing Horizontal Gene Transfer in Gram-Negative Bacteria Through Natural Competence. In: McGenity, T.J., Timmis, K.N., Nogales, B. (eds) Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols. Springer Protocols Handbooks. Springer, Berlin, Heidelberg.
https://doi.org/10.1007/8623_2015_46

[81] Meulenbergh, J. J., Petersen-Den Besten, A., De Kluyver, E. P., Moormann, R. J., Schaaper, W. M., & Wensvoort, G. (1995). Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. *Virology*, 206(1), 155-163.

[82] Fariñas, M. C., & Martínez-Martínez, L. (2013). Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 31(6), 402-409.

ANEXOS

I. Medios de cultivo

Fórmulas aproximadas por litro de agua purificada

Agar BHI

Infusión cerebro y corazón 8.0 g

Peptona de carne 5.0 g

Peptona de caseína 16.0 g

Cloruro de sodio 5.0 g

Dextrosa 2.0 g

Fosfató disodico 2.5 g

Agar 13.5 g

Agar XLD

Xilosa 3.5 g

L-Lisina 5.0 g

Lactosa 7.5 g

Sacarosa 7.5 g

Cloruro de sodio 5.0 g

Extracto de levadura 3.0 g

Rojo fenol 0.08 g

Agar 13.50 g

Desoxicolato de sodio 2.50 g

Tiosulfato de sodio 6.80 g

Citrato de hierro y amonio 0.80 g

Agar CLED

Peptona de caseína 4.0 g

Extracto de carne 3.0 g

Peptona de gelatina 4.0 g

Lactosa 10.0 g

L-Cistina 128.0 mg

Azul de bromotimol 20 mg

Agar 15.0 g
Agar LIA
Digerido pancreático de gelatina 5.0 g
Extracto de levadura 3.0 g
Dextrosa 1.0 g
L-Lisina 10.0 g
Citrato férrico de amonio 0.5 g
Tiosulfato sódico 0.04 g
Púrpura de bromocresol 0.02 g
Agar 13.5 g

Agar VB
Extracto de levadura 3.0 g
BD Bacto Proteose Peptone 10.0 g
Lactosa 10.0 g
Sacarosa 10.0 g
Cloruro de sodio 5.0 g
Rojo fenol 0.08 g
Agar 20.0 g
Verde brillante 12.5 mg

Agar McC
Digerido pancreático de gelatina 17.0 g
Digerido pancreático de caseína 1.5 g
Digerido péptico de tejido animal 1.5 g
Lactosa 10.0 g
Sales biliares 1.5 g
Cloruro sódico 5.0 g
Rojo neutro 0.03 g
Cristal violeta 0.001 g
Agar 13.5 g

Agar TSI
Digerido pancreático de caseína 10.0 g

Digerido péptico de tejido animal 10.0 g
Cloruro sódico 5.0 g
Lactosa 10.0 g
Sacarosa 10.0 g
Glucosa 1.0 g
Sulfato ferroso de amonio 0.2 g
Tiosulfato sódico 0.2 g
Rojo fenol 0.025 g
Agar 13.0 g

Agar MS

Extracto de carne bovina 1.0 g
Digerido pancreático de caseína 5.0 g
Digerido péptico de tejido animal 5.0 g
Cloruro sódico 75.0 g
D-manitol 10.0 g
Rojo fenol 0.025 g
Agar 15.0 g

Agar SyB

Extracto de carne 5.0 g
Peptona de carne 5.0 g
Peptona de caseína 5.0 g
D (+) Glucosa 5.0 g
Hidrógeno fosfato di sódico 4.0 g
Sulfato de hierro (III) 0.3 g
Verde brillante 0.025 g
Indicador bismuto-sulfito 8.0 g
Agar 15.0 g

