



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Análisis de la actividad antimicrobiana de bacterias aisladas de la piel del
ajolote *Ambystoma altamirani*”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE: MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

PRESENTA

Biol. María Mónica Aragón García

Director de tesis

Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán
[Instituto de Biotecnología / UNAM](#)

Comité tutorial

Dra. Eria Alaide Rebollar Caudillo
[Centro de Ciencias Genómicas / UNAM](#)

Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo
[Instituto de Biotecnología / UNAM](#)

Cuernavaca, Morelos. Junio, 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.

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico con todo mi cariño a mis abuelitos Sol y Adrián que desde el cielo sé que me siguen acompañado y guiando en cada paso que doy, su amor ha sido una luz en mis momentos más oscuros. Especialmente le dedico este trabajo a mi abuelita Abundia que ahora se encuentra con ellos, gracias por todo tu cariño, tus consejos y el apoyo que me diste durante todos estos años, gran parte de lo que soy y seré es gracias a ti. Los llevo siempre en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de tesis fue realizado en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en el departamento de Microbiología Molecular, gracias al apoyo de muchas personas, por ello mi agradecimiento.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada 788535 que me permitió realizar mis estudios de posgrado; al donativo - Problemas Nacionales no. 2017-01-5182 gracias por el apoyo a la investigación y a la formación de jóvenes científicos.

A mi director de tesis, el Dr. Víctor Bustamante, por creer en mí, por abrirme las puertas de su laboratorio y darme la oportunidad de seguir creciendo profesionalmente; por los consejos, la paciencia, el conocimiento y la motivación recibida.

A mi comité tutorial, la Dra. Eria Rebollar y la Dra. Guadalupe Espín, gracias por todas sus observaciones, sugerencias y correcciones durante mi formación, por enseñarme que siempre se puede mejorar.

A mis compañeros de laboratorio. A Luis y Ramsés por compartir sus conocimientos conmigo y por siempre resolver mis dudas, a Cynthia por el equipo que formamos, por su apoyo en todo momento y especialmente por su amistad, y a todos mis compañeros del grupo: Jessica, Marcos, Dania, Magaly, Astrid, Fernando y Javier, gracias por la convivencia, las risas y los buenos momentos.

A mis padres, gracias por apoyarme siempre y no dejarme sola en cada paso de mi vida, por su amor incondicional, por sus palabras de aliento que me han motivado a seguir adelante. Los amo.

A todos mis amigos y familiares que me han acompañado siempre, que me han brindado su cariño, sus consejos y su apoyo a lo largo de mi vida

Y finalmente agradezco a Dios, por darme vida y salud para seguir creciendo profesionalmente, pero sobre todo por darme las fuerzas para seguir adelante ante cada obstáculo y dificultad.

Mónica Aragón

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Generalidades de los antibióticos.	3
2.2 Resistencia a antibióticos, un problema de Salud Pública.	4
2.3 Bacterias multirresistentes a antibióticos	6
2.3.1 Características generales de algunos patógenos prioritarios según la OMS	8
2.4 Mecanismos de resistencia a antibióticos	10
2.5 Búsqueda de nuevos antibióticos	14
3. ANTECEDENTES	16
3.1 Microbiota de la piel de anfibios	16
3.2 Metabolitos secundarios aislados de bacterias de la piel de anfibios	18
3.3 Microbiota de <i>A. altamirani</i>	22
4. JUSTIFICACIÓN.....	24
5. HIPÓTESIS	24
6. OBJETIVO GENERAL	24
6.1 Objetivos particulares	24
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	25
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
8.1 Cepas empleadas en los ensayos de actividad inhibitoria	26
8.2 Ensayos de competencia para evaluar la actividad antibacteriana	28
8.2.1 Preparación del cultivo césped.....	28
8.2.2 Preparación de cepas productoras.....	28
8.2.3 Preparación del sobrenadante	29
8.3 Evaluación de la producción de piocianina	29
8.3.1 Preparación de la muestra.	29
8.3.2 Extracción de la muestra.	29
8.4 Liofilización	30

8.5 Extracción con solventes	30
8.6 Medios de cultivo utilizados.....	31
9. RESULTADOS	32
9.1 Condiciones de crecimiento de la cepa ER-21	33
9.2 La cepa ER-21 no produce piocianina.	35
9.3 Evaluación de la actividad antibacteriana de cepas de <i>P. fluorescens</i> contra cepas patógenas de referencia	37
9.4 Actividad inhibitoria de la cepa ER-21 contra cepas patógenas de referencia.....	38
9.5 La cepa ER-21 inhibe el crecimiento de bacterias patógenas resistentes a antibióticos	39
9.6 El sobrenadante de cultivo directo con LB de la cepa ER-21 no muestra actividad antibacteriana.....	42
9.7 El sobrenadante de cultivo concentrado de la cepa ER-21 inhibe el crecimiento de bacterias patógenas.....	42
9.8 Extractos del sobrenadante de cultivo de la cepa ER-21 realizados con butanol inhiben el crecimiento de <i>S. aureus</i>	46
29213 (Figura 25).	46
10. DISCUSIÓN.....	48
11. CONCLUSIONES	52
+12. PERSPECTIVAS	53
13. APÉNDICE	54
14. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de resistencia a los antibióticos.....	11
Figura 2. Búsqueda de compuestos antimicrobianos.....	15
Figura 3. Factores bióticos y abióticos que influyen en la diversidad y función de la microbiota de la piel de los anfibios.....	18
Figura 4. Número de especies de anfibios en los que se ha estudiado el microbioma de 2006 a 2019...21	21
Figura 5. Fotos del ajolote <i>Ambystoma altamirani</i>	23
Figura 6. Estrategia experimental para el análisis de la actividad antimicrobiana de bacterias aisladas de la piel del ajolote <i>Ambystoma altamirani</i>	25

Figura 7. Actividad inhibitoria de las cepas ER-20, ER-21-ER-22, ER-23 aisladas de <i>A. altamirani</i> contracuatro cepas patógenas de referencia.....	32
Figura 8. Cinética de crecimiento de la cepa ER-21 en medio LB.....	33
Figura 9. Efecto de diferentes temperaturas en el crecimiento de la cepa ER-21.....	34
Figura 10 Actividad inhibitoria de la cepa ER-21 contra <i>A. baumannii</i> ATCC 17978 a diferentes temperaturas de incubación y crecimiento.....	34
Figura 11. Evaluación cualitativa de piocianina de la cepa ER-21. A) Producción de piocianina en agar cetrimida, B) Producción de piocianina y fluoresceína en agar cetrimida visto con luz UV.....	35
Figura 12. Cuantificación de piocianina en medio LB de la cepa ER-21	36
Figura 13. Grafica de cuantificación de piocianina en las cepas ER-21, <i>P. aeruginosa</i> PAO1 y <i>E. coli</i> DH10β	36
Figura 14. Halos de inhibición de crecimiento generados por la cepa ER-21 contra cepas patógenas de referencia.....	37
Figura 15. Evaluación de la actividad antibacteriana de colonias de <i>P. fluorescens</i> , contra cepas patógenas de referencia.....	38
Figura 16. Halos de inhibición generados por la cepa ER-21 contra cepas patógenas multirresistentes de <i>A. baumannii</i>	39
Figura 17. Halos de inhibición generados por la cepa ER-21 contra cepas patógenas multirresistentes de <i>P. aeruginosa</i>	40
Figura 18. Halos de inhibición generados por la cepa ER-21 contra patógenas multirresistentes de <i>K. pneumoniae</i>	41
Figura 19. Halos de inhibición generados por la cepa ER-21 contra patógenas multirresistentes de <i>S. aureus</i>	41
Figura 20. Actividad antibacteriana del sobrenadante de cultivo de la cepa ER-21 contra cepas patógenas de referencia.....	42
Figura 21. Halos de inhibición de crecimiento generados por la cepa ER-21 contra las cepas patógenas de referencia en medio LB 1:4.....	43
Figura 22. Actividad antibacteriana del sobrenadante de cultivo liofilizado de la cepa ER-21 contra bacterias patógenas de referencia.	44
Figura 23. Actividad antibacteriana del sobrenadante concentrado de la cepa ER-21 contra aislados clínicos de <i>S. aureus</i>	45
Figura 24. Actividad antibacteriana del sobrenadante de cultivo liofilizado de la cepa ER-21 en medio mínimo MM-N contra bacterias patógenas de referencia.....	46

Figura 25. Actividad antibacteriana de los extractos del sobrenadante con solventes (hexano, cloroformo, acetato de etilo y butanol)de cultivo de la cepa ER-21 contra *S. aureus* ATCC 29213.....47

Figura 26. Actividad antibacteriana de los extractos del sobrenadante con butanol de cultivo de la cepa ER-21 contra *S. aureus* ATCC 29213.....47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de patógenos prioritarios de la OMS para la identificación de nuevos antibióticos7

Tabla 2. Ejemplos de compuestos con actividad antifúngica aislados a partir de bacterias de la piel de anfibios.....20

Tabla 3. Lista de cepas *A. baumannii* con resistencia a diferentes antibióticos.....26

Tabla 4. Lista de cepas de *K. pneumoniae* con resistencia a diferentes antibióticos.....27

Tabla 5. Lista de cepas de *P. aeruginosa* con resistencia a diferentes antibióticos.....27

Tabla 6. Lista de cepas de *S. aureus* con resistencia a diferentes antibióticos.....27

Tabla 7. Receta con soluciones stock para la preparación de medio mínimo MM-N.....31

Tabla 8. Cepas de *A. altamirani* con actividad antibacteriana contra cepas patógenas.....32

RESUMEN

Debido al grave problema de salud pública que representa la resistencia a antibióticos, es urgente la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antibacteriana. La mayoría de los antibióticos disponibles provienen de bacterias del suelo; sin embargo, ahora la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antibacteriana se está realizando en fuentes naturales antes poco exploradas como la microbiota de animales. En este proyecto se realizó la identificación y caracterización de bacterias con actividad antibacteriana aisladas de la piel del ajolote *Ambystoma altamirani*. Los resultados mostraron que de las 100 cepas analizadas 42 tuvieron actividad antibacteriana. La cepa ER-21 fue seleccionada por tener una actividad de amplio espectro contra cepas de referencia y aislados clínicos resistentes a antibióticos de *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*. El sobrenadante de cultivo liofilizado de la cepa ER-21 tiene actividad inhibitoria contra la cepa de referencia y aislados clínicos resistentes a antibióticos de *S. aureus*. La actividad antibacteriana producida por la cepa ER-21 se logró extraer con el solvente butanol, por lo que probablemente los compuestos con actividad antibacteriana producidos por esta cepa sean relativamente polares.

PALABRAS CLAVE: Resistencia a antibióticos, nuevos compuestos antibacterianos, patógenos prioritarios, *Staphylococcus aureus*, ajolote, *Ambystoma altamirani*, microbiota.

ABSTRACT

Currently, antibiotic resistance represents a grave problem for public health globally. Thus, it is urgent the identification of new compounds with antibacterial activity. Most of the available antibiotics come from soil bacteria; however, searching for new compounds with antibacterial activity is now being performed in poorly explored natural sources like the microbiota of animals. In this project, identification and characterization of bacteria with antibacterial activity isolated from the skin of the axolotl *Ambystoma altamirani* was carried out. The results show that from 100 bacterial isolates analyzed, 42 had antibacterial activity. Strain ER-21 was selected for having broad-spectrum activity against reference and antibiotic-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*. Lyophilized culture supernatant of ER-21 strain has inhibitory activity against the reference strain and antibiotic-resistant clinical isolates of *S. aureus*. The antibacterial

activity produced by the ER-21 strain was extracted with the butanol solvent, supporting that the compounds with antibacterial activity produced by this strain are relatively polar.

KEY WORDS: antibiotic resistance, new antibacterial compounds, priority pathogens, *Staphylococcus aureus*, axolotl, *Ambystoma altamirani*, microbiota.

1. INTRODUCCIÓN

La resistencia a antibióticos representa un grave problema de salud a nivel mundial. Las infecciones producidas por bacterias resistentes son cada vez más complicadas de controlar con los antibióticos existentes. Esta problemática es consecuencia de diversos factores, como el uso excesivo y la prescripción inadecuada de antibióticos tanto en medicina humana como en medicina veterinaria, la falta de higiene y saneamiento deficiente. Todo esto ha llevado a que desde hace varios años la resistencia a antibióticos sea considerada una pandemia (OMS, 2020).

En el 2015, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció un plan de acción mundial para el control de la resistencia antibióticos, el cual se basa en dos ejes principalmente: el uso estrictamente necesario de los antibióticos y el desarrollo de nuevos antibióticos y nuevas estrategias anti-bacterianas. Así mismo, la OMS hizo el llamado a todos los países miembros a que definieran un plan nacional de este tipo. En respuesta a esto, nuestro país elaboró la Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos; además, la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) estableció el plan universitario de control de la resistencia antimicrobiana (PUCRA). La OMS también publicó en el 2017 una lista de bacterias patógenas para las que, por su grado de resistencia a antibióticos, alta incidencia y mortalidad, es urgente la identificación de nuevos compuestos anti-bacterianos; a estas bacterias se les ha denominado como patógenos prioritarios.

El 70% de los antibióticos utilizados actualmente en medicina humana y veterinaria se han identificado a partir de microorganismos del suelo. Por lo anterior, la estrategia a seguir para la búsqueda e identificación de nuevos compuestos naturales con actividad anti-bacteriana es investigar en fuentes que aún no han sido explorados; por ejemplo: la microbiota asociada a animales incluyendo humanos, anfibios e insectos.

Por esta razón, en el presente proyecto nos enfocamos en realizar la búsqueda de bacterias con actividad anti-bacteriana a partir de una colección de 100 bacterias aisladas de la piel del ajolote *Ambystoma altamirani* (proporcionadas por la Dra. Eria Alaide Rebollar Caudillo del Centro de Ciencias Genómicas / UNAM), probadas contra cepas de referencia y cepas multi-resistentes de *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*, las cuales se encuentran en la lista de patógenos prioritarios.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades de los antibióticos.

Las bacterias se encuentran en una competencia constante por los recursos del medio, por lo que poseen diferentes estrategias que les brindan ventajas sobre otros microorganismos. Una de ellas es la producción de metabolitos secundarios que tienen la capacidad de matar o inhibir el crecimiento de otrasxx bacterias. Selman Waksman en 1947 nombró a estos compuestos químicos producidos por microorganismos como antibióticos (Mohr, 2016). Los antibióticos se pueden clasificar de acuerdo a su mecanismo de acción en cinco grupos principales: 1) inhibidores de la síntesis de la pared celular (B-lactámicos), 2) inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos (rifampicina, quinolonas), 3) aquellos que actúan a nivel de la membrana celular (polimixinas), 4) inhibidores de la síntesis proteica (aminoglicósidos, macrólidos) y, 5) aquellos que interfieren en la síntesis de metabolitos (sulfas, trimetoprim) (Calvo y Martínez-Martínez 2009).

El primer antibiótico usado comercialmente fue la penicilina, descubierto en 1928 por Alexander Fleming a partir de un hongo identificado posteriormente como *Penicillium notatum*. Desde entonces comenzó la era dorada para el descubrimiento de antibióticos (1945-1960), en la cual se identificaron diferentes familias (aminoglucósidos, macrólidos, glucopéptidos y betalactámicos) que fueron empleados para tratar con éxito infecciones bacterianas como: la tuberculosis (*M. tuberculosis*), lepra (*Mycobacterium leprae*) cólera (*Vibrio cholerae*) y la peste (*Yersinia pestis*), por mencionar algunas, las cuales causaban grandes epidemias y la muerte de millones de personas (Mohr, 2016).

Además de poder tratar enfermedades infecciosas, el uso de antibióticos permitió el desarrollo de muchos procedimientos médicos modernos, como la terapia contra el cáncer, el manejo de bebés

prematuros, trasplante de órganos, cirugías invasivas, quimioterapias y tratamientos inmunosupresores, lo que significó un aumento en la esperanza de vida (Mohr, 2016).

Sin embargo, actualmente el mal uso y abuso de los antibióticos tanto en medicina humana, animal y ambiental; han generado que las bacterias se enfrenten a una presión selectiva en la que los antibióticos matan a las bacterias sensibles, pero permiten que permanezcan los patógenos resistentes que luego se reproducen y prosperan a través de la selección natural, permitiendo así el surgimiento de cepas resistentes a múltiples antibióticos (MDR, por sus siglas multidrogo resistente) (Aslam *et al.*, 2018).

2.2 Resistencia a antibióticos, un problema de Salud Pública.

La resistencia a antibióticos (RA) es la capacidad que tienen las bacterias para evadir la acción de fármacos que tienen como función eliminarlas (bactericidas) o inhibir su crecimiento (bacteriostáticos). Numerosas organizaciones importantes, como los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC), la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América y el Foro Económico Mundial han establecido que la RA es un problema de salud pública mundial (Aslam *et al.*, 2018). La Organización Mundial de la Salud (OMS) también declaró que la RA es una de las 10 principales amenazas de salud pública a las que se enfrenta la humanidad (OMS, 2020).

Esto se debe en primer lugar al efecto directo en la posibilidad de tratar infecciones bacterianas resistentes que requieren estancias hospitalarias prolongadas, con lo cual se elevan los costos médicos y, en segundo lugar, comprometen tratamientos que requieren inmunosupresión, como trasplante de órganos, intubación, cateterismo, quimioterapia, así como procedimientos quirúrgicos (Aslam *et al.*, 2018).

La aparición, propagación y persistencia de bacterias MDR se ha incrementado debido a diferentes factores, como el uso imprudente y excesivo de antibióticos clínicamente relevantes en los sectores agrícola y veterinario. Así mismo, la sobrepoblación, el aumento de la migración global, la falta de higiene y el saneamiento deficiente impactan en la proliferación de bacterias resistentes a antibióticos (Ahmad *et al.*, 2021).

En una estimación de infecciones y muertes asociadas a la atención médica en hospitales de E.U.A en 2002, se encontró que las infecciones adquiridas en hospitales asociadas a patógenos resistentes a los antibióticos causaron 99,000 muertes al año (Klevens *et al.*, 2007). Un estudio realizado en el reino

unido mostró que en el 2014 murieron 700,000 personas al año a causa de infecciones multirresistentes a antibióticos y se estimó que, de seguir así este problema, para el año 2050 las muertes podrían aumentar a 10 millones por año (O'Neill *et al.*, 2014).

En un análisis realizado en Europa en 2015, sobre las muertes atribuibles y años de vida ajustados por discapacidad causados por infecciones con bacterias resistentes a los antibióticos, mostró que estas infecciones causaron aproximadamente 33, 110 muertes (Cassini *et al.*, 2019). En 2019, en un análisis sobre la carga global de resistencia bacteriana a los antimicrobianos, se estimó que 4,95 millones de personas murieron a causa de infecciones asociadas a la resistencia, de las cuales 1,27 millones de muertes fueron directamente atribuibles a la resistencia a los antibióticos (Murray *et al.*, 2022).

Debido a la pandemia que se vivió en los últimos tres años (2020-2022), ocasionada por el virus SARS-CoV-2, las cifras de muertes por bacterias resistentes a antibióticos podrían aumentar significativamente. En una revisión sistemática se estimó que la prevalencia de la coinfección bacteriana con el virus SARS-CoV-2, en América del Norte fue de 7.89 %, seguida de Asia con 5.30 % y Europa con un 3.57 %. (Alshaikh *et al.*, 2022). Por otro lado, un meta-análisis sobre la prescripción de antibióticos en pacientes con COVID-19, se mostró que la prevalencia del uso de antibióticos en Europa fue del 63.1%, en América del Norte del 64.8%, en China del 76.2%, Oriente Medio del 86.0% y en Asia oriental/sudoriental (excluida China) del 87,5% (Longford *et al.*, 2021).

Estos datos muestran que la prescripción de antibióticos fue significativamente más alta que la prevalencia estimada de coinfecciones bacterianas en pacientes con COVID-19. De manera que durante la emergencia sanitaria hubo un gran aumento en el uso y abuso de antibióticos, lo que va a repercutir significativamente en el incremento de los niveles de resistencia antibióticos en un futuro próximo (Longford *et al.*, 2021; Alshaikh *et al.*, 2022).

Ante esta problemática, en el año 2015 la OMS estableció un plan de acción mundial para el control de la RAM (resistencia antimicrobiana) y solicitó a todos los países miembros a que definan un plan nacional de este tipo. Este plan se basa en cinco objetivos: 1) mejorar el conocimiento de la resistencia a los antimicrobianos, 2) reforzar los conocimientos y la base científica, 3) reducir la incidencia de las infecciones con medidas eficaces de saneamiento, 4) utilizar de forma óptima los medicamentos antimicrobianos en la salud humana y animal y 5) preparar argumentos económicos a favor de una inversión sostenible (OMS, 2015).

En respuesta a este llamado en México se aprobó el ACUERDO por el que se declara la obligatoriedad de la Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos, con el fin de que en el país se haga uso racional de antimicrobianos en los diferentes sectores: salud humana, salud animal y en la agricultura (SEGOB 2018). Así mismo, la UNAM implementó el Plan Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana (PUCRA) con el objetivo de conocer el estado actual de los niveles de resistencia a nivel nacional (Programa Universitario de Investigación en Salud, 2018).

2.3 Bacterias multirresistentes a antibióticos

Las bacterias son clasificadas como multirresistentes cuando cumplen con dos condiciones: que exista resistencia a más de una familia o grupo de antibióticos a los que habitualmente son sensibles y que esa resistencia tenga relevancia clínica y epidemiológica (López-Pueyo *et al.*, 2011).

En 2017, la OMS publicó una lista de bacterias consideradas como patógenos prioritarios, por su elevada patogenicidad, mortalidad, alta incidencia y sus niveles de resistencia (OMS, 2017). Fueron clasificados en tres niveles de prioridad: crítica, alta y media (Tabla 1). En el primer grupo se encuentran bacterias multirresistentes que afectan en gran medida a personas internadas en hospitales y a pacientes que necesitan ser atendidos con dispositivos como ventiladores y catéteres intravenosos. Entre estas bacterias se incluyen las siguientes: *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y las enterobacterias (como *E. coli* y *K. pneumoniae*). El segundo y tercer grupo corresponde a bacterias que tienen una farmacorresistencia creciente y provocan enfermedades en la comunidad, como *S. aureus*, *E. faecium* y *S. pneumoniae* (OMS, 2017).