Caldo Mueller-Hinton Cation Ajustado

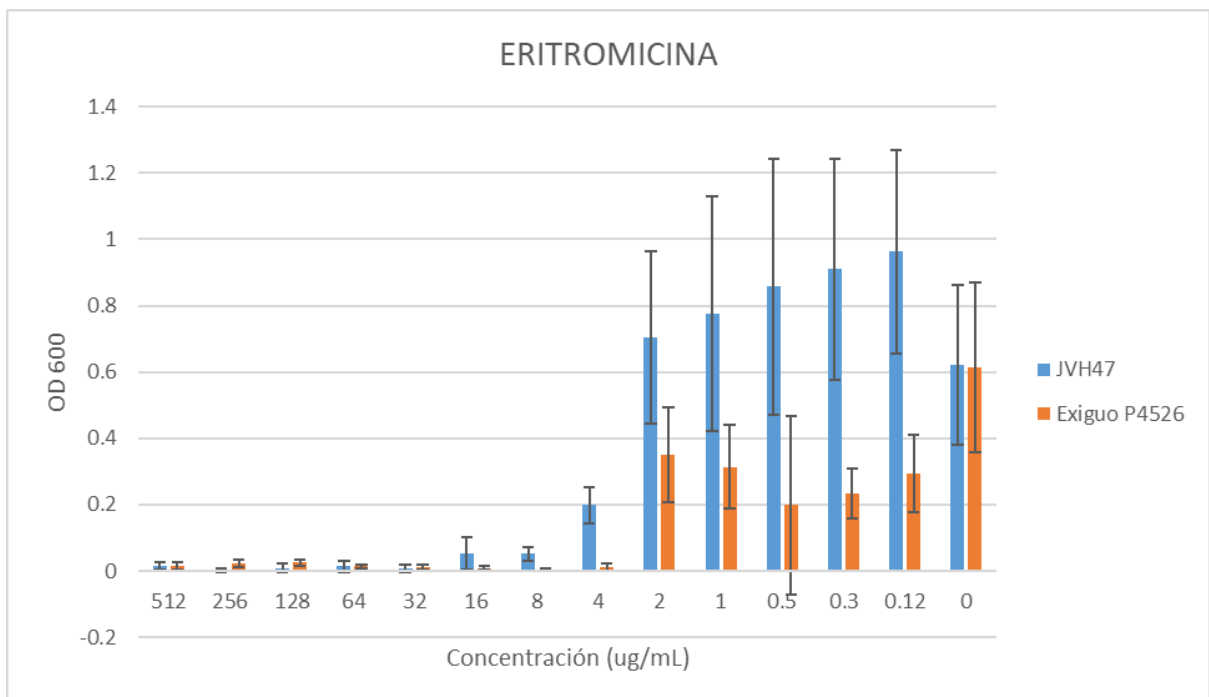
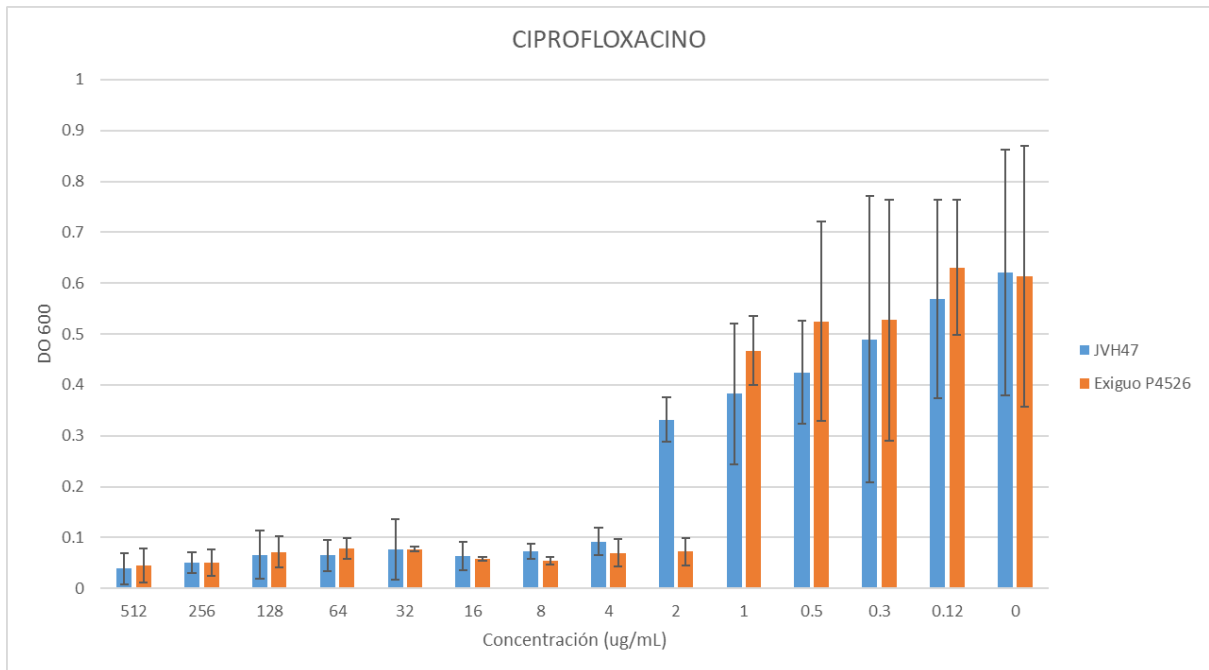
Extracto de carne bovina 3.0 g
Hidrolizado ácido de caseína 17.5 g
Almidón 1.5 g