En un análisis sistemático sobre la carga mundial de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos realizado en 2019, se encontró que seis patógenos causaron 929 000 de 1,27 millones de muertes atribuibles a la resistencia a antibióticos y 3,57 millones de 4,95 millones de muertes asociadas con la RA a nivel mundial. Estas bacterias fueron: *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *S. pneumoniae*, *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, por orden de número de muertes ocasionadas (Murray *et al.*, 2022).

En México, un reporte publicado por el PUCRA en 2018 mostró que las bacterias *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii* presentaron resistencia a todas las cefalosporinas de 2 segunda, 3ra y 4ta generación y el 60% de los aislamientos fueron productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). La resistencia de los aislamientos de *S. aureus* fue elevada ($\geq 30\%$) para

eritromicina, clindamicina, ciprofloxacino y oxacilina (Programa Universitario de Investigación en Salud, 2018).

Tabla 1. Lista de patógenos prioritarios de la OMS para la identificación de nuevos antibióticos

PRIORIDAD 1: CRITICA
<i>Acinetobacter baumannii</i> , resistente a carbapenem
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , resistente a carbapenem
<i>Enterobacteriaceae*</i> , resistente a carbapenem y cefalosporinas de 3° generación
PRIORIDAD 2: ALTA
<i>Enterococcus faecium</i> , resistente a vancomicina
<i>Staphylococcus aureus</i> , resistente a meticilina y medianamente resistente a vancomicina
<i>Helicobacter pylori</i> , resistente a claritromicina
<i>Campylobacter spp.</i> , resistente a fluoroquinolonas
<i>Salmonella spp.</i> , resistente a fluoroquinolonas
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , resistente a cefalosporinas de 3° generación y a fluoroquinolonas
PRIORIDAD 3: MEDIA
<i>Streptococcus pneumoniae</i> , no sensible a penicilina
<i>Haemophilus influenzae</i> , resistente a ampicilina
<i>Shigella spp.</i> , resistente a fluoroquinolonas

**Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Serratia*, y *Proteus*

En otro estudio publicado en 2019, en el que participaron 47 hospitales de 20 estados de México, se analizaron 22, 943 aislamientos obtenidos de enero a junio de 2018. Los resultados mostraron un alto porcentaje de resistencia a carbapenémicos, por parte de bacterias Gram-negativas: *A. baumannii* (más de 50 %), *P. aeruginosa* (40 %), *Klebsiella spp* y *E. cloacae* (12 %). En el grupo de las bacterias Gram-positivas el 21 % fue *S. aureus* resistente a meticilina (Garza-González *et al.*, 2019).

La carga global de la resistencia antibacteriana es variable en diferentes regiones; sin embargo, la tendencia en general es al alza. Por lo que la RA es una grave amenaza mundial de creciente preocupación para la salud humana, animal y ambiental, lo cual hace muy necesaria la búsqueda de nuevos compuestos antibacterianos y nuevas estrategias antimicrobianas.

2.3.1 Características generales de algunos patógenos prioritarios según la OMS

Dentro de la lista de patógenos de patógenos prioritarios para el desarrollo de nuevos antibióticos y nuevas estrategias anti-bacterianas se encuentran: *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *S. aureus* (OMS, 2017). Estas cuatro especies son consideradas como patógenos oportunistas nosocomiales, ya que afectan principalmente a personas hospitalizadas que se encuentran inmunocomprometidas. Causan una gran variedad de daños, desde infecciones en la piel, tejidos blandos y en el tracto urinario, hasta endocarditis, osteomielitis, neumonía y sepsis (Velázquez- Meza, 2005; Martin y Bachman 2018; Pang *et al.*, 2019; Ibrahim *et al.*, 2021).

A. baumannii

A. baumannii es un coccobacilo Gram-negativo, no móvil, aerobio estricto. Se encuentra de manera natural en el ambiente (agua, plantas, vegetales, suelo), y en raras ocasiones como parte de la microbiota normal de la piel de animales y humanos. Es uno de los seis microorganismos multirresistentes a antibióticos con mayor incidencia en pacientes hospitalizados de todo el mundo, esto se debe en gran parte a su capacidad de adherencia y persistencia en equipos biomédicos (Murray *et al.*, 2022). Esta bacteria coloniza principalmente tejidos húmedos como membranas mucosas y la piel expuesta, afectando en mayor medida a pacientes hospitalizados en estado crítico o muy debilitados por sus comorbilidades, siendo una bacteria común en unidades de cuidado intensivo y unidades de quemados. Los factores de riesgo para contraer infecciones causadas por *A. baumannii* son: inmunosupresión, cirugías mayores, quemaduras, la presencia de dispositivos médicos invasivos y principalmente la ventilación mecánica (Ibrahim *et al.*, 2021).

Actualmente, *A. baumannii* tiene una amplia resistencia a la mayoría de los antibióticos de primera línea, por lo que ha sido clasificado por la OMS como patógeno de prioridad alta (OMS, 2017). Esto se debe a que ha desarrollado diversos mecanismos de resistencia, entre los cuales se incluyen β -lactamasas, sobreexpresión de bombas de expulsión, pérdida de porinas y modificación del blanco de acción de los antibióticos (Ibrahim *et al.*, 2021).

K. pneumoniae

K. pneumoniae es una bacteria en forma de bacilo Gram-negativo, anaeróbico facultativo, no móvil que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Se distribuye ubicuamente en el ambiente (agua, suelo, tierra y plantas), así como en las mucosas de mamíferos; en humanos se encuentra

específicamente en la mucosa de nasofaringe y del intestino. Pueden causar diversas infecciones, principalmente en la cavidad abdominal, el tracto urinario y los pulmones. Los pacientes más susceptibles son aquellos ingresados en unidades de cuidados intensivos, neonatos, pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica y diabetes mellitus (Martin y Bachman 2018).

Es una de las seis bacterias causantes de infecciones multirresistentes intrahospitalarias con mayor incidencia en de todo el mundo, especialmente en pacientes con el sistema inmune debilitado, por lo que es considerado un patógeno oportunista (Murray *et al.*, 2022).

Esto se debe a que producen una capsula de polisacáridos que la protege contra la fagocitosis por parte de células polimorfonucleares y de los factores bactericidas séricos, inhibiendo al sistema inmunológico del huésped, así como a sus diferentes mecanismos de resistencia, como la producción de enzimas β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y el aumento en la expresión de bombas de eflujo (Martin y Bachman 2018). Debido a sus altos índices de prevalencia, mortalidad y resistencia a la mayoría de los antibióticos usados actualmente en la clínica, la OMS clasificó a *K. pneumoniae* como patógeno de prioridad alta (OMS, 2017).

P. aeruginosa

P. aeruginosa es un bacilo móvil, Gram-negativo, anaerobio facultativo. Se puede encontrar en el agua, el suelo húmedo y plantas, puede sobrevivir con bajos niveles de nutrientes, lo cual le permite sobrevivir en instrumental quirúrgico, catéteres y ventiladores. Esto se debe principalmente a su adaptabilidad, flexibilidad y factores de virulencia (exotoxina A, enzimas proteolíticas, pirocianina, pioverdina, sideróforos). Así como a sus diferentes mecanismos de resistencia: enzimas modificadoras de aminoglucósidos, producción de BLEE, permeabilidad limitada para los antibióticos y expresión de bombas de eflujo (Pang *et al.*, 2019).

Puede causar diversas infecciones en humanos, como neumonía asociada con el respirador, ectima gangrenoso, otitis externa aguda, infecciones urinarias en pacientes que se encuentran en unidades de terapia intensiva, pacientes con fibrosis quística y pacientes quemados. *P. aeruginosa* es considerado un patógeno oportunista debido a que afecta principalmente a personas que tienen su sistema inmunológico comprometido (Pang *et al.*, 2019). Estudios han mostrado que esta bacteria es de una de las principales causantes de infecciones multirresistentes en hospitales (Murray *et al.*, 2022). Debido a sus altos niveles de resistencia y mortalidad la OMS clasificó a esta bacteria como patógeno de prioridad alta (OMS, 2017).

S. aureus

S. aureus es un estafilococo anaerobia facultativa inmóvil, Gram-positivo. Su hábitat se encuentra como parte de la microbiota normal de la piel y las membranas mucosas de la boca, intestino y nariz en los seres humanos y los animales. Sin embargo, cuando el sistema inmunológico del huésped se encuentra comprometido, pueden causar diversas infecciones, como endocarditis invasiva, osteomielitis, bacteriemia, infecciones del tracto respiratorio, tracto urinario y en el sistema nervioso central, por lo que es uno de los principales causantes de las infecciones multirresistentes nosocomiales (Murray *et al.*, 2022). Es clasificado por la OMS como patógeno de prioridad media (OMS, 2017).

S. aureus resistente a meticilina (SAMR) se asocia frecuentemente con infecciones persistentes en pacientes hospitalizados, la gran mayoría de SAMR no sólo son resistentes a todos los β -lactámicos, sino también a otros múltiples antibióticos. El elemento central de la resistencia a meticilina en *S. aureus* es la adquisición del gen *mecA* que codifica para una proteína de unión a penicilina (PBP) de 78KDa, la cual presenta baja afinidad para los antibióticos β -lactámicos (Velázquez- Meza, 2005).

2.4 Mecanismos de resistencia a antibióticos

Las bacterias pueden ser intrínsecamente resistentes a ciertos grupos de antibióticos. La resistencia intrínseca se define como un rasgo que se comparte universalmente dentro de una especie bacteriana, es independiente de la exposición previa a los antibióticos y no está relacionada con la transferencia horizontal de genes. Los principales mecanismos involucrados en la resistencia intrínseca son: la permeabilidad reducida de la membrana externa y la actividad de las bombas de expulsión de fármacos (Reygaert, 2018).

Por otra parte, las bacterias también tienen una enorme capacidad de adaptación al medio en el que viven, por lo que pueden adquirir resistencia a antibióticos mediante mutaciones en su ADN cromosómico o a través de mecanismos de transferencia horizontal de genes, como la conjugación, la transformación y la transducción (REF). La adquisición de los genes de resistencia puede ser temporal o permanente, eso dependerá en gran parte de la exposición que tengan a los antibióticos, ya que incluso el uso de concentraciones subinhibitorias de antibióticos pueden conducir a la selección de resistencia de alto nivel en sucesivas generaciones bacterianas, puede seleccionar bacterias hipermutables y puede promover el movimiento de elementos genéticos móviles (Aslam *et al.*, 2018; Reygaert, 2018).

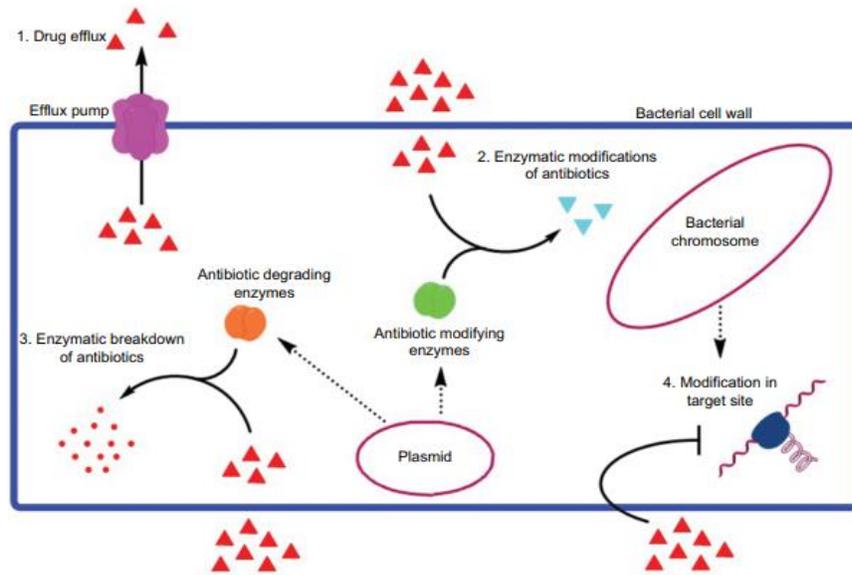


Figura 1. Mecanismos de resistencia a los antibióticos: bombas de eflujo, modificación o degradación enzimática del antibiótico y modificación del sitio blanco (Aslam *et al.*, 2018).

Los principales mecanismos de resistencia adquirida se clasifican en cinco grupos: aumento en la expresión de bombas de eflujo, modificación del sitio blanco, degradación o modificación enzimática del antibiótico, reducción de las concentraciones intracelulares del antibiótico, producción de metabolitos por una vía alterna (Figura 1) (Aslam *et al.*, 2018; Reygaert, 2018; Huemer *et al.*, 2020).

Bombas de eflujo

Las bombas de eflujo o expulsión funcionan principalmente para eliminar las sustancias tóxicas de la célula bacteriana, pueden ser de un sustrato específico y sólo expulsar una única molécula o bien pueden ser de amplio espectro y expulsar distintas clases de moléculas (bombas de expulsión multidrogas). Estas bombas de expulsión no se limitan a sacar solo sustancias antibióticas, sino que actúan sobre compuestos que representen un problema para el funcionamiento de la célula (Reygaert, 2018).

Pueden estar codificadas cromosómicamente y expresarse de manera constitutiva o inducirse o sobreexpresarse bajo ciertos estímulos ambientales (antibióticos) o cuando está presente un sustrato adecuado. La mayoría de las bacterias poseen muchos tipos diferentes de bombas de expulsión. Existen cinco familias principales de bombas de eflujo que atraviesan la membrana bacteriana, clasificadas según su estructura y fuente de energía: la familia de cassettes de unión a ATP (ABC), la familia de extrusión de

compuestos tóxicos y multidrogas (MATE), la familia de resistencia multidrogas pequeña (SMR), la familia principal superfamilia facilitadora (MFS) y la familia de resistencia-nodulación-división celular (RND) (Reygaert, 2018).

Modificación del sitio blanco

Las bacterias tienen la capacidad de crear cambios en el sitio donde los antibióticos ejercen su acción y de esta forma pueden disminuir o inhibir la capacidad del fármaco para unirse a su sitio blanco. Un ejemplo de esto es el caso de la alteración en la estructura o el número de las proteínas de unión a penicilina (PBP). Las PBP son las responsables de la transpeptidación, proceso fundamental para la estabilidad de la pared celular, los antibióticos β -lactámicos tienen como blanco las PBP. Las alteraciones estructurales secundarias a mutaciones pueden disminuir la afinidad de los β -lactámicos por las PBP evitando la lisis de la pared celular y permitiendo que la bacteria sobreviva (Huemer *et al.*, 2020)

En los antibióticos que se dirigen a la síntesis de ácidos nucleicos (quinolonas) la resistencia se produce a través de modificaciones en el ADN girasa o topoisomerasa IV (*gyrA* de bacterias Gram-negativas y *grlA* de bacterias Gram-positivas). Estas mutaciones provocan cambios en la estructura de la girasa y la topoisomerasa que disminuyen o eliminan la capacidad del fármaco para unirse a estos componentes (REF). Otro ejemplo de esto se da en los antibióticos que inhiben vías metabólicas (sulfonamidas y el trimetoprim). La resistencia a estos fármacos se produce a través de mutaciones en enzimas; por ejemplo, dihidropteroato sintasa (DHPS) y dihidrofolato reductasa (DHFR), involucradas en la vía de biosíntesis de folato. Las mutaciones en estas enzimas se ubican con mayor frecuencia en el sitio activo o cerca de él, interfiriendo con la unión del fármaco, pero permitiendo la unión al sustrato natural (Huemer *et al.*, 2020).

Degradación enzimática del antibiótico

Las bacterias expresan enzimas capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico haciendo que éste pierda su funcionalidad. Hay dos formas principales en las que las bacterias inactivan los fármacos; la primera es por degradación del fármaco y la segunda por transferencia de un grupo químico al antibiótico. El principal grupo de enzimas con capacidad de degradar el antibiótico son las β -lactamasas, proteínas aptas para hidrolizar el anillo β -lactámico característico de los antibióticos de esta familia. Los fármacos de anillo abierto no pueden unirse a sus proteínas PBP diana (Reygaert, 2018).

Las β -lactamasas conocidas están muy extendidas y el grupo contiene enzimas que son capaces de inactivar cualquiera de los actuales fármacos β -lactámicos (cefalosporinas, carbapenémicos y

monobactámicos). Las enzimas β -lactamasas se clasifican en función de su estructura molecular o características funcionales. Estructuralmente se ubican en cuatro categorías principales (A, B, C o D). Existen tres grupos funcionales basados en la especificidad del sustrato: las cefalosporinasas, las serina β -lactamasas y las metalo β -lactamasas. Las bacterias Gram-negativas pueden producir β -lactamasas de los cuatro grupos estructurales y es el mecanismo de resistencia más común en estas bacterias. Las β -lactamasas que se encuentran en bacterias Gram-positivas son principalmente del grupo A (Reygaert, 2018).

Modificación enzimática del antibiótico

La inactivación de fármacos suele ser mediante la transferencia de un grupo químico: acetilo, fosforilo o adenilo. Hay un gran número de transferasas que han sido identificadas. Este mecanismo ocurre para los antibióticos que actúan sobre los ribosomas bacterianos, provocando la producción de proteínas anómalas, como el caso de los aminoglucósidos (Davies *et al.*, 2010). La modificación enzimática de los aminoglucósidos se da principalmente por fosforilación y adenilación. Esto ocurre en el espacio periplásmico o en la membrana citoplásmica y produce un doble efecto. Uno es que el antibiótico modificado covalentemente ya no puede usar el mecanismo de transporte facilitado a través de la membrana; por lo tanto, accede en menor cantidad al citoplasma. Otro es que el compuesto modificado ya no puede afectar al ribosoma, por lo que no ejecuta acción inhibitoria sobre el crecimiento de la bacteria (Davies *et al.*, 2010).

Reducción de las concentraciones intracelulares de antibióticos.

Las porinas son proteínas que se encuentran en la membrana externa de las bacterias Gram-negativa, las cuales sirven como canales de transporte de diferentes moléculas hidrofílicas. Hay dos tipos principales, las porinas que no tienen especificidad de sustrato y solo discriminan de acuerdo al tamaño o carga de las moléculas y las porinas específicas que permiten el paso de sólo ciertos sustratos. La entrada de varios antibióticos a la célula bacteriana se da mediante porinas, por lo que un mecanismo de resistencia es afectar la permeabilidad de la membrana a través de una mutación o expresión reducida de porinas, evitando así que se alcancen concentraciones inhibitorias que maten o inhiban el crecimiento bacteriano. Esto se ha descrito bien para varios patógenos Gram-negativos, como *E. coli* y *K. pneumoniae* (Huemer *et al.*, 2020)

Formación de biopelículas

Las bacterias pueden vivir de forma libre (planctónica) o agrupadas en un consorcio de la misma o diferente especie formando biopelículas, las cuales están estabilizadas por una matriz extracelular polimérica (MEP) producida por las mismas bacterias. El mecanismo de formación de biopelículas es desencadenado y regulado por diferentes factores, como la detección de quórum, condiciones ambientales hostiles, disponibilidad de nutrientes, comunicación de célula a célula y cascadas de señalización (Rather *et al.*,2021).

Las biopelículas producidas por bacterias patógenas humanas se pueden localizar en implantes médicos, tejidos vivos, pisos de hospitales, unidades de procesamiento de alimentos y otras superficies bióticas y abióticas. La formación de biopelículas contribuye al desarrollo de resistencia a los antibióticos y a la formación de células persistentes responsables de infecciones difíciles de tratar. Según los informes de los Institutos Nacionales de Salud (NIH), alrededor del 65 % y el 80 % de las infecciones microbianas crónicas son causadas por biopelículas. Algunas de las infecciones de tejidos causadas por biopelículas incluyen: periodontitis, osteomielitis, infección pulmonar en la fibrosis quística, endocarditis, heridas crónicas e infecciones del tracto biliar y urinario (Rather *et al.*,2021).

2.5 Búsqueda de nuevos antibióticos

Debido al problema de salud pública que representa la RA ha surgido una necesidad urgente por encontrar nuevos compuestos con actividad antibacteriana (OMS, 2015; O'Neill *et al.*, 2014; Aslam *et al.*, 2018; OMS, 2020). Las bacterias se encuentran en constante competencia para colonizar el medio en el que viven, la producción de metabolitos secundarios con efectos antibacterianos les permiten competir con otras especies por la adquisición de los nutrientes necesarios para desarrollarse. De manera que la capacidad que tienen las bacterias para generar una variedad de compuestos que inhiben el crecimiento de otras especies bacterianas es bien conocida (Zipperer *et al.*, 2016; Ali *et al.*, 2018; Rudra y Boyd 2020).

El 70% de los antibióticos disponibles en la actualidad provienen de bacterias del suelo, principalmente del género *Streptomyces*, como la actinomicina (*S. antibioticus*), la estreptomycinina (*S. griseus*), la eritromicina (*S. erythraeus*), las tetraciclinas (*S. aureofaciens*), entre otros antibióticos (Ali *et al.*, 2018).



Figura 2. Fuentes en donde se está haciendo la búsqueda de compuestos antimicrobianos

Debido a que el suelo es un ambiente que ya ha sido ampliamente estudiado, actualmente la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antibacteriana se está realizando en fuentes que aún no han sido explorados (Figura 2), como ambientes extremos, sedimentos marinos, extractos de plantas, veneno de serpientes y alacranes, así como la microbiota de animales (Demain *et al.*, 2019; Ali *et al.*, 2018).

El término microbiota es utilizado para designar a los microorganismos que comparten un mismo ambiente (Sebastián y Sánchez, 2017). En los animales vertebrados, las comunidades microbianas que se encuentran en la piel actúan en sinergia con el sistema inmunológico innato y adaptativo del hospedero, formando parte de la primera línea de defensa contra infecciones de microorganismos patógenos, incluso ayudan a regular algunas funciones fisiológicas del hospedero (Jiménez *et al.*, 2019).

La capacidad biosintética de la microbiota ha sido mayormente estudiada en humanos. En estudios enfocados en la búsqueda de compuestos con actividad antibacteriana se han descubierto que algunas bacterias de la microbiota humana pueden producir bacteriocinas y compuestos bactericidas, como es el caso de la lugdunina, un nuevo antibiótico que es un péptido cíclico que contiene tiazolidina, sintetizado de forma no ribosomal, el cual tienen la capacidad de inhibir la colonización por *S. aureus*.

Este compuesto es producido por *Staphylococcus lugdunensis* aislada de la fosa nasal de humanos (Zipperer *et al.*, 2016).