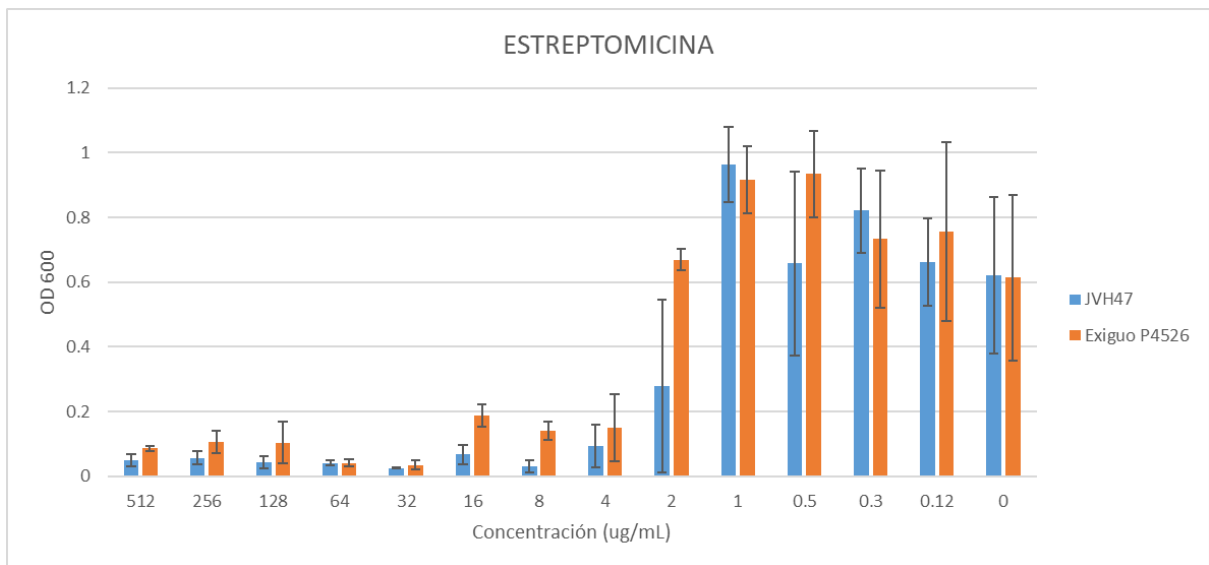
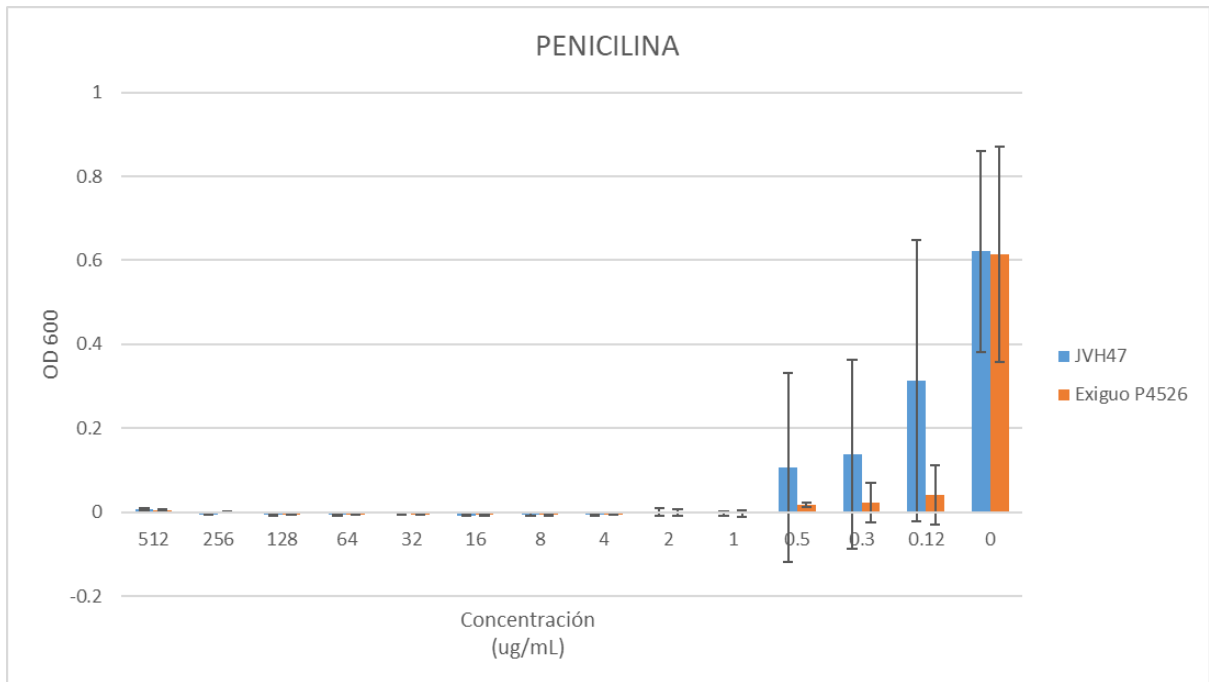
II. Type Strain Genome Server