También se ha estudiado la actividad antibacteriana de la microbiota intestinal de insectos, como *Gromphadorhina portentosa* (cucaracha de madagascar) y *Blaptica dubia* (cucaracha de Dubia). En un estudio se encontró que bacterias aisladas del intestino de estos insectos producen moléculas activas con potentes propiedades antibacterianas contra bacterias Gram-positivas, como *S. aureus* resistente a meticilina (MSSA), *S. pyogenes*, *B. cereus*, y contra bacterias Gram-negativas, como *E. coli*, *S. enterica*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* (Akbar *et al.*, 2018).

En un análisis de bacterias marinas aisladas de la esponja *Xestospongia testudinaria* se encontró que algunas producen metabolitos secundarios con actividades antibacterianas contra la bacteria Gram-positiva *S. aureus* y contra las bacterias Gram-negativas *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. enterica serovar Typhi* (Cita *et al.*, 2017).

La búsqueda de nuevos compuestos antibacterianos en fuentes naturales es un área de investigación importante. En los ejemplos mencionados anteriormente se muestra que la búsqueda de nuevas moléculas con actividad antibacteriana a partir de bacterias que se asocian a hospederos pueden ser una fuente exitosa de moléculas con actividad antimicrobiana. Sin embargo, se requieren de muchos más estudios a este respecto para lograr contar con nuevos antibióticos para el tratamiento de enfermedades infecciosas en humanos y animales ocasionadas por bacterias resistentes.

3. ANTECEDENTES

3.1 Microbiota de la piel de anfibios

Los anfibios son animales vertebrados anamniotas, ectotérmicos, capaces de realizar metamorfosis. Son clasificados en tres órdenes: anuros (sapos y ranas), caudados (salamandras y tritones) y gymnophiona (Cecilias). La piel de estos organismos se caracteriza por ser desnuda o lisa (sin escamas, pelos o plumas), es vascularizada y cuenta con la presencia de glándulas mucosas y lechosas que humectan la piel y secretan toxinas. La piel en los anfibios es uno de los órganos más importantes, ya que por medio de ella pueden realizar el transporte de oxígeno a todo el cuerpo a través de la sangre (Parra *et al.*, 2014).

La microbiota de la piel de anfibios es diversa y dinámica; su composición depende de diversos factores asociados a las características de cada organismo y a la interacción de éste con factores bióticos y abióticos (Figura 3). Dentro de los factores asociados al hospedero se encuentra la diversidad genética, el sistema inmunológico adaptativo e innato, el comportamiento del organismo, la ecología y el desarrollo del hospedador. Los factores bióticos incluyen interacciones ecológicas entre las bacterias simbióticas de la piel y la composición microbiana de los reservorios ambientales. Los factores abióticos incluyen condiciones ambientales como la temperatura y la humedad (Rebollar *et al.*, 2016; Jiménez *et al.*, 2019; Rebollar *et al.*, 2020).

Las comunidades microbianas de la piel de los anfibios varían entre especies que coexisten en un mismo entorno. Un factor que determina esta variación es la composición química del moco cutáneo o mucosa. De manera general, la mucosa está compuesta por una gran cantidad de mucinas glicosiladas y mucopolisacárido que tienen la función de mantener la humedad de la piel. Además, contiene una variedad de moléculas, como péptidos antimicrobianos, alcaloides, lisozimas y anticuerpos. La diversidad y cantidad de moléculas producidas por cada especie de anfibios es variable (Varga *et al.*, 2019; McMillan *et al.*, 2020; Rebollar *et al.*, 2020). Por esta razón, la composición química del moco puede proporcionar diferentes condiciones que favorecen el crecimiento de cierto tipo de comunidades microbianas.

Otro factor que juega un papel importante en la diversidad y composición microbiana de la piel de anfibios es el microhábitat. Esta diversidad se relaciona con las características ambientales locales, con la interacción que hay con la microbiota ambiental del suelo, el agua y las plantas, así como con la presencia o abundancia de microorganismos patógenos. En diferentes investigaciones se ha demostrado que la microbiota cutánea se modifica en respuesta a infecciones causadas por hongos quitridios (Rebollar *et al.*, 2016; Jiménez *et al.*, 2019; Rebollar *et al.*, 2020).

También existe evidencia que indica que dos o más especies de anfibios que coexisten en el mismo hábitat pueden tener diferencias en sus comunidades bacterianas (Kueneman *et al.*, 2014). Estas diferencias pueden ser causa del ciclo de vida de cada especie, el uso del hábitat, la dieta y el comportamiento que tiene cada organismo (Nava *et al.*, 2021). De manera que las bacterias de la piel de los anfibios albergan comunidades bacterianas que son únicas para cada especie y no son un ensamblaje aleatorio de bacterias ambientales.

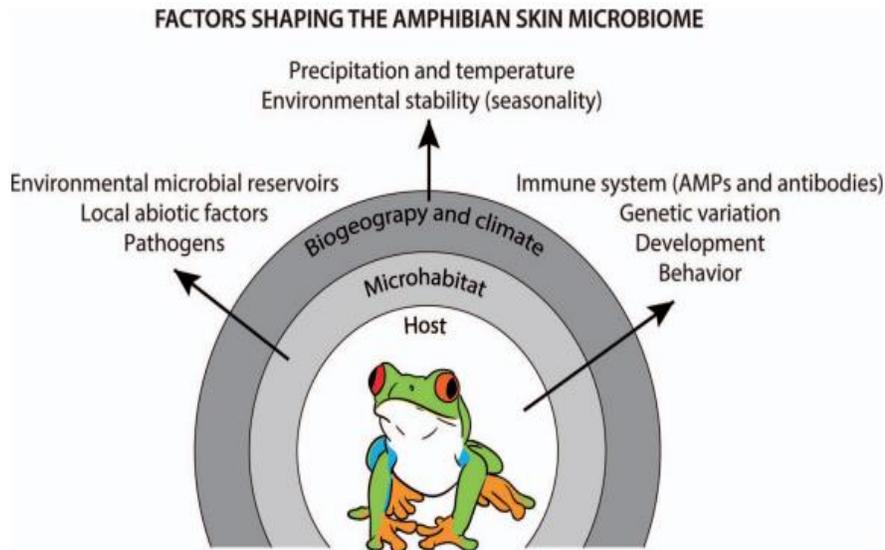


Figura 3. Factores bióticos y abióticos que influyen en la diversidad y función de la microbiota de la piel de los anfibios (Rebollar *et al.*, 2020).

Sin embargo, a pesar de que la microbiota de la piel de anfibios es dinámica y variable, dependiendo de diversos factores, existe un grupo de microorganismos compartidos por la mayoría de los anfibios de una población que son denominados como comunidad central. En un análisis sobre la diversidad bacteriana de la piel de las ranas *Espadarana prosoblepon*, *Craugastor fitzingeri* y *Colostethus panamansis*, se observó que éstas tenían comunidades dominadas por los géneros *Pseudomonas* y *Acinetobacter* (Rebollar *et al.*, 2016).

En un estudio se encontró que en *C. fitzingeri* los géneros bacterianos dominantes son *Pseudomonas* (74,43%), *Variovorax* (4,72%) y *Sanguibacter* (4,65%) (Rebollar *et al.*, 2018). En otro trabajo también se encontró que la piel de *C. fitzingeri* está dominada por *Pseudomonas*, mientras que *Agalychnis callidryas* y *Dendropsophus ebraccatus* estaban dominadas por *Cellulomonas* (Rebollar *et al.*, 2019).

3.2 Metabolitos secundarios aislados de bacterias de la piel de anfibios

El estudio de la microbiota de la piel de anfibios se ha enfocado desde sus inicios en identificar especies bacterianas con capacidad de evitar infecciones causadas por *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd). Este hongo provoca una enfermedad en anfibios llamada quitridiomycosis, la cual se caracteriza

principalmente por la hiperqueratinización, decoloración, ulceración y erosión del estrato córneo de la piel (Mendoza- Almeralla *et al.*, 2015).

Esta enfermedad ha causado grandes declives poblacionales de anfibios a nivel mundial; en trabajos recientes se ha reportado la disminución de más de 500 especies de anfibios y la extinción de al menos 90 de estas especies (Scheele *et al.*, 2019). Debido a esto, diferentes investigaciones se han centrado en la búsqueda de metabolitos secundarios con actividad antifúngica a partir de bacterias aisladas de la piel de anfibios (Brucker *et al.*, 2008a; Brucker, *et al.*, 2008b; Loudon, *et al.*, 2014; Martin *et al.*, 2019).

Dentro de los resultados sobre el estudio de la microbiota de la piel de diferentes anfibios se encontró que ciertas especies bacterianas como *Janthinobacterium lividum*, *Lysobacter gummosus* y *Serratia marcescens* tienen la capacidad de producir un amplio repertorio de moléculas antifúngicas (Tabla 2). Algunos de los metabolitos producidos por bacterias cutáneas de anfibios incluyen: violaceína, indol-3-carboxaldehído, 2,4-diaetilfloroglucinol y prodigiosina (Brucker *et al.*, 2008a; Brucker, *et al.*, 2008b; Woodhams, *et al.*, 2018).

Los metabolitos secundarios no son esenciales para la vida; sin embargo, cumplen con funciones importantes de protección y competencia, son una fuente importante de productos naturales con propiedades biológicas como antibacterianos, antifúngicos y antitumorales. Estos compuestos son químicamente diversos, presentan funciones específicas y son producidos solo por ciertas especies bacterianas (Karlovsky, 2008). Se ha visto que el compuesto violaceína producido por *J. lividum* presenta actividad antifúngica antibacteriana y anticancerígena (Brucker, *et al.*, 2008b; Choi *et al.*, 2015).

Análisis de la diversidad taxonómica y funcional del microbioma de la piel de la especie *C. fitzingeri*, mediante metagenómica de escopeta, revelaron una amplia gama de genes que codifican para metabolitos secundarios. Dentro de éstos encuentran antibióticos y toxinas bacterianas, los cuales pueden estar involucrados en la comunicación bacteriana pero también podrían tener un papel defensivo contra patógenos. También se identificaron seis rutas metabólicas de las siguientes clases funcionales: comunicación celular, resistencia a fármacos antimicrobianos, transportadores ABC y biosíntesis de metabolitos secundarios, las cuales se asociaron con genes de *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y *Delftia* (Rebollar *et al.*, 2018).

Tabla 2. Ejemplos de compuestos con actividad antifúngica aislados a partir de bacterias de la piel de anfibios

ANFIBIOS	BACTERIAS	METABOLITOS ANTIFUNGICO	MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN	REFERENCIA
<i>Plethodon cinereus</i>	<i>Lysobacter gummosus</i> (AB161361)	2,4-diacetilfloroglucinol	HPLC, UV-Vis, GC-MS y HR-MS	Brucker <i>et al.</i> , 2008a
<i>Plethodon cinereus</i>	<i>Janthinobacterium lividum</i>	Indol-3-carboxaldehído	HPLC, UV-Vis, RMN, HR-MS	Brucker, <i>et al.</i> , 2008a
<i>Plethodon cinereus</i>	<i>Janthinobacterium lividum</i>	Violaceina	HPLC, UV-Vis, RMN, HR-MS	Brucker, <i>et al.</i> , 2008b
<i>Plethodon cinereus</i>	<i>Bacillus spp.</i> y <i>Chitinophaga arvensicola</i>	Triptofol	HPLC	Loudon, <i>et al.</i> , 2014
<i>Atelopus zeteki</i>	<i>Serratia marcescens</i> , <i>Serratia plymuthica</i>	Prodigiosina	HPLC	Woodhams, <i>et al.</i> , 2017
<i>Craugastor crassidigitus</i>	<i>Pseudomonas cichorii</i>	Viscosina (Lipopeptido)	MALDI IMS/ MS/MS	Martin <i>et al.</i> , 2019

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución, **UV-vis:** Espectroscopia ultravioleta visible, **RMN:** Resonancia magnética nuclear, **GC-MS:** Cromatografía de gases acoplada-espectrometría de masas, **HR-MS:** Espectrometría de masas de alta resolución, **LC-MS:** Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, **MALDI IMS:** la espectrometría de masas por imágenes, **MS/MS:** las redes moleculares.

Como se ha descrito anteriormente, el estudio de la microbiota de la piel de anfibios se ha enfocado en encontrar compuestos que tengan actividad contra el hongo *B. dendrobatidis*. Sin embargo, la actividad antibacteriana de los metabolitos producidos por la microbiota de la piel de anfibios permanece muy poco estudiada. Por lo que la microbiota de la piel de anfibios representa una fuente con mucho potencial para encontrar nuevos antibióticos u otros compuestos antibacterianos (Brunetti *et al.*, 2022).

Los anfibios son un grupo ecológicamente importante de 6 mil 333 especies en el mundo, de estas especies, en México hay alrededor de 360. Los anfibios contribuyen considerablemente a que México sea considerado un país megadiverso, pues poseen un grado de endemismo cercano al 60% de sus especies. El 70% del endemismo de los anfibios mexicanos se concentra principalmente en zonas restringidas, como las islas del Golfo de California, la Sierra Madre del Sur de Guerrero y Oaxaca y el Eje Volcánico Transversal (Parra-Olea *et al.*, 2014).

En una revisión de artículos publicados entre el 2016 y el 2019 sobre el microbioma de la piel de anfibios, se encontró que hasta ese momento se había estudiado el microbioma de 331 especies, lo cual es igual al 4.9% del total de la diversidad. De estas especies, el orden de anuros de regiones tropicales han sido las más estudiadas; solo cuatro de estas especies fueron del orden de los caudados y ninguno fue del orden de los gymnophiona (Figura 4).

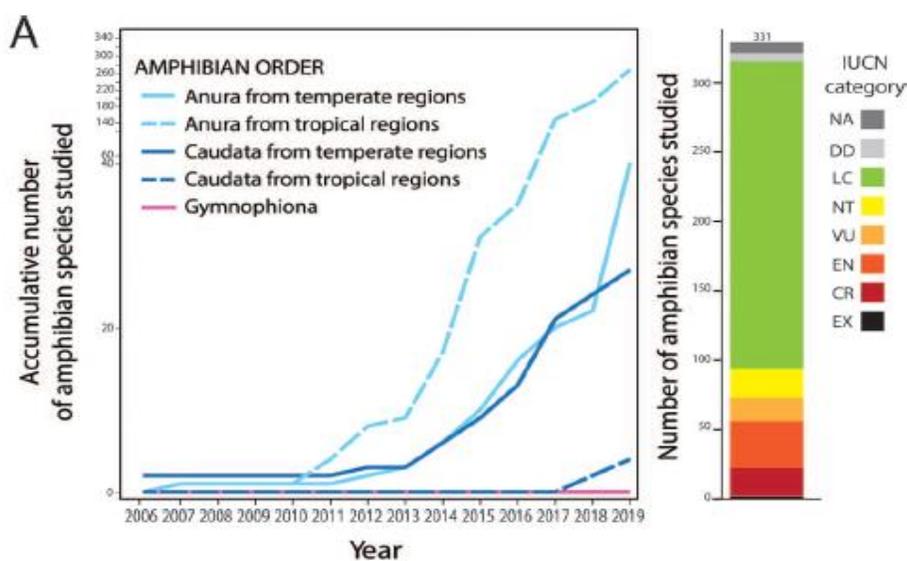


Figura 4. Número de especies de anfibios en los que se ha estudiado el microbioma cutáneo de 2006 a 2019 (Rebollar *et al.*, 2020).

Por otra parte, en este mismo trabajo se encontró que la mayoría de las especies de anfibios estudiadas (67.4%) se encontraban catalogadas como especies de menor preocupación según la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) (Rebollar *et al.*, 2020). El campo sobre el estudio de la microbiota de la piel de anfibios es relativamente reciente y hace falta mucha investigación para conocer más sobre la composición taxonómica de los microbiomas cutáneos, así como sobre los diferentes metabolitos secundarios que producen los microorganismos asociados a los anfibios.

3.3 Microbiota de *A. altamirani*

A. altamirani es una especie de anfibio que pertenece al orden de los caudados, se caracteriza por tener una longitud media de 20 a 25 cm, su cuerpo es robusto, de tonalidad oscura con manchas pardo amarillentas de forma irregular, con patas fuertes y cabeza ancha, presentan surcos en los costados, ojos pequeños, una piel suave y lisa cubierta con glándulas que la mantienen lubricada (Figura 5). El género *Ambystoma* incluye a 33 especies que se distribuyen desde el sur de Canadá hasta la zona centro de México, en nuestro país existen 18 especies y 17 de ellas son endémicas (Lemos-Espinal *et al.*, 2015).

Las especies de salamandras originarias de México que componen este género son conocidas comúnmente como “ajolotes”, la especie *A. altamirani* se conoce como ajolote de montaña y se encuentra distribuida en arroyos permanentes que corren a través del cinturón volcánico transmexicano que se expande entre el Estado de México, Morelos y Ciudad de México. *A. altamirani* se encuentran en categoría de especie amenazada según la NOM-059 y catalogada en peligro según de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN). Su alimentación se basa principalmente en artrópodos acuáticos y terrestres, moluscos y anélidos y algunas especies del género *Hyla* (Lemos-Espinal *et al.*, 2015).

El grupo de la Dra. Eria Rebollar, del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM, ha trabajado en el estudio de la diversidad microbiana de la piel de anfibios y en la identificación de bacterias con actividad antifúngica contra el hongo *B. dendrobatidis* (Martínez-Ugalde *et al.*, 2022). En un estudio reciente se realizó un muestreo de la piel de 48 individuos de *A. altamirani* en una población del municipio de Isidro Fabela, Estado de México, obteniendo una colección de 260 cepas bacterianas pertenecientes a diversos géneros según la secuenciación del gen 16S rRNA (Morales, 2018). Recientemente se estableció una colaboración entre la Dra. Rebollar y el Dr. Víctor Bustamante para evaluar la producción de posibles nuevos antibióticos en esta colección de bacterias.



Figura 5. Fotos de ajolote de *A. altamirani*. A) **Organismo juvenil.** Se caracteriza por la presencia de branquias y por ser totalmente acuático, la coloración de su piel es marrón-pálido con manchas amarillas y negras. B) **Organismo adulto.** Presenta metamorfosis (sin branquias) con capacidad de habitar el medio terrestre, su coloración es café-oscuro con manchas negras (Morales, 2018).

Interesantemente, en un primer análisis se encontró que algunas cepas presentan actividad inhibitoria de crecimiento contra distintas bacterias consideradas por la OMS como patógenos prioritarios. Con base a lo anterior, en este proyecto nos planteamos analizar la actividad de 100 cepas bacterianas aisladas de la piel de *A. altamirani* contra diferentes cepas de los patógenos prioritarios *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *S. aureus*, incluyendo cepas multi-resistentes a antibióticos. Esperamos caracterizar a mayor profundidad al menos una cepa del ajolote que presente actividad antibacteriana de espectro extendido.

4. JUSTIFICACIÓN

La resistencia a antibióticos representa un grave problema de salud a nivel mundial, por lo que es prioritario buscar nuevos compuestos con actividad antimicrobiana. En nuestro grupo se ha encontrado que algunas bacterias aisladas de la piel del ajolote (*A. altamirani*) presentan actividad inhibitoria del crecimiento contra bacterias patógenas, en particular contra varias consideradas por la OMS como patógenos prioritarios para el desarrollo de nuevos antibióticos. Con base en esto, en este proyecto analizaremos a mayor profundidad la posibilidad de identificar nuevos antibióticos a partir de las bacterias de la microbiota del ajolote, con lo cual esperamos aportar al control de la problemática de salud mundial ocasionada por la resistencia a antibióticos.

5. HIPÓTESIS

Las bacterias aisladas de la piel del ajolote *A. altamirani* tendrán la capacidad de inhibir el crecimiento o matar a cepas resistentes a antibióticos de los patógenos prioritarios *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y/o *S. aureus*.

6. OBJETIVO GENERAL

Identificar y caracterizar bacterias aisladas de la piel de ajolote *A. altamirani* que tengan actividad antibacteriana contra *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y/o *S. aureus*.

6.1 Objetivos particulares

- Determinar si la presencia o el sobrenadante de cultivo directo de bacterias del ajolote inhibe el crecimiento de *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *S. aureus*, incluyendo cepas multi-resistentes a antibióticos.
- Analizar la actividad antibacteriana del sobrenadante concentrado mediante liofilización de las cepas que tengan actividad inhibitoria de amplio espectro.
- Extraer compuestos con actividad antibacteriana a partir de las bacterias seleccionadas usando diferentes solventes.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

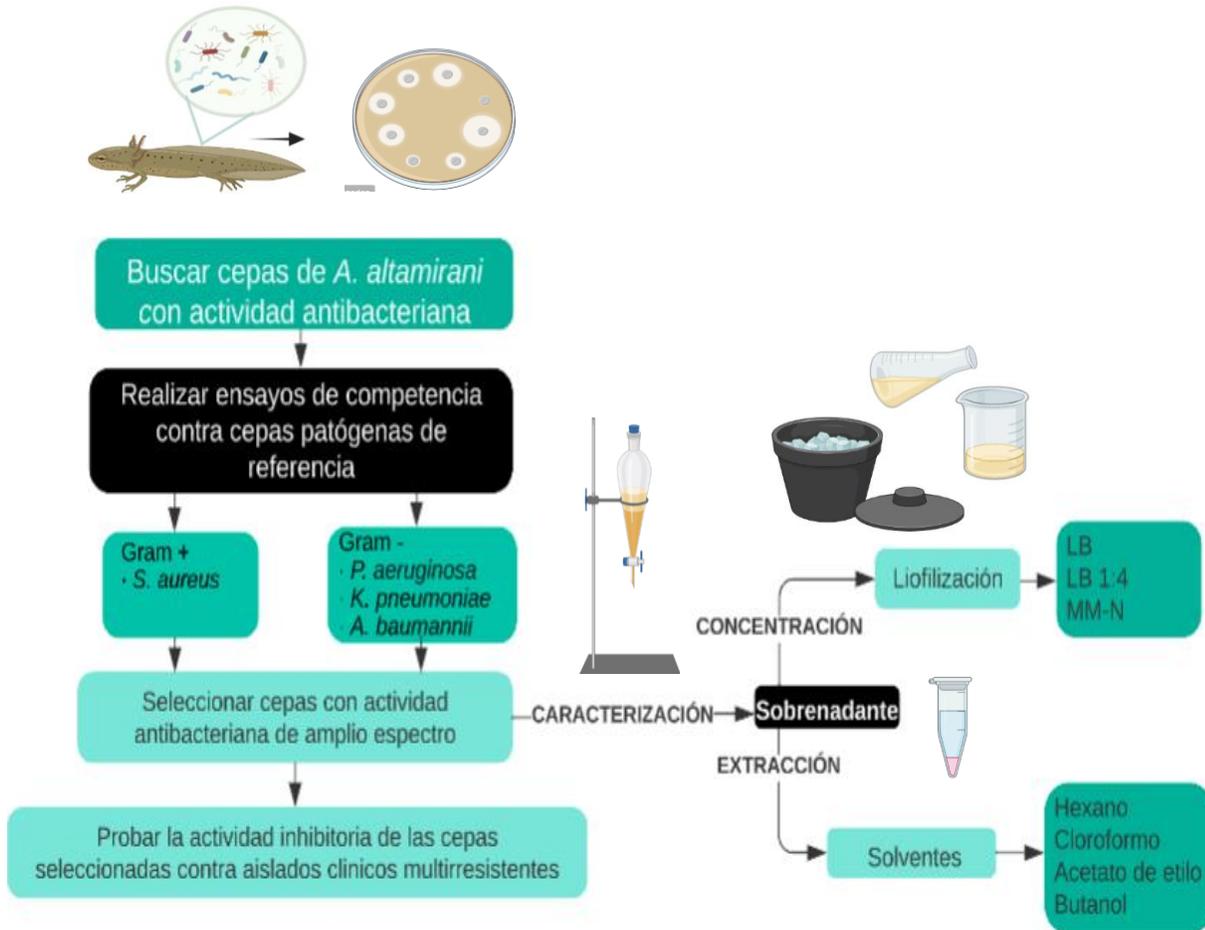


Figura 6. Estrategia experimental para el análisis de la actividad antimicrobiana de bacterias aisladas de la piel del ajolote *A. altamirani*

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Cepas empleadas en los ensayos de actividad inhibitoria

Las 100 cepas de *A. altamirani* probadas en este estudio fueron proporcionadas por la Dra. Eria Rebollar Caudillo, investigadora del Centro de Ciencias Genómicas (CCG- UNAM). La actividad inhibitoria de las bacterias aisladas de *A. altamirani* se probó contra las siguientes cepas patógenas de referencia: *A. baumannii* ATCC 17978, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* ATCC 700603 y *S. aureus* ATCC 29213.