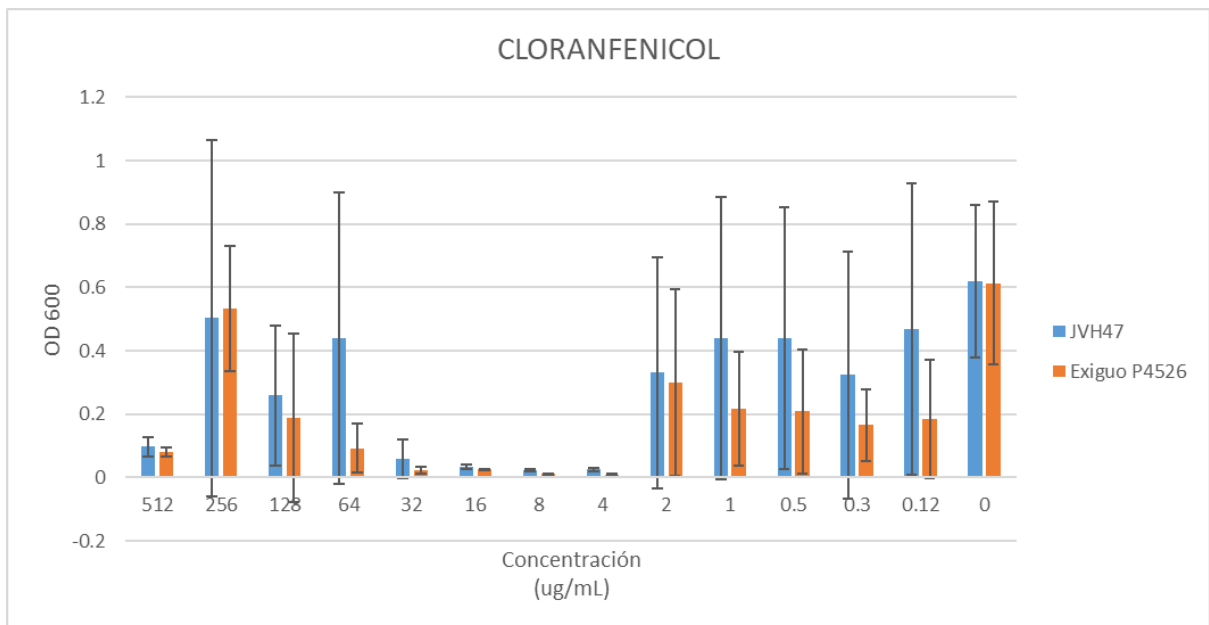
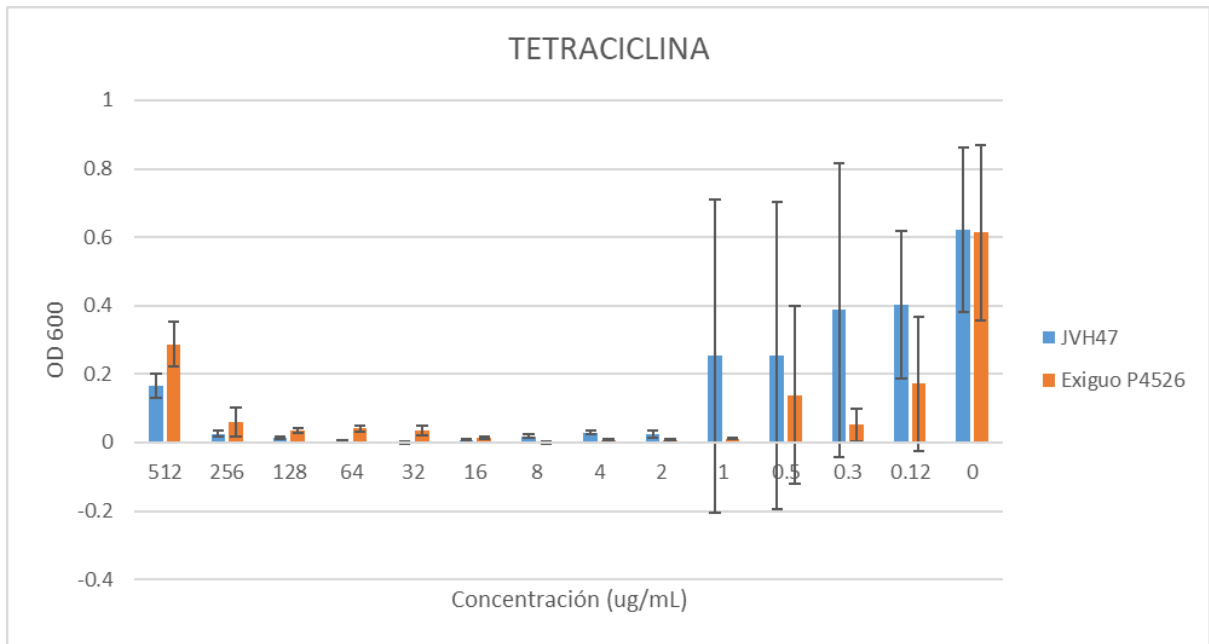
Strain	Conclusion	Identification result	Remark
JVH47	belongs to known species	<i>Exiguobacterium chiriquucha</i>	

Resultados del servidor Type (Strain) Genome Server (TYGS)

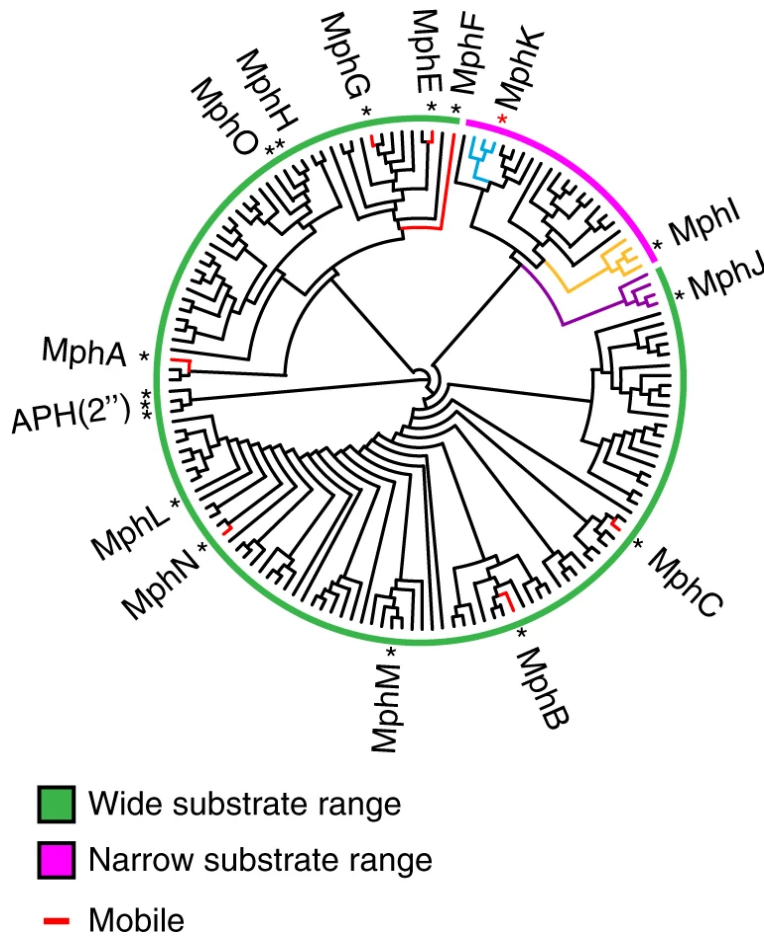
III. Gráficas determinación de susceptibilidad antimicrobiana







IV. Reconstrucción filogenética de macrólidos fosfotransferasas



Reconstrucción filogenética de macrólidos fosfotransferasas. Las barras de colores representan la especificidad de sustrato predicha en función de la agrupación filogenética de Mphs conocidos y sus homólogos. Los asteriscos representan Mphs validados experimentalmente, y el asterisco rojo representa MphK, que se identificó a partir de este análisis como un Mph que no confiere resistencia a macrólidos de cladinosa C3. Las porciones coloreadas del árbol filogenético resaltan los grupos de interés. Recuperado el 20/08/2023 de [46]

V. Proteínas de virulencia

Sequence name	Type of Pfam domain(s)	HMM Prediction	SVM prediction	Hybrid Prediction	Assignment	Name
EGHCFAJG_00048	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	TRANSPORT PERMEASE YVFS-RELATED
EGHCFAJG_00265	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	Putative penicillin-binding protein PbpX
EGHCFAJG_00375	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	HTH-type transcriptional activator TipA
EGHCFAJG_00403	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	putative doxorubicin resistance ABC transporter permease protein DrrC
EGHCFAJG_00405	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	SH3 domain-containing C40 family peptidase [unclassified Exiguobacterium]
EGHCFAJG_00449	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	Flagellar basal-body rod protein FlgG
EGHCFAJG_00450	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	Flagellar basal-body rod protein FlgG
EGHCFAJG_00459	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	Ig-like domain-containing protein [unclassified Exiguobacterium]
EGHCFAJG_00472	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	peptidoglycan DD-metalloendopeptidase family protein Exiguobacterium
EGHCFAJG_00527	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	hypothetical protein [unclassified Exiguobacterium]
EGHCFAJG_00531	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	putative signaling protein
EGHCFAJG_00542	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	Na(+), Li(+), K(+)/H(+) antiporter
EGHCFAJG_00583	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	Ig-like domain-containing protein [Exiguobacterium mexicanum]
EGHCFAJG_00604	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	Ig-like domain-containing protein [Exiguobacterium sp. s157]
EGHCFAJG_00607	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	PgaD family protein Exiguobacterium
EGHCFAJG_00615	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	SH3 domain-containing protein [Exiguobacterium chiriquicha]
EGHCFAJG_0	Exclusive	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	C40 family peptidase