La cepa usada como control negativo en este estudio, no productora de antibacterianos, fue *E. coli* DH10B. Como control positivo se usó el compuesto CinnAcar, el cual es un extracto de canela (*Cinnamomun zeylanicum*) y su principal compuesto es el cinamaldehído que se conoce tiene efecto antibacteriano. Las bacterias que presentaron actividad inhibitoria contra al menos tres cepas patógenas de referencia fueron seleccionadas para probar su actividad en aislados clínicos de: *A. baumannii* (Tabla 3), *K. pneumoniae* (Tabla 4), *P. aeruginosa* (Tabla 5) y *S. aureus* (Tabla 6) con resistencia a diferentes antibióticos.

Tabla 3. Lista de cepas *A. baumannii* con resistencia a diferentes antibióticos

Cepas de <i>A. baumannii</i>	Resistencia a antibióticos
A687 MDR	CAZ, FEP,CIP,DOR,IMP,MEM
A770 MDR	CIP
A801 MDR	CAZ, FEP,CIP, DOR, IMP, MEM
A805 MDR	GEN,CAZ,FEP,CIP
A808 MDR	CAZ, FEP,CIP, DOR, IMP,MEM
A811 MDR	CAZ,CIP,DOR,IMP,MEM
A822 MDR	CAZ,FEP,IMP,MEM,AMP
A829 MDR	CAZ,FEP,IMP,MEM,AMP

AK: amikacina / **GEN:** gentamicina / **AZT:** aztreonam/ **CAZ:** ceftazidima / **FEP:** cefepime / **CIP:** ciprofloxacina / **LVX:** levofloxacina / **DOR:** doripenem / **IMP:** imipenem / **MEM:** meropenem / **AMP:** ampicilina

Tabla 4. Lista de cepas de *K. pneumoniae* con resistencia a diferentes antibióticos.

Cepas de <i>K. pneumoniae</i>	Resistencia a antibióticos
7034	Colistina (mgrb) / Carbapenemasa (KPC-2) /BLEE (SHV-12, OXA-9)
13526	Serotipo K1/Hv/HmV/ BLEE (SHVH-36)
14346	BLEE (SHV-28)
10271	Serotipo K2/ Hv/Hmv
11271	Clásica BLEE (CTX-15)
EB2743	Sensible a CAR
EB381	Resistente a CAR
123/01	Sin identificar

CAR: Carbapenémicos / **BLEE:** B-lactamasa de espectro extendido / **COL:** Colistina

Tabla 5. Lista de cepas de *P. aeruginosa* con resistencia a diferentes antibióticos

Cepas de <i>P. aeruginosa</i>	Resistencia a antibióticos
17-3375 MDR	AK/GEN/DOR/IMP/MEM/TZP
P1165 XDR	AK/CAZ/CIP/DOR/FEP/GEN/IMP/LVX/MEM/TZP
P1473 MDR	AK/GEN/AZT/CAZ/FEP/CIP/LVX/DOR/IMP/MEM
P1483 MDR	AK/CAZ/CIP/DOR/FEP/GEN/IMP/LVX/MEM/TZP
P1503 MDR	AK/GEN/CAZ/FEP/CIP/LVX/DOR/IMP/MEM/TZP
P1546 MDR	AK/GEN/DOR/IMP/MEM/TZP
P1547 MDR	AK/CAZ/CIP/DOR/FEP/GEN/IMP/LVX/MEM/TZP

AK: amikacina / **GEN:** gentamicina / **AZT:** aztreonam / **CAZ:** ceftazidima / **FEP:** cefepime / **CIP:** ciprofloxacina / **LVX:** levofloxacina / **DOR:** doripenem / **IMP:** imipenem / **MEM:** meropenem / **AMP:** ampicilina / **TZP:** tazobactam + piperacilina

Tabla 6. Lista de cepas de *S. aureus* con resistencia a diferentes antibióticos

Cepas de <i>S. aureus</i>	Resistencia a antibióticos
4N3A	PEN,CLIN
6N3 (MRSA)	PEN, TRA,ERT,OX
8N2 (MRSA)	PEN,TRA,ERT, CLIN, GEN, OX
13N2A	PEN,TRA,CLIN
17F3A	PEN/ERT/CLIN
18F1 (MRSA)	PEN/ERT/OX/CLIN
24N2A	PEN/TRA/ERT/CLIN/GEN

PEN: penicilina/**TRA:** tetraciclina/**ERT:** eritromicina/**CLIN:** clindamicina/**GEN:** gentamicina/**MET:** meticilina, **OX:** Oxacilina

8.2 Ensayos de competencia para evaluar la actividad antibacteriana

Primero se prepararon stocks en glicerol de las cepas bacterianas del ajolote (cepas productoras) y las cepas patógenas (cepas césped) que se encontraban resguardadas a -70°C . De estos stocks se realizó la inoculación de las cepas en cajas Petri con medio LB y se dejaron crecer durante toda la noche a 30°C . Posteriormente, a partir de las bacterias crecidas en agar LB se realizaron pre-inóculos de las cepas productoras y las cepas césped a evaluar en 5 ml de LB y se dejaron crecer toda la noche a 37°C .

8.2.1 Preparación del cultivo césped

A partir de los pre-inóculos crecidos durante toda la noche se pusieron a crecer nuevos cultivos de las cepas césped, inoculando 1:50 en medio LB líquido (para un cultivo de 50 ml se colocó un 1 ml del pre-inóculo + 50 ml de LB; para un cultivo de 5 ml se colocaron $100\ \mu\text{l}$ del pre-inóculo + 5 ml de LB) y se dejaron creciendo a 37°C en agitación, hasta alcanzar una $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$ de 0.6 ($\sim 1 \times 10^9$ bacterias / ml). Una vez que las cepas patógenas llegaron a la $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$ de 0.6 se realizó una dilución con LB 1:10.

El volumen de esta dilución fue diferente según cuántas cajas se usaron en los ensayos de inhibición. Como ejemplo, para obtener 25 ml de esta dilución se mezclaron 2.5 ml del cultivo a $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$ de 0.6 más 22.5 ml de LB. Este cultivo diluido 1:10 tiene $\sim 1 \times 10^8$ bacterias / ml y es el cultivo que se utiliza como césped. Para realizar los ensayos de inhibición se prepararon cajas Petri con agar LB que tuvieran 4 mm de espesor, para esto se agregaron 20 ml de agar LB fundido a cajas petri de 90 x 15 mm. Posteriormente se agregaron 5 ml de cultivo césped a las cajas petri durante 1 min para que las bacterias de la suspensión quedaran adheridas al agar LB. El exceso de la suspensión bacteriana se retiró con una pipeta de 5 ml estéril y se dejaron secando las cajas abiertas en la campana de flujo laminar, durante 20 min.

8.2.2 Preparación de cepas productoras.

Los pre-inóculos de las cepas productoras crecidos toda la noche se concentraron. Para esto se colocó 1.5 ml del pre-inóculo en un tubo eppendorf estéril y se centrifugó a 3 min a 13,000 rpm, posteriormente se retiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió con $50\ \mu\text{l}$ de LB líquido. Finalmente se realizó la inoculación en las cepas césped con $10\ \mu\text{l}$ de las suspensiones bacterianas de las cepas productoras y se incubaron a 37°C .

8.2.3 Preparación del sobrenadante

Para analizar el sobrenadante de los cultivos, a partir de los pre-inóculos de las cepas productoras se colocó 1.5 ml del pre-inóculo en un tubo eppendorf estéril y se centrifugó a 3 min a 13,000 rpm y posteriormente el sobrenadante se filtró con tres diferentes filtros Millex: de 0.45 μm con membrana MCE (éster de celulosa mixta), de 0.22 μm con membrana PVDF (fluoruro de polivinilideno) y de 0.45 μm con membrana PES (polipropileno). Finalmente, se hicieron pozos en las cajas de agar con la cepa césped, donde se colocaron 50 μl , 100 μl o 200 μl del sobrenadante de las cepas productoras y al finalizar las cajas se incubaron a 37°C.

8.3 Evaluación de la producción de piocianina.

La cepa ER-21 fue seleccionada de las 100 cepas debido a que fue en la única que se observó actividad contra las cuatro cepas patógenas de referencia. Debido a que la cepa ER-21 pertenece al género *Pseudomonas* quisimos investigar si la actividad antibacteriana de la cepa ER-21 se debe a la producción de piocianina. Se utilizó el medio selectivo cetrimida para evaluar de manera cualitativa la producción de piocianina, mediante la observación de colonias bacterianas con una coloración verde-azul. También se cuantificó la producción de piocianina como se describe a continuación.

8.3.1 Preparación de la muestra.

Para cuantificar la producción de piocianina se pusieron a crecer pre-inóculos de la cepa de interés en 3 ml de medio LB durante toda la noche a la temperatura que se desea evaluar. A partir del pre-inoculo crecido durante toda la noche se realizó un cultivo en 30 ml de medio LB (1:50) y se pusieron a crecer las bacterias en agitación a 225 rpm hasta que alcanzaron una D.O._{600nm}. Los cultivos se realizaron por triplicado.

8.3.2 Extracción de la muestra.

La muestra se colocó en tubos falcón de 50 ml y se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente se colocaron 5 ml del sobrenadante en un matraz de 125 ml y se adicionaron 3 ml de cloroformo y se mezcló por 30 segundos tres veces hasta que las fases se separaron. Una vez separadas las fases se tomó la fase orgánica (azul) y se colocaron en un tubo de vidrio limpio y se le

agregó 1 ml de HCl 0.2 N y se mezcló hasta obtener una coloración rosa-roja y finalmente la fase acuosa (rosa-roja) se colocó en un tubo limpio. Si existe producción de piocianina ésta se cuantifica midiendo la absorbancia a 520 nm, se usó un 1 ml de HCl 0.2 N como blanco. Para hacer el cálculo de la concentración de piocianina en $\mu\text{g/ml}$ el valor obtenido de la absorbancia a 520 nm se multiplica por el coeficiente de extinción molar de 17.072.

8.4 Liofilización

Para liofilizar el sobrenadante de cultivo se pusieron a crecer las cepas de interés en 200 ml de medio LB a la temperatura de crecimiento adecuada durante 24 hrs. Posteriormente se utilizaron tubos falcón de 50 ml para centrifugar el cultivo a 8,000 rpm durante 15 minutos; el sobrenadante fue decantado, se colocó en un matraz estéril y se guardó a 4°C hasta su uso. Después, el sobrenadante que se encontraba a 4°C se vació en vasos de vidrio y estos se colocaron en hielo seco al cual se le adicionó etanol. Los vasos se comenzaron a rotar hasta que la muestra quedara congelada sobre las paredes del vaso de vidrio. Finalmente, los vasos con las muestras congeladas se conectaron al liofilizador y se procesaron durante 24 horas.

8.5 Extracción con solventes

Para la extracción con solventes las cepas se inocularon en un matraz de 500 ml que contenía 100 ml de LB y se pusieron a incubar durante toda la noche a la temperatura de crecimiento adecuada. Al siguiente día, las muestras se colocaron en tubos falcón de 50 ml y se centrifugaron a 8,000 rpm durante 15 minutos, el sobrenadante se colocó en matraces estériles de 250 ml y se guardó a 4°C hasta su uso. Los solventes utilizados fueron: hexano, cloroformo, acetato de etilo y butanol. Para realizar la extracción se adicionaron los 100 ml del sobrenadante que se encontraba a 4°C en el embudo de separación y se adicionaron 10 ml del solvente a evaluar, después de 10 a 15 minutos se recuperó la fase orgánica se colocó en una caja Petri y esto se repitió tres veces. La fase orgánica recuperada en la caja Petri se dejó secar en la campana de extracción para que el solvente se evaporara. Finalmente, la muestra se resuspendió en DMSO al 5%.

8.6 Medios de cultivo utilizados

Para los ensayos de competencia se utilizó el medio “lysogeny broth” (LB) que es rico en nutrientes, ya que contiene 10g de peptona de caseína, 5g de NaCl y 5g de extracto de levadura por litro. Para evaluar de manera cualitativa la producción de piocianina se utilizó el medio selectivo cetrimida que inhibe el crecimiento especies bacterianas que no pertenezcan al género *Pseudomonas* y promueve la producción de metabolitos secundarios (piocianina, pioverdina, piomelanina y fluoresceína). Este medio contiene 20 g de peptona de gelatina, 1.4 de MgCl₂, 10 g de K₂SO₄ y 0.3 g de cetrimida por litro.

La actividad inhibitoria del sobrenadante liofilizado y las extracciones con solventes fueron evaluadas en el medio Mueller Hinton, este es un medio nutritivo, no selectivo, compuesto por 2.0 g de extracto de carne, 17.5 g de hidrolizado de caseína, 1.5 g de almidón disueltos en 1 litro de agua destilada. Para probar la actividad antibacteriana del sobrenadante liofilizado en medio mínimo se utilizó el medio MM-N ajustado a pH 7.5, el cual está compuesto por:

Tabla 7. Receta con soluciones stock para la preparación de medio mínimo MM-N

Concentración final	Solución Stock	Para 1 L.	Para 250 ml	Para 100 ml
KCl 5 Mm	KCl 0.5 mM	10 ml	2.5 ml	1 ml
KH ₂ PO ₄ 1 mM	KH ₂ PO ₄ 0.1 mM	10 ml	2.5 ml	1 ml
(NH ₄) ₂ SO ₄ 7.5 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄ 0. 75 mM	10 ml	2.5 ml	1 ml
K ₂ SO ₄ 0.5 mM	K ₂ SO ₄ 50 mM	10 ml	2.5 ml	1 ml
Casaminoácidos 1g/L	Casaminoácidos 100 g/L	10 ml	2.5 ml	1 ml
Glicerol 0.5 %	Glicerol 100 %	5 ml	1.25 ml	0.5 ml
MgCl ₂ 0.2 mM	MgCl ₂ 1 mM	200 ul	50 ul	20 ul
Tris. HCl 0.1 M (pH 7.5)	Tris. HCl 2 M (pH 7.5)	50 ml	12.5 ml	5 ml
Agua destilada		895 ml	223.75 ml	89. 5 ml

NOTA: Este medio no se puede almacenar mucho tiempo porque se forman cristales

9. RESULTADOS

En este proyecto se evaluó la actividad antibacteriana de 100 cepas (ER-1- ER-100) aisladas de la piel del ajolote *A. altamirani* contra cuatro cepas patógenas de referencia (Figura 7). Los resultados mostraron que dos cepas tuvieron actividad contra *A. baumannii* ATCC 17978, 16 contra *P. aeruginosa* ATCC27853, 33 contra *S. aureus* ATCC 29213 y una contra *K. pneumoniae* ATCC 700603 (Tabla 8). Las cepas de *A. altamirani* fueron identificadas mediante secuenciación del gen ribosomal 16s por el grupo de la Dra. Eria Rebollar, los géneros más abundantes con actividad antibacteriana fueron: *Curtobacterium spp* (ER-31, ER-62, ER-64, ER-78) que inhibió cepas de *S. aureus*; *Brevundimonas spp* (ER-30, ER-58, ER-76 Y ER-77), *Methylobacterium spp* (ER-39, ER-66, ER-90) y *Arthrobacter spp.* (ER-54, ER-71, ER-72, ER-74, ER-79) que tuvieron actividad inhibitoria contra *P. aeruginosa* y *S. aureus* (Apendice A).

Tabla 8. Cepas de *A. altamirani* con actividad antibacteriana contra cepas patógenas

Cepas patógenas de referencia	*ID de las cepas de <i>A. altamirani</i> con actividad inhibitoria
<i>A. baumannii</i> ATCC 17978	21,99
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	2,14,19,21,22,24,30,34,39,68,69,70,71,72,96,97
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	21
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	2,18,19,21,31,39,45,50,54,58,61,62,63,64,65,66,73,74,76,77,78,79,80,83,84,86,89,90,91,96,97,98,99

*Se indica el número de aislado de *A. altamirani* que mostro actividad inhibitoria

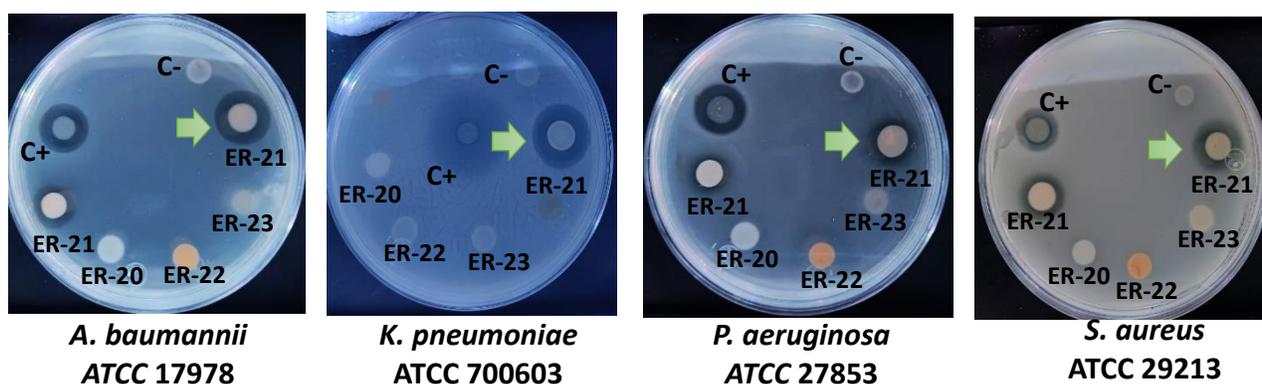


Figura 7. Ensayos de competencia de bacterias aisladas de *A. altamirani* contra cuatro cepas patógenas de referencia (imágenes representativas). Control negativo: *E. coli* DH10B. Control positivo: CinnAcar. Halo de inhibición de la cepa ER-21 indicado con flechas verdes.

Como el objetivo de este proyecto fue buscar cepas con actividad inhibitoria de amplio espectro contra: *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *S. aureus* la cepa ER-21 fue seleccionada para continuar con la investigación ya que presentó actividad antibacteriana contra las cuatro bacterias patógenas. La cepa usada como control negativo (*E. coli* DH10B) no formó halo de inhibición y el compuesto CinnAcar usado como control positivo mostró actividad inhibitoria en todos los casos (Figura 7).

9.1 Condiciones de crecimiento de la cepa ER-21

Se sabe que los metabolitos secundarios bacterianos, son productos de bajo peso molecular no esenciales para el crecimiento, que se producen mayormente durante la fase estacionaria de crecimiento de los microorganismos productores (Ruiz *et al.*, 2010). Así, consideramos importante determinar la cinética de crecimiento de la cepa ER-21. Los resultados mostraron que la cepa ER-21 entra en fase estacionaria entre las 20 y 24 horas en medio LB, con base en esto, las muestras de cultivos de la cepa ER-21 para experimentos posteriores se tomaron a las 24 horas (Figura 8).

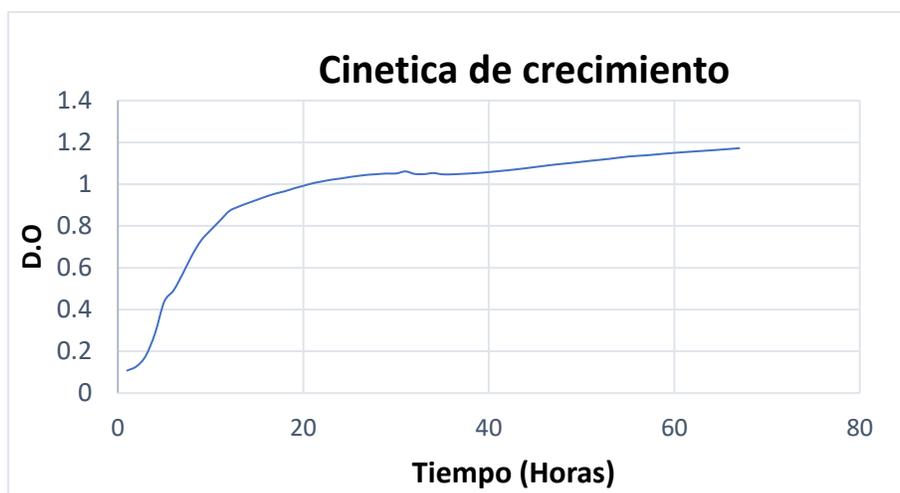


Figura 8. Cinética de crecimiento de la cepa ER-21 en medio LB.