0631	Pathogenic	c	c	c		Exiguobacterium
EGHCFAJG_00641	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	Multidrug resistance protein EbrA
						Multidrug resistance protein EbrB
EGHCFAJG_00656	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	Ig-like domain-containing protein Exiguobacterium
EGHCFAJG_00677	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	ABC transporter permease Exiguobacterium
EGHCFAJG_00698	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	FtsX-like permease family protein [Exiguobacterium sp. s36]
EGHCFAJG_00703	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	RDD family protein Exiguobacterium
EGHCFAJG_00719	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	putative transmembrane protein YxIG
EGHCFAJG_00720	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	C39 family peptidase [Exiguobacterium sp. s194]
EGHCFAJG_00722	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	CAP domain-containing protein [unclassified Exiguobacterium]
EGHCFAJG_00740	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	ABC transporter permease [Exiguobacterium sp. s26]
EGHCFAJG_00771	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	Putative protein YhaP
EGHCFAJG_00815	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	Flagellar hook-associated protein 2
EGHCFAJG_00816	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	Flagellar secretion chaperone FliS
EGHCFAJG_00913	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	Na(+), Li(+), K(+)/H(+) antiporter
EGHCFAJG_00926	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	Tetracycline resistance protein, class C
EGHCFAJG_00938	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	S8 family serine peptidase [unclassified Exiguobacterium]
EGHCFAJG_00959	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase [Exiguobacterium sp. s26]
EGHCFAJG_00982	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	Na(+), Li(+), K(+)/H(+) antiporter
EGHCFAJG_00991	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	MFS transporter [unclassified Exiguobacterium]
EGHCFAJG_0	Exclusive	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	DUF948 domain-containing

1013	Pathogenic	c	c	c		protein Exiguobacterium
EGHCFAJG_01029	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	Thiol peroxidase
EGHCFAJG_01032	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	3D domain-containing protein Exiguobacterium
EGHCFAJG_01034	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	serine hydrolase domain-containing protein Exiguobacterium
EGHCFAJG_01103	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	S8 family serine peptidase [Exiguobacterium sp. s26]
EGHCFAJG_01175	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	prepilin-type N-terminal cleavage/methylation domain-containing protein [Exiguobacterium sp. IPC13]
EGHCFAJG_01326	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	M15 family metallopeptidase [unclassified Exiguobacterium]
EGHCFAJG_01345	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	CapA family protein [unclassified Exiguobacterium]
EGHCFAJG_01382	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	S8 family serine peptidase [unclassified Exiguobacterium]
EGHCFAJG_01395	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	serine hydrolase [Exiguobacterium chiriqhucha]
EGHCFAJG_01408	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	Na(+), Li(+), K(+)/H(+) antiporter
EGHCFAJG_01412	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	D-methionine-binding lipoprotein MetQ
EGHCFAJG_01440	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	ATPase RavA
EGHCFAJG_01458	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	SH3 domain-containing protein Exiguobacterium
EGHCFAJG_01485	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	peptidoglycan DD-metalloendopeptidase family protein Exiguobacterium
EGHCFAJG_01536	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase family protein [unclassified Exiguobacterium]
EGHCFAJG_01544	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	MFS transporter [unclassified Exiguobacterium]
EGHCFAJG_01593	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	GGDEF domain-containing protein Exiguobacterium
EGHCFAJG_0	Exclusive	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	ABC transporter permease

1614	Pathogenic	c	c	c		subunit Exiguobacterium
EGHCFAJG_01637	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	Thermolysin
EGHCFAJG_01638	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	ABC transporter permease Exiguobacterium
EGHCFAJG_01845	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	flagellar basal-body MS-ring/collar protein FliF Exiguobacterium
EGHCFAJG_01851	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	flagellar hook-length control protein FliK Exiguobacterium
EGHCFAJG_01853	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	Flagellar basal-body rod protein FlgG
EGHCFAJG_01860	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	Flagellar biosynthetic protein FliP
EGHCFAJG_01861	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	Flagellar biosynthetic protein FliQ
EGHCFAJG_01862	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	Flagellar biosynthetic protein FliR
EGHCFAJG_01864	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	Flagellar biosynthesis protein FliA
EGHCFAJG_01955	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	Dipeptide-binding protein DppE
EGHCFAJG_01956	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	Dipeptide-binding protein DppE
EGHCFAJG_01959	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	Dipeptide-binding protein DppE
EGHCFAJG_01971	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	competence protein CoiA family protein [Exiguobacterium chiriqhucha]
EGHCFAJG_02023	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	Staphyloferrin B transporter
EGHCFAJG_02074	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	G5 domain-containing protein [unclassified Exiguobacterium]
EGHCFAJG_02075	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	prepilin-type N-terminal cleavage/methylation domain-containing protein [unclassified Exiguobacterium]
EGHCFAJG_02076	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	prepilin-type N-terminal cleavage/methylation domain-containing protein [Exiguobacterium sp. s157]
EGHCFAJG_02123	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	putative ABC transporter permease YtrC

EGHCFAJG_02156	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	Glutathione peroxidase BsaA
EGHCFAJG_02157	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	CAP domain-containing protein [Exiguobacterium sp. s151]
EGHCFAJG_02172	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	MFS transporter [unclassified Exiguobacterium]
EGHCFAJG_02181	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	ABC transporter permease subunit Exiguobacterium
EGHCFAJG_02191	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	YrvL family regulatory protein [unclassified Exiguobacterium]
EGHCFAJG_02352	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	putative MFS-type transporter YcaD
EGHCFAJG_02398	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	putative MFS-type transporter YfcJ
EGHCFAJG_02407	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	ABC transporter permease [Exiguobacterium chiriqhucha]
EGHCFAJG_02416	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	SH3 domain-containing protein [Exiguobacterium sp. s26]
EGHCFAJG_02449	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	LPXTG cell wall anchor domain-containing protein [unclassified Exiguobacterium]
EGHCFAJG_02495	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	Guanidinium exporter
EGHCFAJG_02496	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	putative guanidinium efflux system subunit GdnD
EGHCFAJG_02530	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	Transcriptional activator NprA
EGHCFAJG_02533	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase [unclassified Exiguobacterium]
EGHCFAJG_02540	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	AAA family ATPase [Exiguobacterium sp. s6]
EGHCFAJG_02560	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	ABC transporter permease Exiguobacterium
EGHCFAJG_02581	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	Enterobactin exporter EntS
EGHCFAJG_02593	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	ABC transporter permease Exiguobacterium
EGHCFAJG_02621	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	Putative ABC transporter ATP-binding protein YheS
EGHCFAJG_0	Exclusive	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	Phosphatidylglycerol

2636	Pathogenic	c	c	c		lysyltransferase
EGHCFAJG_02651	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	Membrane lipoprotein Tpn32
EGHCFAJG_02664	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	Cell wall-associated protease
EGHCFAJG_02705	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	M15 family metallopeptidase [unclassified Exiguobacterium]
EGHCFAJG_02759	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	putative ABC transporter ATP-binding protein YbiT
EGHCFAJG_02782	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	Enterobactin exporter EntS
EGHCFAJG_02827	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	MFS transporter
EGHCFAJG_03008	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	type IV secretory system conjugative DNA
EGHCFAJG_03068	Exclusive Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	HS	Thiol-disulfide oxidoreductase ResA

VI. ISFinder

> ISMma12 Family: IS5
Length=875

Score = 34.2 bits (17), Expect = 0.20
Identities = 17/17 (100%), Gaps = 0/17 (0%)
Strand=Plus/Minus

```
Query 332 TCTAATCCTTTATTTTT 348
          |||
Sbjct 351 TCTAATCCTTTATTTTT 335
```

> ISVa5 Family: IS66
Length=2381

Score = 32.2 bits (16), Expect = 0.80
Identities = 16/16 (100%), Gaps = 0/16 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 316 GCTATTCTCTAACACA 331
          |||
Sbjct 2175 GCTATTCTCTAACACA 2190
```

> ISBt2 Family: IS3
Length=1293

Score = 32.2 bits (16), Expect = 0.80
Identities = 16/16 (100%), Gaps = 0/16 (0%)
Strand=Plus/Minus

```
Query 434 CTTTTTCATTTCAATC 449
          |||
Sbjct 158 CTTTTTCATTTCAATC 143
```

> IScco1 Family: IS200/IS605
Length=1871

Score = 30.2 bits (15), Expect = 3.2
Identities = 18/19 (95%), Gaps = 0/19 (0%)
Strand=Plus/Minus

```
Query 331 ATCTAATCCTTTATTTTT 349
          |||
Sbjct 719 ATCTAATCCTTTATTTTT 701
```

> ISSha1 Family: ISL3
Length=1489

Score = 30.2 bits (15), Expect = 3.2
Identities = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 383 TCCAATTTTATGTT 397
          |||
Sbjct 42 TCCAATTTTATGTT 56
```

> ISSc1 Family: IS30
Length=8273

Score = 30.2 bits (15), Expect = 3.2
Identities = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)
Strand=Plus/Minus

```
Query 100 ATCTAATTGCTTATA 114
          |||
Sbjct 2454 ATCTAATTGCTTATA 2440
```

VII. PlasFlow

	Nodo	Pares de bases	Plásmido
11	11 NODE_12_length_74506_cov_43.202717	74506	23 plasmid.unclassified

APÉNDICE

I. Protocolo de extracción de ADN para bacterias Gram positivas

En campana (esterilidad)

1.- Tomar el tubo con el cultivo overnight y centrifugar por 5 min a 8000 rpm. Quitar el sobrenadante.

2.- Resuspender el pellet en 250 uL de buffer TES. (75 mM NaCl, 25 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl).

3.- Agregar 50 uL de lisozima 10 mg/mL y resuspender suavemente.

*La lisozima se prepara el día que se va a usar, se prepara el stock de 10 mg/mL (0,01 g) en H₂O MiliQ.

4.- Incubar a 37 °C por 30 min.

5.- Adicionar 60 uL de SDS 10 % y 5 uL de proteinasa K (20 mg/mL).

*La proteinasa K se prepara el día que se va a usar, se prepara el stock 20 mg/mL (0,02 g) en H₂O MiliQ.

6.- Incubar por 20 min a 55 °C

* Dos opciones: 1° En agua a 55 °C

2° En termobloque a 55 °C

En mesa (no esterilidad)

7.- Agregar 250 uL de fenol:cloroformo y agitar vigorosamente por 3 min.

8.- Centrifugar por 5 min a 14000 rpm.

9.- Pasar la fase acuosa a un tubo nuevo (eppendorf de DNA con cloroformo).

*Por lo general se pueden tomar máximo 300 uL, sacar la fase acuosa con una p200 e ir tomando volúmenes de 100 uL, así se va a tener una idea del volumen que se va a sacar.