Para determinar a qué temperatura se observa mejor la actividad antibacteriana de la cepa ER-21 se probaron tres temperaturas de crecimiento de la cepa ER-21 (temperatura ambiente (TA), 30° C y 37° C), así como dos temperaturas de incubación de los ensayos de difusión en disco (30° C y 37° C) (Figura 9). La actividad inhibitoria de la cepa ER-21 se probó contra *A. baumannii* ATCC 17978.

Los resultados que obtuvimos mostraron que la mejor formación de halos de inhibición se observó cuando la temperatura de crecimiento y de incubación de los ensayos de difusión en disco fue a 30°C. Por lo que esta fue la temperatura a la cual se realizaron todos los ensayos de difusión en disco en este proyecto.

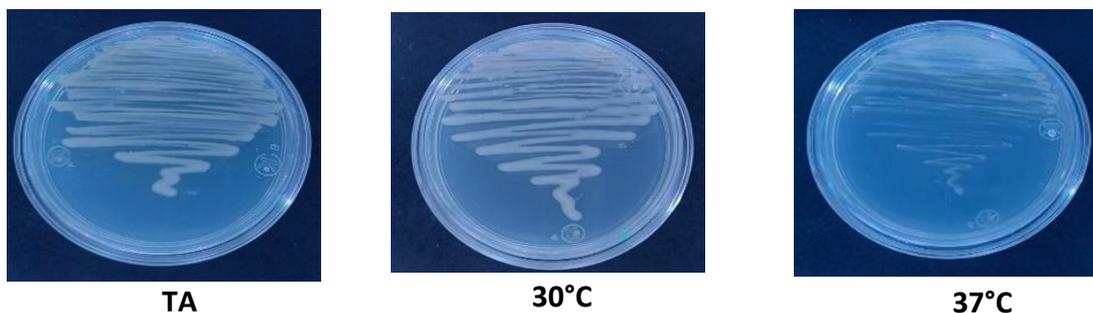


Figura 9. Efecto de diferentes temperaturas en el crecimiento de la cepa ER-21

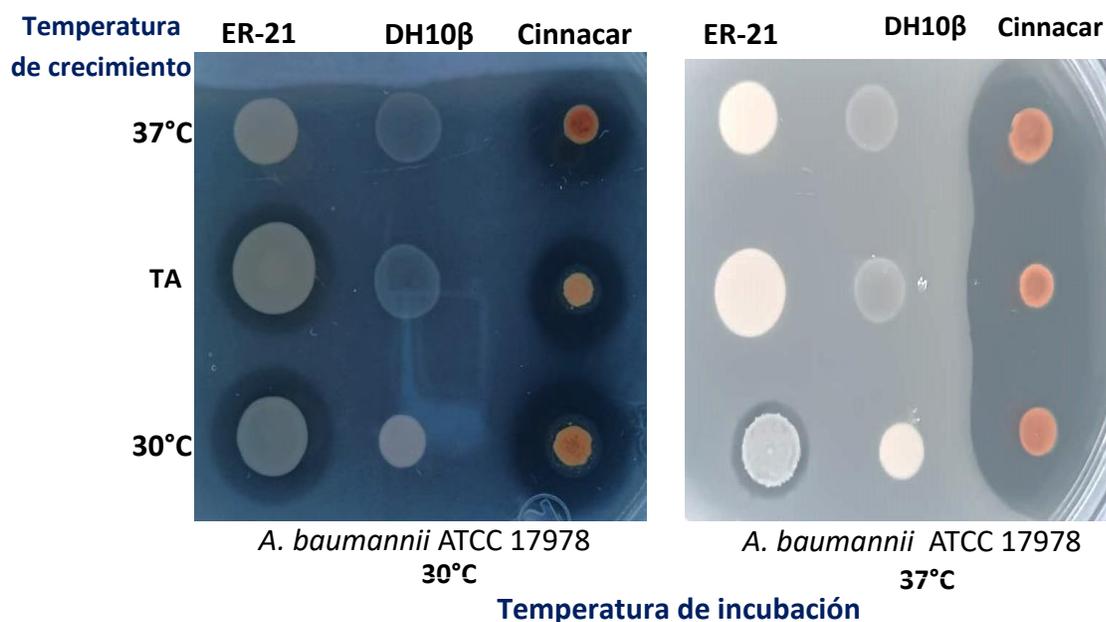


Figura 10 Actividad inhibitoria de la cepa ER-21 contra *A. baumannii* ATCC 17978 a diferentes temperaturas de incubación (30°C y 37°C) y de crecimiento (TA, 30°C y 37°C). Control negativo: *E. coli* DH10B. Control positivo: CinnAcar.

9.2 La cepa ER-21 no produce piocianina.

Nuestros resultados anteriores muestran que la cepa ER-21 inhibe el crecimiento de diferentes bacterias patógenas. En el grupo de la Dra. Rebollar se identificó a la cepa ER-21 como perteneciente al género *Pseudomonas spp*, con base a la secuenciación del gen ribosomal 16S. Es bien conocido que la especie *P. aeruginosa* produce el pigmento piocianina, el cual es un alcaloide fenazínico de coloración verde-azul con la capacidad de oxidar y reducir moléculas, la piocianina tiene actividad antibacteriana al afectar rutas metabólicas vitales como: la cadena de transporte de electrones, el transporte vesicular y el crecimiento celular (Justo *et al.*, 2014). Esto nos llevó a investigar si la actividad antibacteriana de la cepa ER-21 se debe a la producción de piocianina. Para esto determinamos y comparamos la producción de piocianina, de manera cualitativa y cuantitativa, en las cepas ER-21, *E. coli* DH10 β (control negativo) y *P. aeruginosa* PAO1 (control positivo).

Para la parte cualitativa se utilizó el medio agar selectivo cetrimida, el cual solo permite el crecimiento de bacterias del género *Pseudomonas* y favorece la producción de pigmentos como la piocianina. En la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 se observó la coloración verde-azul característica de la producción de piocianina; en contraste, la cepa ER-21 creció, pero no se observó esta coloración y la cepa *E. coli* DH10 β no creció, como era de esperarse (Figura 11).

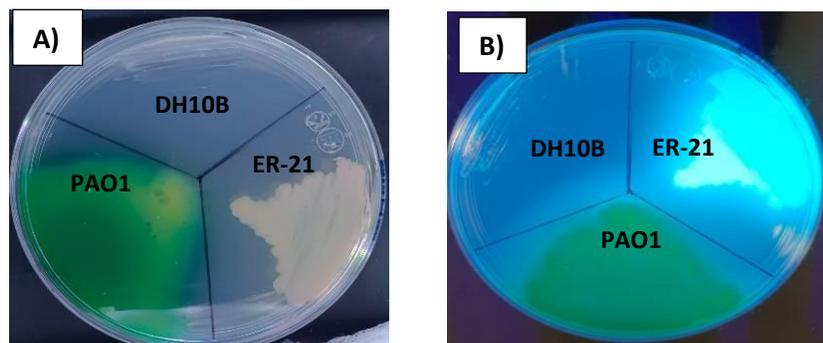


Figura 11. Evaluación cualitativa de la producción de piocianina de la cepa ER-21. A) Producción de piocianina en agar cetrimida, evidenciado por la coloración verde-azul. B) Producción de piocianina y fluoresceína (fluorescencia) en agar cetrimida visto con luz UV. Control positivo: *P. aeruginosa* PAO1, control negativo: *E. coli* DH10 β .

En los pasos para la cuantificación de piocianina se observó también de manera cualitativa la producción de este pigmento. En el cultivo líquido de la cepa *P. aeruginosa* PAO1 (control positivo) se observó una coloración verde-azul característica de la piocianina, posteriormente, en la extracción con

cloroformo se observó una coloración azul en la fase orgánica y en la extracción con HCl 0.2N se observó una coloración rosa en la fase acuosa la cual se cuantifico mediante como se menciona en materiales y métodos; para las cepas ER- 21 y *E. coli* DH10 β no se observaron estas coloraciones (Figura 12).

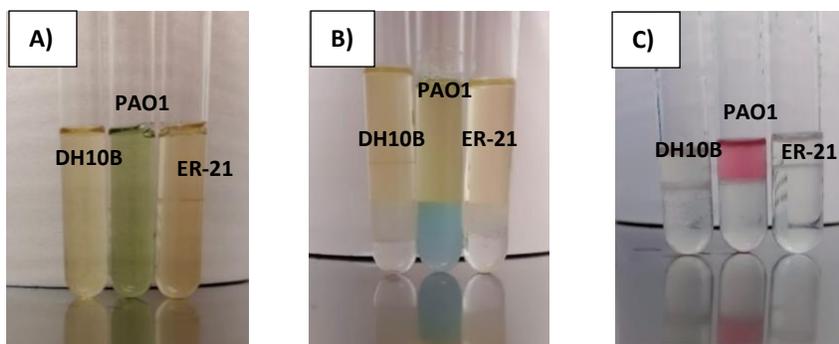
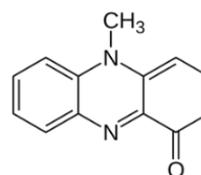
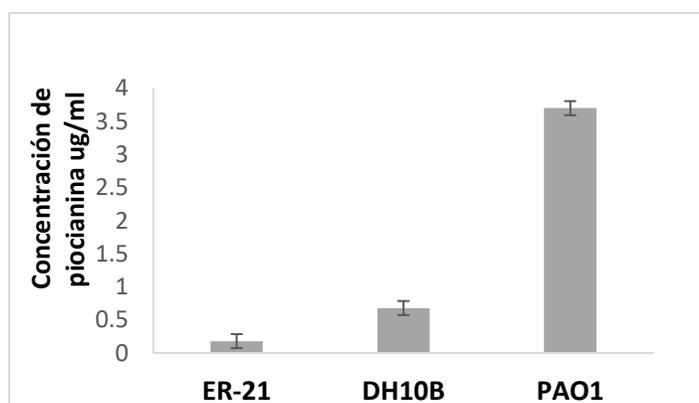


Figura 12. Detección de la producción de piocianina en medio LB de la cepa ER-21. A) Producción de piocianina en medio LB, coloración verde en el cultivo usado como control positivo B) Extracción con cloroformo, coloración azul en la fase orgánica en el control positivo, C) Extracción con HCl 0.2N, coloración rosa en la fase acuosa. Control positivo: *P. aeruginosa* PAO1, control negativo: *E. coli* DH10 β .



CEPA	Absorbancia 520 nm	Concentración de piocianina µg/ml
ER-21	0.01	0.18
DH10B	0.04	0.68
PAO1	0.216	3.7

Figura 13. Cuantificación de piocianina en las cepas ER-21, *P. aeruginosa* PAO1 (control positivo) y *E. coli* DH10 β (control negativo) crecidas en medio LB a 37° C

Los resultados de la cuantificación de piocianina mostraron que la cepa *P. aeruginosa* PAO1 produce 3.7 µg/ml, mientras que para las cepas ER-21 y *E. coli* DH10 β se obtuvieron valores menores a 0.7 µg/ml que pueden considerarse de fondo del experimento (Figura 13). En conjunto, estos resultados indican que la actividad antibacteriana de la cepa ER-21 no se debe a la producción de piocianina.

9.3 Evaluación de la actividad antibacteriana de cepas de *P. fluorescens* contra cepas patógenas de referencia

P. fluorescens es otra especie de *Pseudomonas* para la que se ha reportado la producción de compuestos antibacterianos contra bacterias patógenas de plantas (Pérez *et al.*, 2015; Álvarez-García *et al.*, 2020). Por lo tanto, decidimos evaluar la posibilidad de que la actividad antibacteriana de la cepa ER-21 se deba a compuestos similares a los que produce *P. fluorescens*. Para esto, analizamos la actividad antibacteriana de una cepa de referencia de *P. fluorescens* 1100 y cuatro cepas aisladas de *A. altamirani* (ER-20, ER-101, ER-105, ER-166) que fueron identificadas como *P. fluorescens* por el grupo de la Dra. Rebollar, con base a la secuenciación del gen ribosomal 16S.

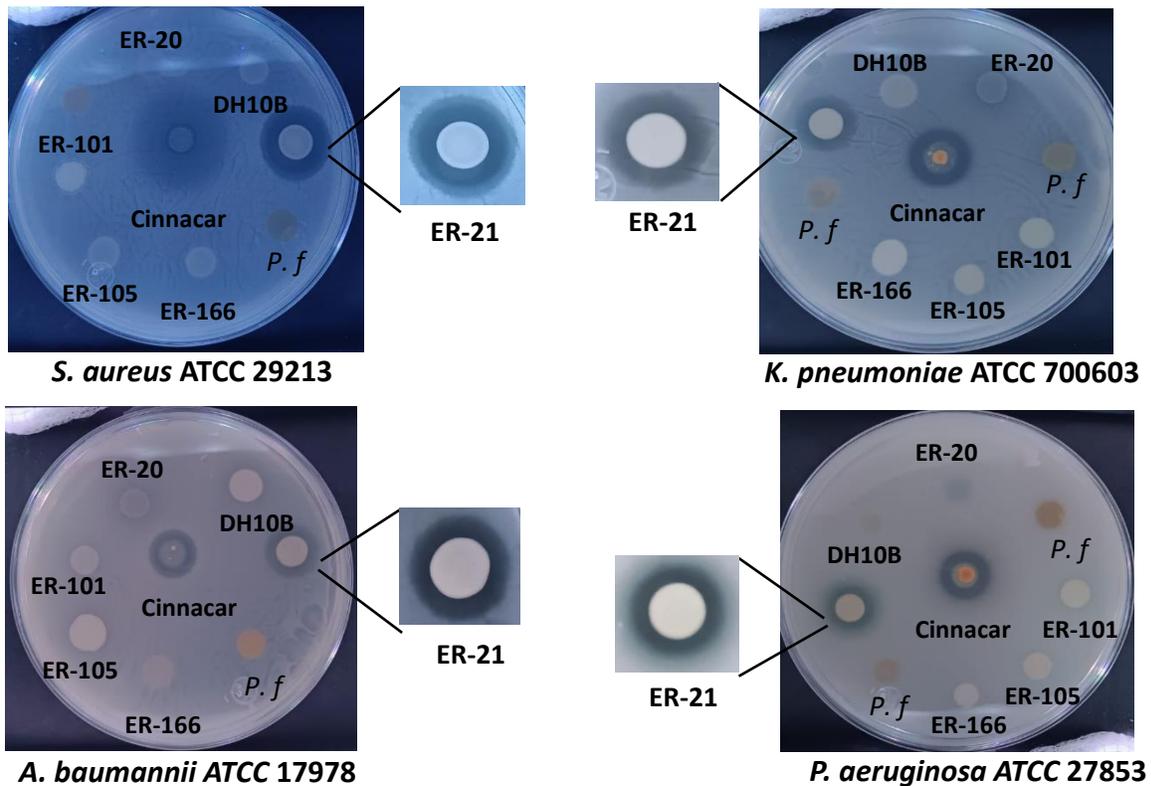


Figura 14. Ensayos de competencia de colonias de *P. fluorescens* aisladas de *A. altamirani* (ER-20, ER-101, ER-105, ER-166) y una cepa de referencia *P. fluorescens* 110 de referencia contra bacterias patógenas. Control negativo: *E. coli* DH10 β , control positivo: CinnAcar

Los resultados mostraron que las cepas de *P. fluorescens* no inhiben el crecimiento de las cepas patógenas de referencia: *A. baumannii* ATCC 17978, *P. aeruginosa* ATCC27853, *K. pneumoniae* ATCC 700603 y *S. aureus* ATCC 29213 (Figura 15). Como era esperado, la cepa ER-21 y el compuesto CinnAcar (control positivo) sí mostraron actividad antibacteriana en las cepas patógenas probadas, mientras que la cepa *E. coli* DH10 β (control negativo) no (Figura 15).

9.4 Actividad inhibitoria de la cepa ER-21 contra cepas patógenas de referencia

El espectro de la actividad antibacteriana de la cepa ER-21 se analizó nuevamente mediante ensayos de competencia en colonia, como se describe en Materiales y Métodos. La cepa ER-21 inhibió el crecimiento de las cuatro bacterias patógenas de referencia evaluadas: *A. baumannii* ATCC 17978, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* ATCC 700603 y *S. aureus* ATCC 29213 (Figura 14). Como se esperaba, la cepa usada como control negativo (*E. coli* DH10 β) no formó halo de inhibición y el compuesto CinnAcar usado como control positivo sí formó halo de inhibición (Figura 14). Estos resultados confirman que la cepa ER-21 tiene actividad inhibitoria tanto contra bacterias Gram-positivas como Gram-negativas.

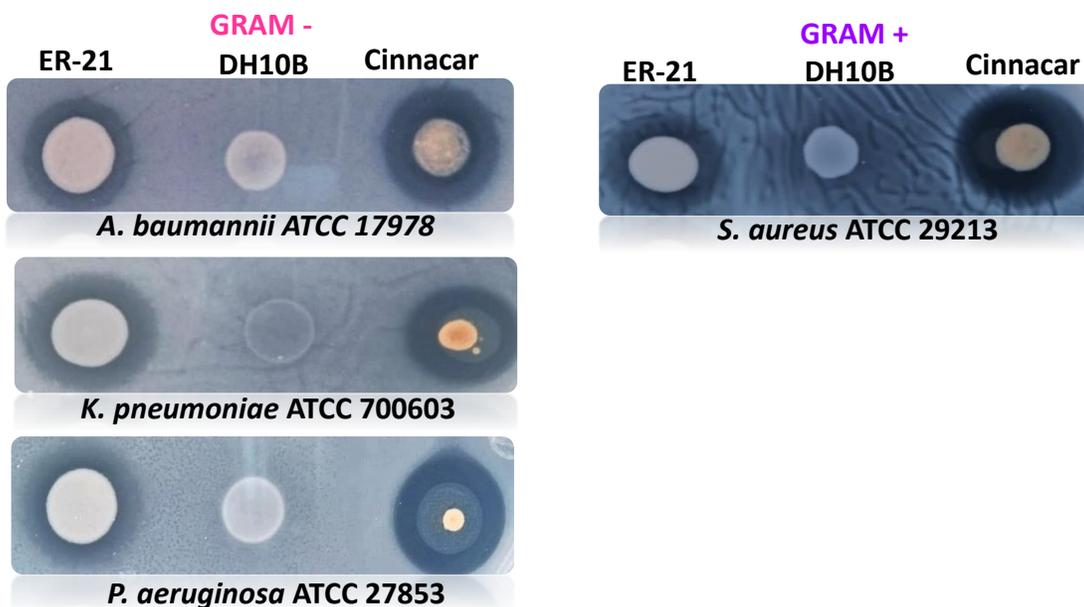


Figura 15. Halos de inhibición de crecimiento generados por la cepa ER-21 contra cepas patógenas de referencia. Control negativo: *E. coli* DH10 β ; control positivo: CinnAcar

9.5 La cepa ER-21 inhibe el crecimiento de bacterias patógenas resistentes a antibióticos

Un punto importante para la identificación de posibles nuevos antibacterianos es que los compuestos en estudio tengan efecto contra cepas resistentes a antibióticos. Con base en esto, probamos la actividad antibacteriana de la cepa ER-21 contra aislados clínicos que presentan diferentes perfiles de resistencia a antibióticos, mediante los ensayos de difusión por colonia.

Se evaluaron entre seis a ocho aislados clínicos resistentes a antibióticos de cada bacteria patógena en estudio: *A. baumannii* (Figura 16), *P. aeruginosa* (Figura 17), *K. pneumoniae* (Figura 18) y *S. aureus* (Figura 19). Estas cepas tienen resistencia contra cinco familias de antibióticos: aminoglucósidos, betalactámicos, cefalosporinas, carbapenémicos y fluoroquinolonas; el perfil de resistencia se muestra en las Tablas (3-6).

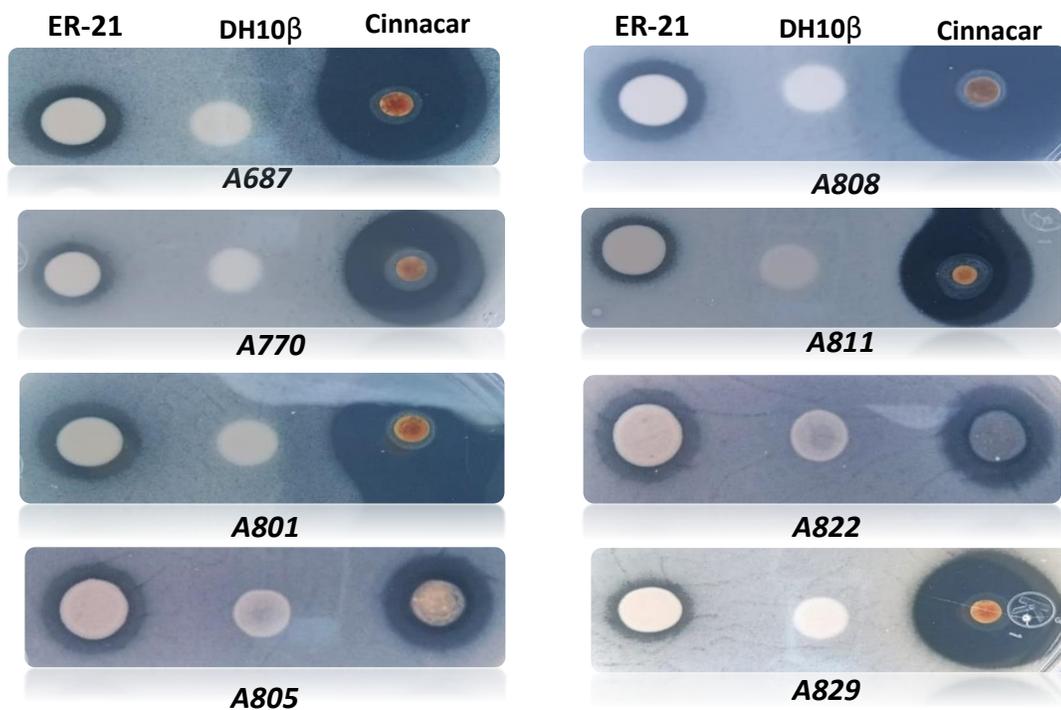


Figura 16. Halos de inhibición generados por la cepa ER-21 contra cepas patógenas multirresistentes de *A. baumannii*. Control negativo: cepa de *E. coli* DH10β; control positivo: CinnAcar.