10.- Agregar 1:1 volumen de cloroformo.

*Ejemplo: Si se tomaron 300 uL en el punto 9, se agregan 300 uL de cloroformo

11.- Realizar un pequeño vortex y centrifugar por 5 min a 14000 rpm.

12.- Pasar la fase acuosa en un tubo nuevo (eppendorf de DNA).

*Por lo general se pueden tomar máximo 300 uL, sacar la fase acuosa con una p200 e ir tomando volúmenes de 100 uL, así se va a tener una idea del volumen que se va a sacar.

13.- Agregar 1/10 volumen de 5 M NaCl y 1 mL de Etanol abs frio. Agitar por inversión suavemente.

* Ejemplo: Si se tomaron 200 uL en el punto 12, se agregan 20 uL de NaCl.

14.- Incubar a -20 °C por 15 min.

*En este punto puede dejar más tiempo de incubación, por si tiene que hacer otra cosa.

15.- Centrifugar por 10 min a 14000 rpm.

16.- Descartar el sobrenadante, tener cuidado con el pellet. *No siempre se ve.

17.- Agregar 1 mL de etanol al 70 %.

18.- Realizar un pequeño vortex y centrifugar por 10 min a 14000 rpm.

19.- Descartar el sobrenadante, tener cuidado con el pellet. *No siempre se ve.

En campana (esterilidad)

20.- Dejar secando a temperatura ambiente y luego agregar 30 uL de H₂O con RNAasa al 4 % (2 uL de RNAasa en 50 uL de H₂O milli Q)

21.- Guardar a 4 °C.

NOTAS

*El tubo de DNA debe quedar rotulado y con fecha de extracción.

*Se deberá correr un gel de agarosa para confirmar que funcionó la extracción y ver la integridad del DNA. Gel de agarosa 0.8 % o 1% (Ver protocolo electroforesis)

II. Protocolo electroforesis en gel de agarosa.

1.-Preparación del gel en matraz de 250 mL. Hay 3 opciones:

1)Al 0.8 %: 0.8 g de agarosa en 100 mL de buffer TAE 1X

2)Al 1.0 %: 1.0 g de agarosa en 100 mL de buffer TAE 1X

3)Al 1.5 %: 1.5 g de agarosa en 100 mL de buffer TAE 1X

*El volumen puede variar según la cámara a utilizar por lo que es necesario ajustar los gramos a pesar. Aproximadamente: cámara grande: 80 mL, cámara mediana: 50 mL, cámara pequeña: 20 mL

2.-Colocar tapa y calentar aproximadamente por 1 min en microondas.

*Cuidar el matraz ya que se puede proyectar y utilizar guantes de punto

3.-Vertir en el soporte y colocar peine.

*Si el soporte tiene goma es necesario dejar enfriar un poco. Se coloca el peine según el número de pocillos que se desee.

4.-Al gelificar, retirar el peine.

*Con cuidado y en un solo movimiento para no descabezar el gel.

5.- Colocar el soporte en cámara o acomodar el soporte como se requiere.

6.- Llenar la cámara con buffer TAE 1X.

*Es necesario que se cubra el gel.

7.-Cargar muestras y DNA Ladder con buffer de carga. Hay 2 opciones:

1)En parafilm, colocar 1 uL de buffer de carga y 5 uL de muestra. Mezclar con ayuda de la micropipeta hasta obtener un color uniforme. Agregar toda la mezcla al pocillo (6 uL).

2) En tubo eppendorf, colocar 1 uL de buffer de carga y 5 uL de muestra. Mezclar con ayuda de la micropipeta hasta obtener un color uniforme. Agregar toda la mezcla al pocillo (6 uL).

*Cambiar punta por muestra y tener cuidado de no picar el gel, se puede ocupar un fondo negro que ayude a la observación.

8.-Colocar la tapa de la cámara y enchufar los cables al polo correspondiente [por lo regular, el rojo es el anodo (+) y el negro es el cátodo (-)]

*Recordar que el DNA tiene carga negativa (por los grupos fosfatos) por lo que migrará hacia el polo positivo (rojo) entonces se tiene que colocar el gel de tal forma que las muestras corran en la dirección correcta.

9.-Ajustar la fuente de poder a los volts y el tiempo necesario. Iniciar la corrida.

10.-Ir observando el gel durante el tiempo colocado para evitar que se salgan las muestras.

11.-Transcurrido el tiempo, retirar el gel del soporte y teñirlo con bromuro de etidio (BrEt) por 15 min.

*Tener cuidado ya que es un agente intercalante, por lo que es necesario usar guantes exclusivos para manejarlo y apoyarse con una espátula.

12.-Observar con ayuda de un transiluminador y tomar captura.

*Ajustar exposición si es necesario (Normalmente al 0.5). No observar la luz UV que emite el transiluminador.

Notas

*Buffer TAE 50X pH: 8.5 1 L

-242 g Tris

-57.1 mL Ácido acético

-37.2 g Na₂EDTA