La cepa ER-21 generó halos de inhibición contra todas las cepas resistentes a antibióticos de *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *S. aureus*. Como era esperado, en todos los casos la cepa usada como control negativo (*E. coli* DH10 β) no formó halo de inhibición y el compuesto Cinnacar usado como control positivo sí (Figuras 16-19). Estos resultados sugieren que los compuestos antibacterianos producidos por la cepa ER-21 tienen un mecanismo de acción diferente al de los antibióticos a los cuales las cepas probadas son resistentes.

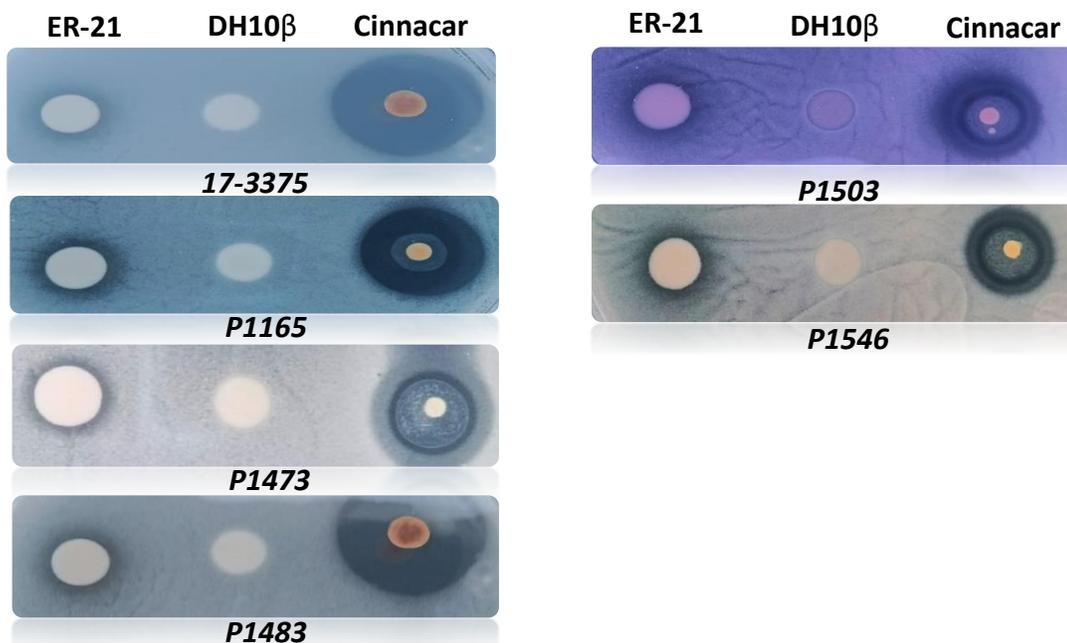
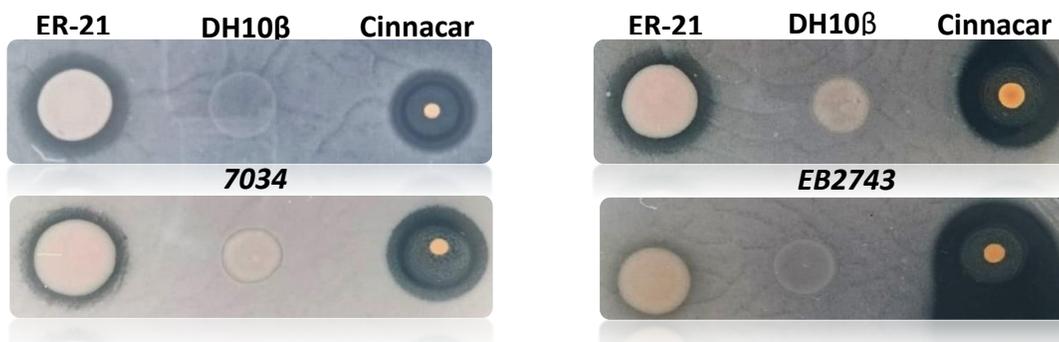


Figura 17. Halos de inhibición generados por la cepa ER-21 contra cepas patógenas multirresistentes de *P. aeruginosa*. Como control negativo (no formación de halo de inhibición) se usó la cepa de *E. coli* DH10 β , como control positivo se usó el compuesto Cinnacar.



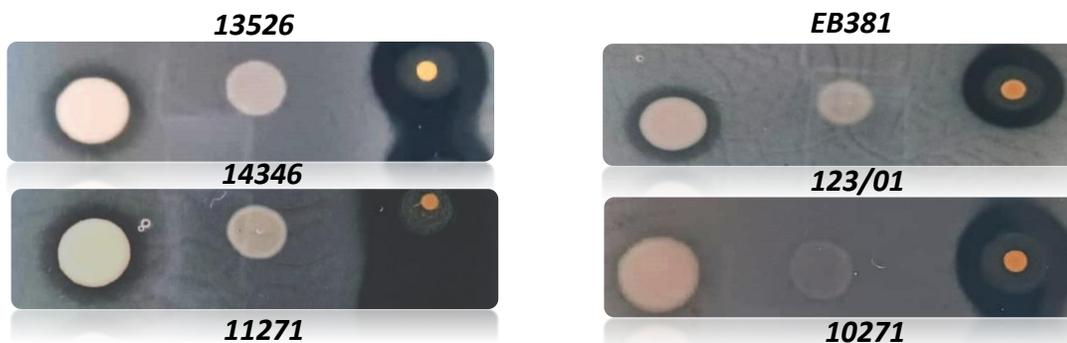


Figura 18. Halos de inhibición generados por la cepa ER-21 contra patógenas multirresistentes de *K. pneumoniae*. control negativo: *E. coli* DH10β, control positivo: Cinnacar

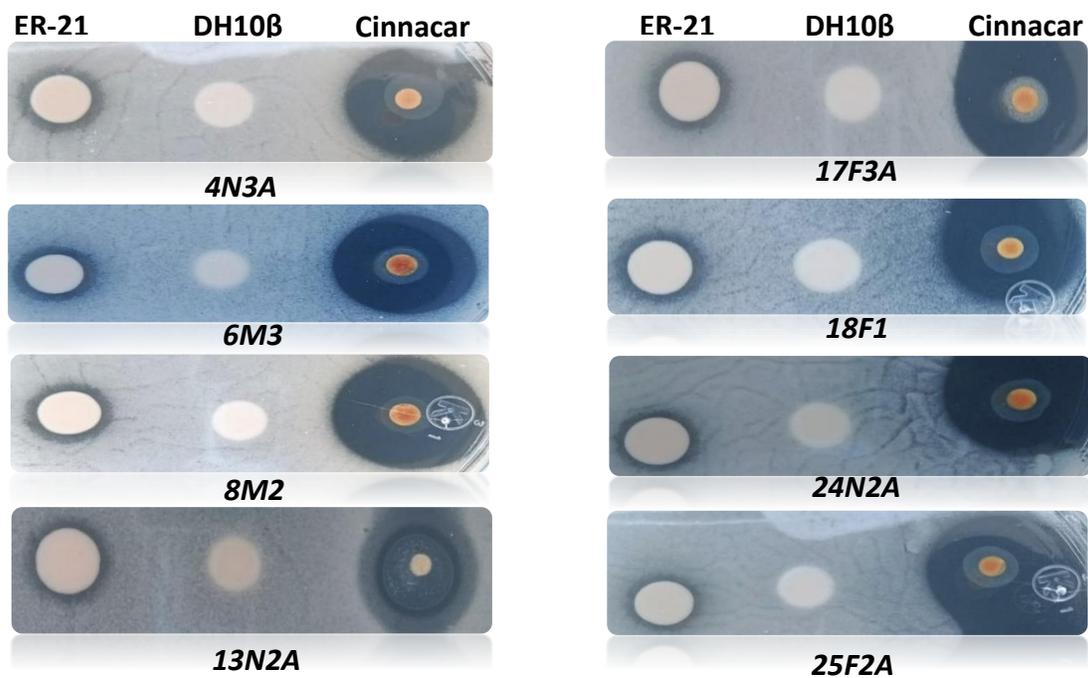


Figura 19. Halos de inhibición generados por la cepa ER-21 contra patógenas multirresistentes de *S. aureus*. control negativo: *E. coli* DH10β, control positivo: Cinnacar

9.6 El sobrenadante de cultivo directo con LB de la cepa ER-21 no muestra actividad antibacteriana

Para continuar con el análisis de la actividad antibacteriana de la cepa ER-21 evaluamos ahora el sobrenadante de cultivo de esta cepa crecida en medio LB, contra las cepas de referencia *A. baumannii* ATCC 17978, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* ATCC 700603 y *S. aureus* ATCC 29213.

Los sobrenadantes se usaron sin filtrar, quitando a las bacterias mediante centrifugación, o filtrados con diferentes membranas. El sobrenadante directo del cultivo de la cepa ER-21 no formó halos de inhibición de crecimiento en ninguna de las bacterias probadas. Ejemplos de estos resultados se muestran en la Figura 20. El hecho de que se forme halo de inhibición con la colonia de la cepa ER-21, pero no con el sobrenadante de cultivo, puede deberse a la dilución de los compuestos activos en el sobrenadante, o a que estos compuestos se produzcan en mayor cantidad en medio sólido.

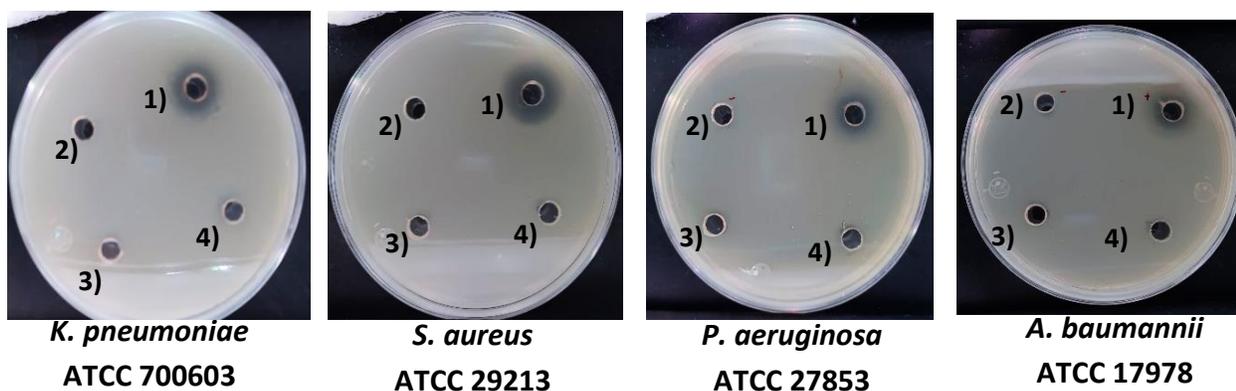


Figura 20. Actividad antibacteriana del sobrenadante de cultivo de la cepa ER-21 contra cepas patógenas de referencia. Se colocaron 100 μ l de sobrenadante. 1) Control positivo: *P. aeruginosa* PAO1, 2) control negativo: *E. coli* DH10 β , 3) muestra sin filtrar, 4) muestra filtrada con membrana MCE con poro de 0.45 μ m.

9.7 El sobrenadante de cultivo concentrado de la cepa ER-21 inhibe el crecimiento de bacterias patógenas

Para concentrar los compuestos con actividad antibacteriana, el sobrenadante de cultivo de la cepa ER-21 se liofilizó y se resuspendió en un volumen 50 veces menor al original. Debido a que en el proceso de liofilización también se concentran los componentes del medio de cultivo, se hizo una

dilución 1:4 del medio LB para evitar que la concentración de sales y péptidos afectará el crecimiento bacteriano. Para esto, primero se verificó que la cepa ER-21 mantuviera su actividad antibacteriana en los ensayos de competencia en colonia (Figura 21).

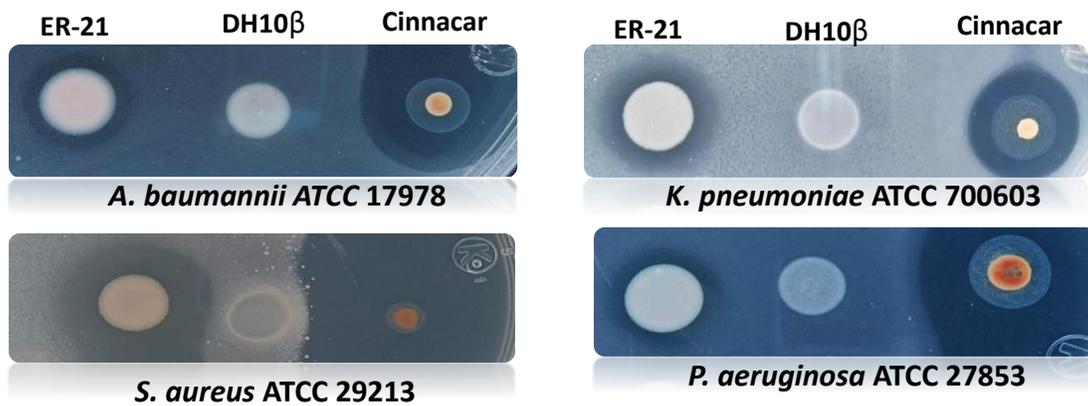
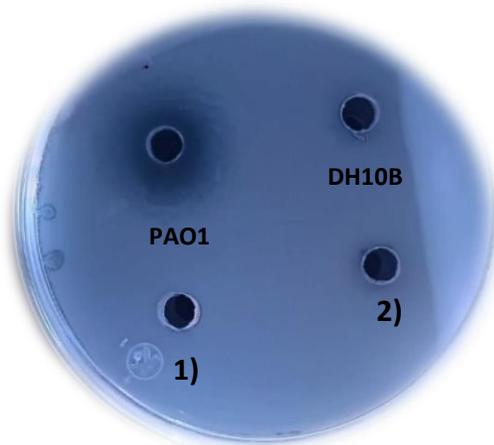


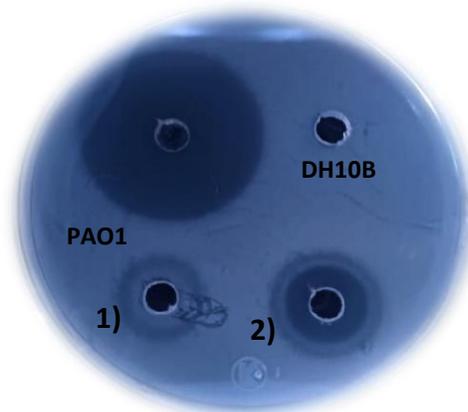
Figura 21. Halos de inhibición de crecimiento generados por la cepa ER-21 contra las cepas patógenas de referencia, en medio LB 1:4. Control negativo: *E. coli* DH10 β , control positivo: *P. aeruginosa* PA01.

El liofilizado proveniente de los 200 ml de sobrenadante de cultivo de la cepa ER-21 se resuspendió en 4 ml de agua mili Q estéril, quedando así 50 veces más concentrado. Para estos experimentos los controles que se utilizaron fueron sobrenades de cultivo de dos bacterias: *E. coli* DH10 β control negativo y *P. aeruginosa* PA01 control positivo con el objetivo de poder monitorear el proceso de liofilización. La actividad inhibitoria del sobrenadante concentrado se analizó contra las cepas de referencia *A. baumannii* ATCC 17978, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* ATCC 700603 y *S. aureus* ATCC 29213. Únicamente se observó la formación de un halo de inhibición contra la cepa de *S. aureus* ATCC 29213 (Figura 22).

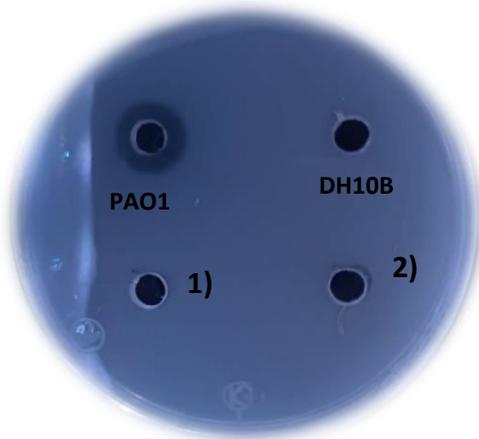
Estos resultados sugieren que se requiere de una diferente concentración del o los compuestos antibacterianos producidos por la cepa ER-21 para afectar a las diferentes cepas patógenas. Alternativamente, la cepa ER-21 podría estar produciendo más de un compuesto y que él o los compuestos que afectan a *A. baumannii* ATCC 17978, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *K. pneumoniae* ATCC 700603 se estén inactivando por la liofilización. El sobrenadante concentrado de la cepa ER-21 también formó halos de inhibición con aislados clínicos resistentes a antibióticos de *S. aureus* (Figura 23). Cuando todo el liofilizado se resuspendió en agua mili Q estéril la actividad comenzó a perderse con el tiempo. Debido a esto, en experimentos posteriores únicamente la cantidad que se utilizaría del liofilizado se fue resuspendiendo en agua mili Q estéril.



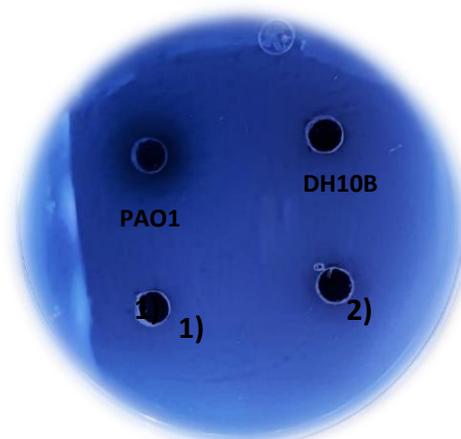
***A. baumannii* ATCC 17978**



***S. aureus* ATCC 29213**



***K. pneumoniae* ATCC 700603**



***P. aeruginosa* ATCC 27853**

Figura 22. Actividad antibacteriana del sobrenadante de cultivo de la cepa ER-21 concentrado mediante liofilización, contra bacterias patógenas de referencia. Se colocaron 100 μ l del sobrenadante concentrado en pozos que se hicieron en el agar. Control positivo: *P. aeruginosa* PAO1, control negativo: *E. coli* DH10 β . 1) Liofilizado de la cepa ER-21 resuspendido en su totalidad y usado después de un tiempo. 2) Liofilizado de la cepa ER-21 resuspendido en pares y usado al momento. En ambos casos, el factor de concentración fue el mismo.

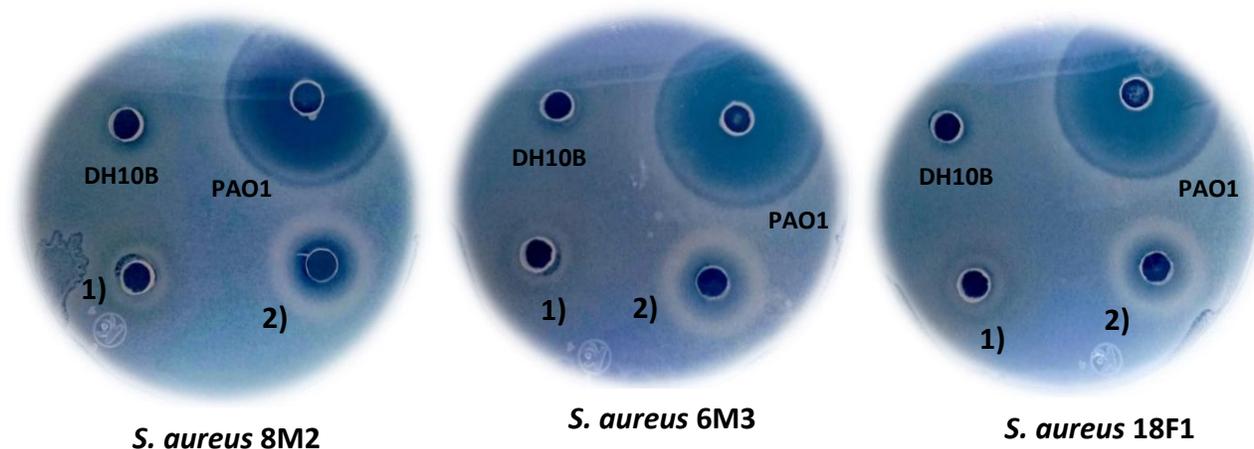


Figura 23. Actividad antibacteriana del sobrenadante concentrado de la cepa ER-21 contra aislados clínicos de *S. aureus*. Control positivo: *P. aeruginosa* PAO1, control negativo: *E. coli* DH10 β . Control positivo: *P. aeruginosa* PAO1, control negativo: *E. coli* DH10 β . 1) Liofilizado de la cepa ER-21 resuspendido en su totalidad y usado después de un tiempo. 2) Liofilizado de la cepa ER-21 resuspendido en pares y usado al momento. En ambos casos, el factor de concentración fue el mismo.

Para reducir la cantidad de componentes del medio de cultivo presentes en el sobrenadante, se creció a la cepa ER-21 en medio mínimo MM-N y se probó la actividad del sobrenadante liofilizado contra las cuatro cepas patógenas de interés. Los resultados obtenidos muestran que en estas condiciones de crecimiento el sobrenadante liofilizado de la cepa ER-21 tuvo actividad inhibitoria contra *A. baumannii* ATCC 17978, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* ATCC 700603 y *S. aureus* ATCC 29213 (Figura 24). Estos resultados indican que el crecimiento en medio MM-N es una buena opción para la purificación del o los compuestos con actividad antibacteriana producidos por la cepa ER-21.

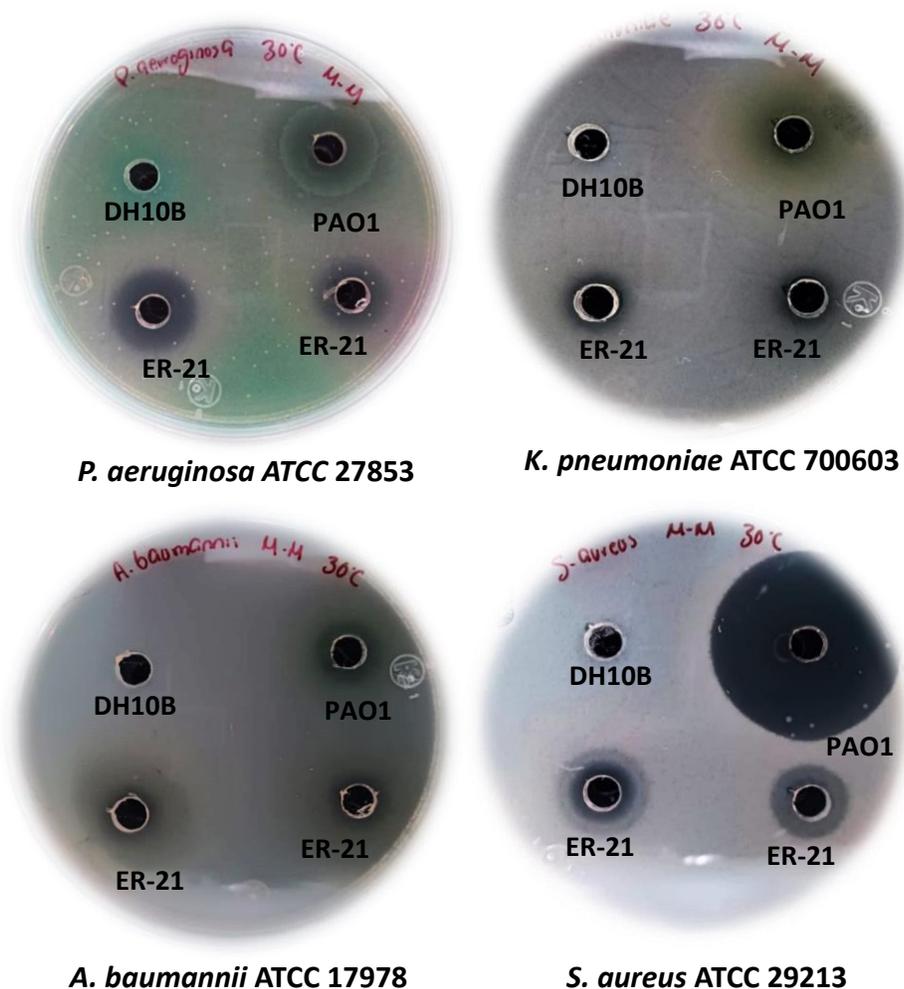


Figura 24. Actividad antibacteriana del sobrenadante de cultivo concentrado de la cepa ER-21 crecida medio mínimo MM-N contra bacterias patógenas de referencia. Se colocaron 100 μ l de sobrenadante, en pozos que se hicieron en el agar. Control positivo: *P. aeruginosa* PAO1, control negativo: *E. coli* DH10 β .

9.8 Extractos del sobrenadante de cultivo de la cepa ER-21 realizados con butanol inhiben el crecimiento de *S. aureus*.

Para comenzar a separar los compuestos con actividad antibacteriana producidos por la cepa ER-21 se realizaron extracciones secuenciales del sobrenadante de cultivo con varios solventes de diferente polaridad: hexano, acetato de etilo, butanol y cloroformo (del más polar al menos polar), como se describe en la metodología. Los extractos obtenidos con los solventes se resuspendieron en DMSO al 5% y su actividad se probó contra la cepa de *S. aureus* ATCC 29213. Ninguna de las fracciones extraídas de esta manera con los diferentes solventes tuvo actividad inhibitoria contra la cepa *S. aureus* ATCC 29213 (Figura 25).

En estos ensayos se usaron como controles positivo y negativo extractos con los mismos solventes del sobrenadante de cultivos de *P. aeruginosa* PAO-01 y *E. coli* DH10 β , respectivamente. Todos los extractos de la cepa *P. aeruginosa* PAO-01 formaron halos de inhibición, mientras que ninguno de los extractos de la cepa *E. coli* DH10 β formó halos de inhibición. Posteriormente, se repitió la extracción de los sobrenadantes de las cepas con los cuatro solventes (hexano, acetato de etilo, butanol y cloroformo), pero ahora de manera separada. Los extractos se probaron contra la cepa de referencia *S. aureus* ATCC 29213

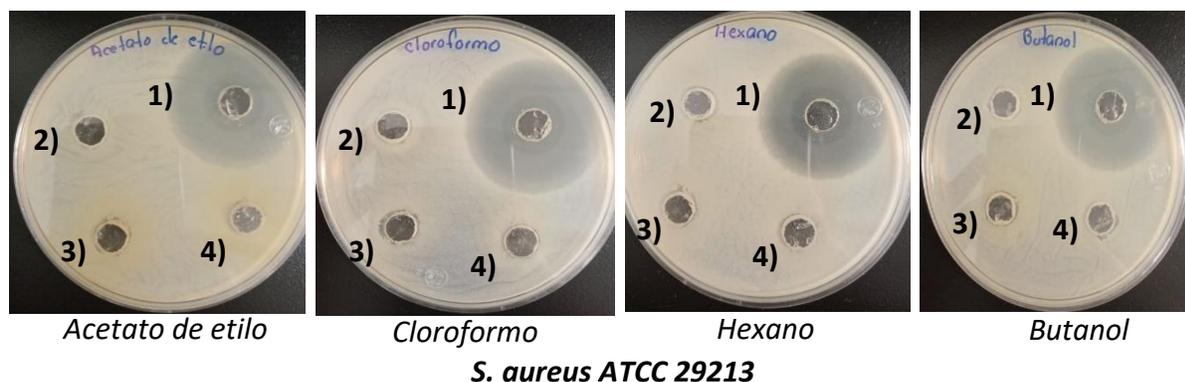


Figura 25. Actividad antibacteriana de los extractos del sobrenadante de cultivo de la cepa ER-21 contra *S. aureus* ATCC 29213. Se colocaron 100 μ l de los extractos con diferentes solventes en el agar LB con el césped de la bacteria probada. 1) Control positivo: *P. aeruginosa* PA-01, 2) control negativo: *E. coli* DH10 β , 3 y 4) cepa productora: ER-21

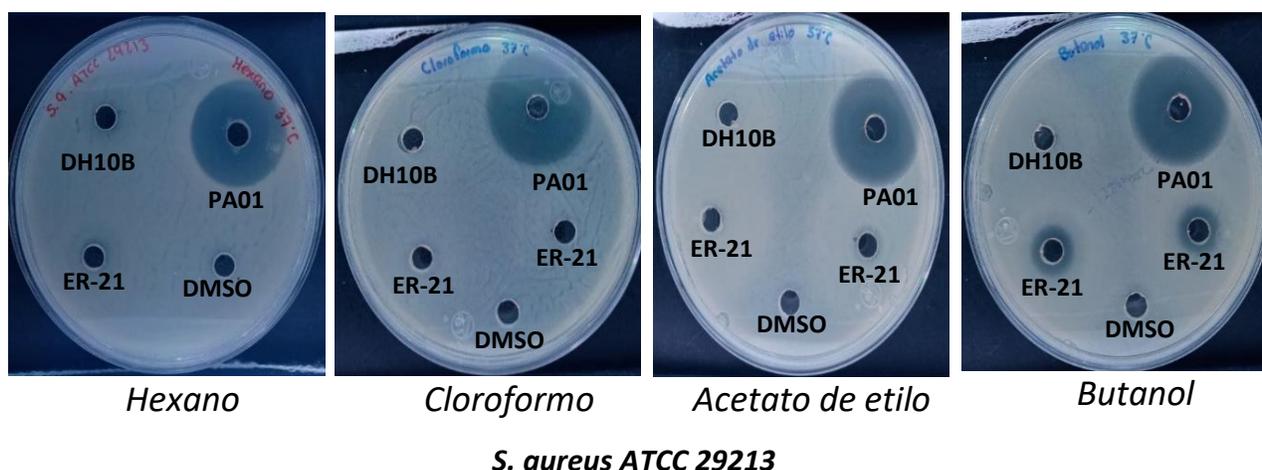


Figura 26. Actividad antibacteriana de los extractos del sobrenadante de cultivo de la cepa ER-21 contra *S. aureus* ATCC 29213. Se colocaron 100 μ l de los extractos con diferentes solventes en el agar Mueller-Hinton con el césped de la bacteria probada. Control positivo: *P. aeruginosa* PA-01, control negativo: *E. coli* DH10 β .

Los extractos se probaron contra la cepa de referencia *S. aureus* ATCC 29213. Los resultados mostraron que él o los compuestos con actividad antibacteriana producidos por la cepa ER-21 se pueden extraer solo con butanol (Figura 26). En contraste, la actividad antibacteriana producida por *P. aeruginosa* PAO-01 (usada como control positivo) se obtuvo con todos los solventes probados, mientras que los extractos de la cepa *E. coli* DH10 β no mostraron actividad antibacteriana (Figura 24). El hecho de encontrar que él o los compuestos con actividad antibacteriana producidos por la cepa ER-21 se pueden extraer con un solvente, butanol, representa un paso importante para poder separar e identificar dichos compuestos.

La búsqueda de nuevos compuestos con actividad antibacteriana aislados a partir de la microbiota de animales es un área de investigación importante debido al grave problema de salud pública que representa la RA. Los resultados de este trabajo mostraron que la microbiota aislada de la piel del ajolote *A. altamirani* es una fuente con potencial para la identificación de nuevos compuestos antibacterianos contra bacterias patógenas prioritarias. Se deben realizar más investigaciones para aislar los compuestos biológicamente activos con actividad antibacteriana.

10. DISCUSIÓN

En este estudio se analizó la actividad antibacteriana de 100 bacterias de un cepario obtenido de la piel de *A. altamirani*, comúnmente conocido como ajolote de montaña. *A. altamirani* es un anfibio endémico de México catalogado como especie amenazada según la NOM-059-SEMARNAT-2010 y como especie en peligro según de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN).

En diferentes trabajos sobre la microbiota de la piel de anfibios (*P. cinereus*, *A. zeteki*, *C. crassidigitus*) se ha encontrado que ciertas especies bacterianas (*J. lividum*, *L. gummosus* y *S. marcescens*) aisladas de estos animales tienen la capacidad de producir un amplio repertorio de moléculas antifúngicas, incluyendo violaceína, indol-3-carboxaldehído, 2,4-diactilfloroglucinol y prodigiosina (Brucker *et al.*, 2008^a; Brucker, *et al.*, 2008^b; Woodhams, *et al.*, 2017; Martin *et al.*, 2019). Sin embargo, hay muy pocos reportes sobre la actividad antibacteriana que puedan tener las bacterias de la piel de anfibios (Brunetti *et al.*, 2022) y particularmente no hay reportes sobre la actividad inhibitoria antibacteriana de la microbiota de *A. altamirani*.

Los resultados que obtuvimos en este trabajo mostraron que, de las 100 cepas analizadas, 42 tuvieron actividad inhibitoria, dos contra *A. baumannii* ATCC 17978, 16 contra *P. aeruginosa* ATCC 27853, 33 contra *S. aureus* ATCC 29213 y una contra *K. pneumoniae* ATCC 700603. Los géneros más abundantes con actividad antibacteriana fueron: *Curtobacterium spp* que inhibió el crecimiento de *S. aureus*; *Brevundimonas spp*, *Methylobacterium spp* y *Arthrobacter spp* que tuvieron actividad inhibitoria contra *P. aeruginosa* y *S. aureus*. La actividad antibacteriana de estos géneros ya ha sido reportada previamente en diferentes trabajos de investigación (Wietz *et al.*, 2012; Balachandran *et al.*,2012; Undabarrena *et al.*,2016; Sadiq *et al.*,2018).

Curtobacterium spp, son bacterias Gram-positivas en forma de bacilos irregulares, aerobios facultativos. Se han aislado muchas cepas como endófitos en caña de azúcar, maíz, sorgo, tomates (Evseev *et al.*, 2022). Algunas especies de *Curtobacterium spp* son consideradas como fitopatógenas ya que causan el marchitamiento y la pudrición de varias leguminosas (*Fabaceae*) y plantas ornamentales (Huang *et al.*,2009; Evseev *et al.*, 2022). También se han reportado efectos antibacterianos de cepas de *Curtobacterium* aisladas del fondo marino, contra bacterias Gram-negativas (*P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. entérica*) y Gram positivas (*S. aureus* y *L. monocytogenes*) (Undabarrena *et al.*,2016).

Las especies de *Brevundimonas spp*, son bacilos aerobios Gram-negativos móviles no fermentadores, se pueden encontrar en suelos, sedimentos submarinos, hábitats acuáticos y en algunos casos se han encontrado como patógenos oportunistas en infecciones nosocomiales (Ryan *et al.*, 2018). Algunas especies de *Brevundimonas* se han utilizado como biorremediador de suelos contaminación con petróleo, incluidos hidrocarburos aromáticos policíclicos, para mitigar los efectos tóxicos de los metales pesados en el crecimiento de plantas (arroz) (Wang *et al.*,2016; Singh *et al.* ,2016); además se ha visto que la cepa *Brevundimonas sp.* A2 (JX996070) aislada de una muestra de suelo, tiene actividad antibacteriana contra *Bacillus sp.* (Sadiq *et al.*,2018).

El género *Methylobacterium spp* son bacterias Gram-negativas en forma de bacilos, son aerobios estrictos denominadas como “metilotrofas facultativas” ya que son capaces de crecer utilizando compuestos que contienen un solo carbono. Tienen gran plasticidad fenotípica por lo que se pueden encontrar en el suelo, agua, hojas, nódulos de plantas y el aire (Ochsner *et al.*,2015). Se ha reportado que *Methylobacterium (ERI-135)* aislada del suelo inhibe el crecimiento de diferentes bacterias como: *B. subtilis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *S. aureus* (Balachandran *et al.*,2012); además diversos estudios han mostrado que algunas especies de *Methylobacterium spp* están relacionadas con

la producción de fitohormonas, factores de crecimiento de plantas y con inductores de la actividad fotosintética (Dourado *et al.*, 2015; Lai *et al.*, 2020; Photolo *et al.*, 2020).

Las bacterias de *Arthrobacter spp* son Gram-positivas, aerobias obligadas, estas especies se pueden encontrar en el suelo, lodo o aguas residuales, ambientes extremos, incluidos el hielo y el suelo del Ártico y la Antártida y ambientes radiactivos (Zhang *et al.*, 2016; Romaniuk *et al.*, 2018). Se ha reportado que cepas de *Arthrobacter spp* aisladas de diferentes fuentes del Océano Ártico Central, inhibieron el crecimiento de *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. entérica* entre otras (Wietz *et al.*, 2012); también se ha informado que las especies de *Arthrobacter* pueden degradar contaminantes ambientales como la nitroglicerina, derivados del benceno, compuestos aromáticos policíclicos, insecticidas y herbicidas (Yao *et al.*, 2015).

Por otra parte, la cepa ER-21 fue seleccionada para continuar con la investigación ya que fue la que presentó actividad antibacteriana de amplio espectro contra *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *S. aureus*. También se probó el efecto inhibitorio contra ocho aislados clínicos con diferentes perfiles de resistencia a antibióticos (aminoglucósidos, betaláctamicos, cefalosporinas, carbapenémicos y fluoroquinolonas) de cada una de las cepas patógenas en estudio, los resultados mostraron que la cepa ER-21 inhibe el crecimiento de los aislados clínicos resistentes a antibióticos. Este resultado es relevante ya que una selección importante para la identificación de nuevos antibacterianos es que los compuestos en estudio tengan efecto contra cepas bacterianas multirresistentes.

La cepa ER-21 se identificó como perteneciente al género *Pseudomonas* mediante secuenciación del gen 16S ribosomal. Las especies de *Pseudomonas spp* tienen una capacidad metabólica muy versátil debido a que tienen la capacidad de utilizar diferentes fuentes de carbono como: carbohidratos, ácidos orgánicos, alcoholes, alcanos y la mayoría de los aminoácidos. Además, tienen un gran potencial de adaptación a condiciones ambientales fluctuantes, por lo que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, en el agua, el suelo, las plantas y materia orgánica en descomposición (Daniels *et al.*, 2010; Silby *et al.*, 2011). Se ha reportado que las especies de *Pseudomonas spp* son buenas productoras de metabolitos secundarios bioactivos, como: sintetasa peptídica no ribosómica, bacteriocinas, amidas de N-acetilglutaminilglutamina y β -lactonas, antibióticos y antifúngicos (Vincent *et al.* 1991; Wasi *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2020; Saati *et al.*, 2022).

Por ejemplo, *P. aeruginosa* produce compuestos como: pioverdina, piocianina, pioquelina, pseudopalina, que tienen actividad antibacteriana (Justo *et al.*, 2014; Ghsein *et al.*, 2022); *P. fluorescences* produce compuestos como: ácido fenazina-l-carboxílico, viscosinamida, que tienen

actividad antifúngica contra *R. solani*, *G. graminis* (Michelsen *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2015; Álvarez *et al.*, 2020). La identificación mediante el gen ribosomal 16S es una buena herramienta para conocer la diversidad de poblaciones procariotas. Sin embargo, existen limitaciones para la diferenciación a nivel de especie, para lo cual es necesario la secuenciación del genoma completo (Girard *et al.*, 2021).

En el caso de *P. aeruginosa* la actividad antibacteriana se debe en gran parte a la producción de piocianina, un alcaloide fenazínico de coloración verde-azul que tiene la capacidad de oxidar y reducir moléculas, de esta forma puede afectar la cadena de transporte de electrones, el transporte vesicular y el crecimiento celular (Justo *et al.*, 2014). Nuestros resultados indican que la cepa ER-21 no produce piocianina. Por otro lado, en las condiciones que usamos diferentes cepas de *P. fluorescens* no tuvieron actividad contra las cepas patógenas en estudio. Estos resultados sugieren que los compuestos antibacterianos producidos por las cepas ER-21 son diferentes a los reportados para *P. aeruginosa* y *P. fluorescens*.

Para continuar con el análisis de la actividad antibacteriana de la cepa ER-21 evaluamos la actividad antibacteriana del sobrenadante de cultivo se concentrado por liofilización, como resultado se observó actividad antibacteriana únicamente contra cepas de *S. aureus* de referencia y aislados clínicos resistentes a antibióticos. Es posible que en el sobrenadante los compuestos se diluyan al grado que su actividad se reduce drásticamente y que así tengan efecto solo contra las bacterias más sensibles. Alternativamente, es probable que la cepa ER-21 produzca más de un compuesto con actividad y que alguno de ellos solamente se sintetice en medio sólido.

Con el fin de reducir la cantidad y complejidad de los componentes del sobrenadante del cultivo de la cepa ER-21 crecida en medio LB, se probó la actividad del sobrenadante de cultivo de la cepa ER-21 crecida en medio mínimo MM-N. En estas condiciones de crecimiento, el sobrenadante concentrado por liofilización presentó actividad antibacteriana contra *A. baumannii* ATCC 17978, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* ATCC 700603 y *S. aureus* ATCC 29213. Estos resultados indican que el crecimiento en medio MM-N es una buena opción para la purificación del o los compuestos con actividad antibacteriana producidos por la cepa ER-21.

Por otro lado, para comenzar a separar a los compuestos que presentan actividad antibacteriana, producidos por la cepa ER-21, hicimos extracciones del sobrenadante de cultivo de esta cepa con diferentes solventes: hexano, cloroformo, acetato de etilo y butanol (de mayor a menor polaridad). Los resultados que obtuvimos mostraron que el butanol extrae los compuestos con actividad del sobrenadante de cultivo de la cepa ER-21, dicha actividad antibacteriana fue evidente contra la cepa de

referencia de *S. aureus* ATCC 29213. El butano es un alcohol primario, soluble en agua y es relativamente polar comparado con el hexano. El hecho de encontrar que él o los compuestos con actividad antibacteriana producidos por la cepa ER-21 se pueden extraer con un solvente, butanol, representa un paso importante para poder separar e identificar dichos compuestos usando diferentes técnicas de HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), UV-vis (espectroscopia ultravioleta visible) y RMN (resonancia magnética nuclear).

Los hallazgos reportados en este estudio indican que la cepa ER-21 es una fuente con potencial para la identificación de nuevos compuestos con actividad antibacteriana. Es importante realizar más investigaciones para aislar los compuestos biológicamente activos con la posibilidad de identificar nuevos antibióticos que ayuden a la problemática de salud mundial ocasionada por la resistencia a antibióticos.

11. CONCLUSIONES

- De las 100 cepas analizadas de *A. altamirani*, dos cepas tuvieron actividad contra *A. baumannii* ATCC 17978, 16 contra *P. aeruginosa* ATCC 27853, 33 contra *S. aureus* ATCC 29213 y una contra *K. pneumoniae* ATCC 700603.
- De las 100 cepas analizadas se seleccionó la cepa ER-21, ya que esta mostró actividad antibacteriana contra las cuatro cepas de referencia de interés: *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *S. aureus*.
- La cepa ER-21 tuvo actividad inhibitoria contra todos los aislados clínicos resistentes a antibióticos probados de *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *S. aureus*, en ensayos en colonia y el sobrenadante de cultivo concentrado.
- La actividad antibacteriana producida por la cepa ER-21 se puede extraer con el solvente butanol, por lo que probablemente él o los compuestos con actividad antibacteriana producidos por esta cepa son relativamente polares.

12. PERSPECTIVAS

- Caracterizar los compuestos con actividad antibacteriana de la cepa ER-21 mediante tratamiento con proteasas, temperatura, pH, etc., para comenzar a conocer sus propiedades.
- Evaluar la actividad antibacteriana del sobrenadante de cultivo de la cepa ER-21 utilizando otros solventes como etanol y metanol.
- Analizar e identificar el o los compuestos con actividad antibacteriana producidos por la cepa ER-21 a través de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN).
- Analizar el genoma de la cepa ER-21 para identificar posibles genes con el potencial de producir compuestos antibacterianos.

13. APÉNDICE

Las cepas de *A. altamirani* fueron identificadas mediante secuenciación del gen ribosomal 16s por el grupo de la Dra. Eria Rebollar. Los resultados de los ensayos de competencia mostraron que dos cepas inhibieron el crecimiento de *A. baumannii* ATCC 17978, 16 contra *P. aeruginosa* ATCC27853, 33 contra *S. aureus* ATCC 29213 y una contra *K. pneumoniae* ATCC 700603. Los géneros más abundantes con actividad antibacteriana fueron: *Curtobacterium spp*, *Brevundimonas spp*, *Methylobacterium spp* y *Arthrobacter spp*.

Actividad inhibitoria de <i>A. altamirani</i>			
CEPAS PATÓGENAS DE REFERENCIA	CEPAS	CÓDIGO	TAXONOMÍA
<i>A. baumannii</i> ATCC 17978	ER-21	M6A8-2a	<i>Pseudomonas spp.</i>
	ER-99	M2A6_1b	<i>Clavibacter spp.</i>
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	ER-2	M4A1-1d	<i>Klebsiella spp.</i>
	ER-14	M4A6-1a	<i>Hafnia spp.</i>
	ER-19	M6A6-1a	<i>Kocuria spp.</i>
	ER-21	M6A8-2a	<i>Pseudomonas spp.</i>
	ER-22	M6A8-2b	NA
	ER-24	M6A6-1d	<i>Rhodococcus spp.</i>
	ER-30	M6A3-1c	<i>Brevundimonas spp.</i>
	ER-34	M6A3-2c	NA
	ER-39	M6A4-1c	<i>Methylobacterium spp</i>
	ER-68	M1A2_1a	No identificado
	ER-69	M1A2_2a	<i>Clavibacter spp</i>
	ER-70	M1A3_2a	<i>Bacillus spp.</i>
	ER-71	M1A4_1a	<i>Arthrobacter spp.</i>
	ER-72	M1A4_1b	<i>Arthrobacter spp.</i>
	ER-96	M2A3_1b	<i>Pseudoclavibacter spp.</i>
	ER-97	M2A4_2d	NO IDENTIFICADO
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	ER-21	M6A8-2a	<i>Pseudomonas spp.</i>
	ER-2	M4A1-1d	<i>Klebsiella spp.</i>
	ER-18	M6A5-2b	<i>Williamsia spp.</i>
	ER-19	M6A6-1a	<i>Kocuria spp.</i>
	ER-31	M6A3-1e	<i>Curtobacterium spp.</i>
	ER-21	M6A8-2a	<i>Pseudomonas spp.</i>
	ER-39	M6A4-1c	<i>Methylobacterium spp.</i>
	ER-45	M5A1-2a	NA
	ER-50	M5A2-2f	<i>Chromobacterium spp.</i>
	ER-54	M5A4-1d	<i>Arthrobacter spp.</i>

S. aureus ATCC 292113	ER-58	M5A5-2d	<i>Brevundimonas spp.</i>
	ER-61	M5A7-1b	<i>Chryseobacterium spp.</i>
	ER-62	M6A1-1b	<i>Curtobacterium spp.</i>
	ER-63	M6A1-1c	<i>Leifsonia spp.</i>
	ER-64	M6A1-2a	<i>Curtobacterium spp.</i>
	ER-65	M6A1-2b	<i>Burkholderia spp.</i>
	ER-66	M6A1-2c	<i>Methylobacterium spp.</i>
	ER-73	M1A4_2a	<i>Bacillus spp.</i>
	ER-74	M1A4_2b	<i>Arthrobacter spp.</i>
	ER-76	M1A4_2e	<i>Brevundimonas spp.</i>
	ER-77	M1A5_2a	<i>Brevundimonas spp.</i>
	ER-78	M1A5_2b	<i>Curtobacterium spp.</i>
	ER-79	M1A6_2a	<i>Arthrobacter spp.</i>
	ER-80	M1A6_2b	<i>Phycococcus spp.</i>
	ER-83	M1A6_2f	<i>Sphingomonas spp.</i>
	ER-84	M1A6_2g	<i>Rhodococcus spp.</i>
	ER-86	M1A7_1a	<i>Sphingomonas spp.</i>
	ER-89	M1A8_1c	<i>Frigoribacterium spp.</i>
	ER-90	M1A8_1i	<i>Methylobacterium spp.</i>
	ER-91	M1A8_2a	<i>Chryseobacterium spp.</i>
	ER-96	M2A3_1b	<i>Pseudoclavibacter spp.</i>
ER-97	M2A4_2d	NO IDENTIFICADO	
ER-98	M2A5_2c	<i>Frigoribacterium spp.</i>	
ER-99	M2A6_1b	<i>Clavibacter spp.</i>	

14. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Álvarez-García, J. A., Santoyo, G., & del Carmen Rocha-Granados, M. (2020). *Pseudomonas fluorescens*: Mecanismos y aplicaciones en la agricultura sustentable. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 16(1), 01-10. DOI: [10.33154/rlrn.2020.01.01](https://doi.org/10.33154/rlrn.2020.01.01)
- Ali, S. M., Siddiqui, R., & Khan, N. A. (2018). Antimicrobial discovery from natural and unusual sources. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 70(10), 1287-1300. DOI: [10.1111/jphp.12976](https://doi.org/10.1111/jphp.12976)
- Ahmad, I., Malak, H. A., & Abulreesh, H. H. (2021). Environmental antimicrobial resistance and its drivers: A potential threat to public health. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 27, 101-111. DOI: [10.1016/j.jgar.2021.08.001](https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.08.001)
- Alshaikh, F. S., Godman, B., Sindi, O. N., Seaton, R. A., & Kurdi, A. (2022). Prevalence of bacterial coinfection and patterns of antibiotics prescribing in patients with COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *PloS one*, 17(8), e0272375. DOI: [10.1371/journal.pone.0272375](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272375)
- Aslam, B., Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M. H., & Baloch, Z (2018). Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and drug resistance*, 11, 1645. DOI: [10.2147/IDR.S173867](https://doi.org/10.2147/IDR.S173867)
- Akbar, N., Siddiqui, R., Iqbal, M., Sagathevan, K., & Khan, N. A. (2018). Gut bacteria of cockroaches are a potential source of antibacterial compound (s). *Letters in applied microbiology*, 66(5), 416-426. DOI: [10.1111/lam.12867](https://doi.org/10.1111/lam.12867)
- Balachandran, C., Duraipandiyar, V., & Ignacimuthu, S. (2012). Cytotoxic (A549) and antimicrobial effects of *Methylobacterium* sp. isolate (ERI-135) from Nilgiris forest soil, India. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(9), 712-716.
- Brunetti, A. E., Bunk, B., Lyra, M. L., Fuzo, C. A., Marani, M. M., Spröer, C., & Overmann, J. (2022). Molecular basis of a bacterial-amphibian symbiosis revealed by comparative genomics, modeling, and functional testing. *The ISME Journal*, 16(3), 788-800. DOI: [10.1038/s41396-021-01121-7](https://doi.org/10.1038/s41396-021-01121-7)
- Brucker, R. M., Harris, R. N., Schwantes, C. R., Gallaher, T. N., Flaherty, D. C., Lam, B. A., & Minbiole, K. P. (2008a). Amphibian chemical defense: antifungal metabolites of the microsymbiont *Janthinobacterium lividum* on the salamander *Plethodon cinereus*. *Journal of chemical ecology*, 34(11), 1422-1429. DOI: [10.1007/s10886-008-9555-7](https://doi.org/10.1007/s10886-008-9555-7)
- Brucker, R. M., Baylor, C. M., Walters, R. L., Lauer, A., Harris, R. N., & Minbiole, K. P. (2008b). The identification of 2, 4-diacetylphloroglucinol as an antifungal metabolite produced by cutaneous bacteria of the salamander *Plethodon cinereus*. *Journal of chemical ecology*, 34(1), 39-43. DOI: [10.1007/s10886-007-9352-8](https://doi.org/10.1007/s10886-007-9352-8)
- Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). Antimicrobial mechanisms of action. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 27(1), 44-52. DOI: [10.1016/j.eimc.2008.11.001](https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001)

- Cassini, A., Högberg, L. D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G. S. & Hopkins, S. (2019). Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *The Lancet infectious diseases*, 19(1), 56-66. DOI: [10.1016/S1473-3099\(18\)30605-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30605-4)
- Cita, Y. P., Suhermanto, A., Radjasa, O. K., & Sudharmono, P. (2017). Antibacterial activity of marine bacteria isolated from sponge *Xestospongia testudinaria* from Sorong, Papua. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(5), 450-454.
- Choi, S. Y., Yoon, K. H., Lee, J. I., & Mitchell, R. J. (2015). Violacein: properties and production of a versatile bacterial pigment. *BioMed research international*, 2015. DOI: [10.1155/2015/465056](https://doi.org/10.1155/2015/465056)
- Daniels, C., Godoy, P., Duque, E., Molina-Henares, M. A., de la Torre, J., Del Arco, J. M., ... & Ramos, J. L. (2010). Global Regulation of Food Supply by *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *Journal of bacteriology*, 192(8), 2169-2181.
- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and molecular biology reviews*, 74(3), 417-433. DOI: [10.1128/MMBR.00016-10](https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10)
- De León Rosales, S. P. (2018). Plan Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana. *Universidad Nacional Autónoma de México: Mexico City, Mexico*, 53.
- Demain, A. L., Gómez-Ortiz, B., Ruiz-Villafán, B., Rodríguez-Sanoja, R., & Sánchez, S. (2019). Recent findings of molecules with anti-infective activity: screening of non-conventional sources. *Current Opinion in Pharmacology*, 48, 40-47. DOI: [10.1016/j.coph.2019.04.003](https://doi.org/10.1016/j.coph.2019.04.003)
- Dourado, M. N., Aparecida Camargo Neves, A., Santos, D. S., & Araújo, W. L. (2015). Biotechnological and agronomic potential of endophytic pink-pigmented methylotrophic *Methylobacterium* spp. *BioMed Research International*, 2015. DOI: [10.1155/2015/909016](https://doi.org/10.1155/2015/909016)
- Evseev, P., Lukianova, A., Tarakanov, R., Tokmakova, A., Shneider, M., Ignatov, A., & Miroshnikov, K. (2022). *Curtobacterium* spp. and *Curtobacterium flaccumfaciens*: Phylogeny, genomics-based taxonomy, pathogenicity, and diagnostics. *Current Issues in Molecular Biology*, 44(2), 889-927. DOI: [10.3390/cimb44020060](https://doi.org/10.3390/cimb44020060)
- Garza-González, E., Morfín-Otero, R., Mendoza-Olazarán, S., Bocanegra-Ibarias, P., Flores-Treviño, S., Rodríguez-Noriega, E., & Camacho-Ortiz, A. (2019). A snapshot of antimicrobial resistance in Mexico. Results from 47 centers from 20 states during a six-month period. *PLoS One*, 14(3), e0209865. DOI: [10.1371/journal.pone.0209865](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209865)
- Girard, L., Lood, C., Höfte, M., Vandamme, P., Rokni-Zadeh, H., van Noort, V., & De Mot, R. (2021). The ever-expanding *Pseudomonas* genus: description of 43 new species and partition of the *Pseudomonas putida* group. *Microorganisms*, 9(8), 1766. DOI: [10.3390/microorganisms9081766](https://doi.org/10.3390/microorganisms9081766)

- Ghssein, G., & Ezzeddine, Z. (2022). A review of *Pseudomonas aeruginosa* metallophores: Pyoverdine, pyochelin and pseudopaline. *Biology*, 11(12), 1711. DOI: [10.3390/biology11121711](https://doi.org/10.3390/biology11121711)
- Harris, R. N., Lauer, A., Simon, M. A., Banning, J. L., & Alford, R. A. (2009). Addition of antifungal skin bacteria to salamanders ameliorates the effects of chytridiomycosis. *Diseases of aquatic organisms*, 83(1), 11-16. DOI: [10.3354/dao02004](https://doi.org/10.3354/dao02004)
- Huemer, M., Mairpady Shambat, S., Brugger, S. D., & Zinkernagel, A. S. (2020). Antibiotic resistance and persistence—Implications for human health and treatment perspectives. *EMBO reports*, 21(12), e51034. DOI: [10.15252/embr.202051034](https://doi.org/10.15252/embr.202051034)
- Huang, H. C., Erickson, R. S., Balasubramanian, P. M., Hsieh, T. F., & Conner, R. L. (2009). Resurgence of bacterial wilt of common bean in North America. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 31(3), 290-300
- Ibrahim, S., Al-Saryi, N., Al-Kadmy, I., & Aziz, S. N. (2021). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* as an emerging concern in hospitals. *Molecular biology reports*, 48(10), 6987-6998. DOI: [10.1007/s11033-021-06690-6](https://doi.org/10.1007/s11033-021-06690-6)
- Jiménez, R. R., Alvarado, G., Estrella, J., & Sommer, S. (2019). Moving beyond the host: unraveling the skin microbiome of endangered Costa Rican amphibians. *Frontiers in microbiology*, 10, 2060. DOI: [10.3389/fmicb.2019.02060](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02060)
- Justo, S., Churasacari, T., Elías, C., & Guerra, A. (2014). Efecto antibiótico de piocianina de *Pseudomonas aureginosa* sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. *Revista de Ciencias*, 10.
- Karlovsky, P. (2008). Secondary metabolites in soil ecology. In *Secondary metabolites in soil ecology* (pp. 1-19). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Klevens, R. M., Edwards, J. R., Richards Jr, C. L., Horan, T. C., Gaynes, R. P., Pollock, D. A., & Cardo, D. M. (2007). Estimating health care-associated infections and deaths in US hospitals, 2002. *Public health reports*, 122(2), 160-166. DOI: [10.1177/003335490712200205](https://doi.org/10.1177/003335490712200205)
- Kueneman, J. G., Parfrey, L. W., Woodhams, D. C., Archer, H. M., Knight, R., & McKenzie, V. J. (2014). The amphibian skin-associated microbiome across species, space and life history stages. *Molecular ecology*, 23(6), 1238-1250. DOI: [10.1111/mec.12510](https://doi.org/10.1111/mec.12510)
- Langford, B. J., So, M., Raybardhan, S., Leung, V., Soucy, J. P. R., Westwood, D. & MacFadden, D. R. (2021). Antibiotic prescribing in patients with COVID-19: rapid review and meta-analysis. *Clinical microbiology and infection*, 27(4), 520-531. DOI: [10.1016/j.cmi.2020.12.018](https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.12.018)
- Lai, K., Nguyen, N. T., Miwa, H., Yasuda, M., Nguyen, H. H., & Okazaki, S. (2020). Diversity of *Methylobacterium* spp. in the rice of the Vietnamese Mekong Delta. *Microbes and environments*, 35(1), ME19111.
- Lemos-Espinal, J. A., Smith, G. R., & Woolrich-Piña, G. A. (2015). Diet of larval *Ambystoma altamirani* from Llano de los Axolotes, Mexico. *Current Herpetology*, 34(1), 75-79.

- López-Pueyo, M. J., Barcenilla-Gaite, F., Amaya-Villar, R., & Garnacho-Montero, J. (2011). Antibiotic multiresistance in critical care units. *Medicina Intensiva (English Edition)*, 35(1), 41-53. DOI: [10.1016/j.medin.2010.07.011](https://doi.org/10.1016/j.medin.2010.07.011)
- Martínez-Ugalde, E., Ávila-Akerberg, V., González Martínez, T. M., Vázquez Trejo, M., Zavala Hernández, D., Anaya-Morales, S. L., & Rebollar, E. A. (2022). The skin microbiota of the axolotl *Ambystoma altamirani* is highly influenced by metamorphosis and seasonality but not by pathogen infection. *Animal Microbiome*, 4(1), 1-17. DOI: [10.1186/s42523-022-00215-7](https://doi.org/10.1186/s42523-022-00215-7)
- Martin, R. M., & Bachman, M. A. (2018). Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, DOI: [10.3389/fcimb.2018.00004](https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00004)
- Martin H, C., Ibáñez, R., Nothias, L. F., Boya P, C. A., Reinert, L. K., Rollins-Smith, L. A., ... & Gutiérrez, M. (2019). Viscosin-like lipopeptides from frog skin bacteria inhibit *Aspergillus fumigatus* and *Batrachochytrium dendrobatidis* detected by imaging mass spectrometry and molecular networking. *Scientific reports*, 9(1), 3019. DOI: [10.1038/s41598-019-39583-7](https://doi.org/10.1038/s41598-019-39583-7)
- McMillan, K. A., & Coombs, M. R. P. (2020). Examining the natural role of amphibian antimicrobial peptide magainin. *Molecules*, 25(22), 5436. DOI: [10.3390/molecules25225436](https://doi.org/10.3390/molecules25225436)
- Mendoza-Almeralla, C., Burrowes, P., & Parra-Olea, G. (2015). Chytridiomycosis in amphibians from Mexico: A revision. *Revista mexicana de biodiversidad*, 86(1), 238-248.
- Morales (2018) Tesis de licenciatura “Análisis de la diversidad microbiana en la piel del ajolote *Ambystoma altamirani* (Dugés, 1895) en el municipio de Isidro Fabela, Estado de México”
- Mohr, K. I. (2016). History of antibiotics research. *How to Overcome the Antibiotic Crisis*, 237-272. DOI: [10.1007/82_2016_499](https://doi.org/10.1007/82_2016_499)
- Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G. R., Gray, A., & Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629-655. DOI: [10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Nava-González, B., Suazo-Ortuño, I., López, P. B., Maldonado-López, Y., Lopez-Toledo, L., Raggi, L., & Gómez-Gil, B. (2021). Inhibition of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection by skin bacterial communities in wild amphibian populations. *Microbial ecology*, 82(3), 666-676. DOI: [10.1007/s00248-021-01706-x](https://doi.org/10.1007/s00248-021-01706-x)
- O’Neill (2014). Antimicrobial resistance: *Tackling a crisis for the health and wealth of nations*
- Ochsner, A. M., Sonntag, F., Buchhaupt, M., Schrader, J., & Vorholt, J. A. (2015). Methylobacterium extorquens: methylotrophy and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 517-534.
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology advances*, 37(1), 177- 192. DOI: [10.1016/j.biotechadv.2018.11.013](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013)

- Parra-Olea, G., Flores-Villela, O., & Mendoza-Almeralla, C. (2014). Biodiversidad de anfibios en México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 85, 460-466.
- Pérez Álvarez, S., Coto Arbelo, O., Echemendía Pérez, M., & Ávila Quezada, G. (2015). *Pseudomonas fluorescens* Migula, ¿control biológico o patógeno?: *Pseudomonas fluorescens*, biological control or pathogen?. *Revista de Protección Vegetal*, 30(3), 225-234.
- Photolo, M. M., Mavumengwana, V., Sitole, L., & Tlou, M. G. (2020). Antimicrobial and antioxidant properties of a bacterial endophyte, *Methylobacterium radiotolerans* MAMP 4754, isolated from *Combretum erythrophyllum* seeds. *International Journal of Microbiology*, 2020, 1-11.
- Rather, M. A., Gupta, K., & Mandal, M. (2021). Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(4), 1701-1718.
DOI: [10.1007/s42770-021-00624-x](https://doi.org/10.1007/s42770-021-00624-x)
- Rebollar, E. A., Hughey, M. C., Medina, D., Harris, R. N., Ibáñez, R., & Belden, L. K. (2016). Skin bacterial diversity of Panamanian frogs is associated with host susceptibility and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *The ISME journal*, 10(7), 1682-1695. DOI: [10.1038/ismej.2015.234](https://doi.org/10.1038/ismej.2015.234)
- Rebollar, E. A., Gutierrez-Preciado, A., Noecker, C., Eng, A., Hughey, M. C., Medina, D., ... & Harris, R. N. (2018). The skin microbiome of the neotropical frog *Craugastor fitzingeri*: inferring potential bacterial-host-pathogen interactions from metagenomic data. *Frontiers in microbiology*, 9, 466.
DOI: [10.3389/fmicb.2018.00466](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00466)
- Rebollar, E. A., Bridges, T., Hughey, M. C., Medina, D., Belden, L. K., & Harris, R. N. (2019). Integrating the role of antifungal bacteria into skin symbiotic communities of three Neotropical frog species. *The ISME journal*, 13(7), 1763-1775. DOI: [10.1038/s41396-019-0388-x](https://doi.org/10.1038/s41396-019-0388-x)
- Rebollar, E. A., Martínez-Ugalde, E., & Orta, A. H. (2020). The amphibian skin microbiome and its protective role against chytridiomycosis. *Herpetologica*, 76(2), 167-177.
- Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS microbiology*, 4(3), 482. DOI: [10.3934/microbiol.2018.3.482](https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482)
- Romaniuk, K., Golec, P., & Dziewit, L. (2018). Insight into the diversity and possible role of plasmids in the adaptation of psychrotolerant and metalotolerant *Arthrobacter spp.* to extreme Antarctic environments. *Frontiers in microbiology*, 9, 3144. DOI: [10.3389/fmicb.2018.03144](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03144)
- Rudra, P., & Boyd, J. M. (2020). Metabolic control of virulence factor production in *Staphylococcus aureus*. *Current opinion in microbiology*, 55, 81-87. DOI: [10.1016/j.mib.2020.03.004](https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.03.004)
- Ruiz, B., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M., & Langley, E. (2010). Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. *Critical reviews in microbiology*, 36(2), 146-167. DOI: [10.3109/10408410903489576](https://doi.org/10.3109/10408410903489576)

- Ryan, M. P., & Pembroke, J. T. (2018). *Brevundimonas spp*: Emerging global opportunistic pathogens. *Virulence*, 9(1), 480-493. DOI: [10.1080/21505594.2017.1419116](https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1419116)
- Saati-Santamaría, Z., Selem-Mojica, N., Peral-Aranega, E., Rivas, R., & García-Fraile, P. (2022). Unveiling the genomic potential of *Pseudomonas* type strains for discovering new natural products. *Microbial genomics*, 8(2).
- Sadiq, H., & Jamil, N. (2018). Antagonistic behaviour of organic compounds from *Bacillus* species and *Brevundimonas* specie. *Pak J Pharm Sci*, 31, 919-926.
- Sebastián Domingo, J. J., & Sánchez Sánchez, C. (2018). From the intestinal flora to the microbiome. *Rev. esp. enferm. dig.*, (ART-2018-104369). DOI: [10.17235/reed.2017.4947/2017](https://doi.org/10.17235/reed.2017.4947/2017)
- SEGOB. Acuerdo por el que se declara la obligatoriedad de la Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos. Diario Oficial de la Federación. (2018). Consultado Marzo 2021 http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5525043&fecha=05/06/2018
- Silby, M. W., Winstanley, C., Godfrey, S. A., Levy, S. B., & Jackson, R. W. (2011). *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS microbiology reviews*, 35(4), 652-680 DOI: [10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x)
- Singh, N., Marwa, N., Mishra, J., Verma, P. C., Rathaur, S., & Singh, N. (2016). *Brevundimonas diminuta* mediated alleviation of arsenic toxicity and plant growth promotion in *Oryza sativa* L. *Ecotoxicology and environmental safety*, 125, 25-34.
- Scheele, B. C., Pasmans, F., Skerratt, L. F., Berger, L., Martel, A. N., Beukema, W., & Canessa, S. (2019). Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. *Science*, 363(6434), 1459-1463 DOI: [10.1126/science.aav0379](https://doi.org/10.1126/science.aav0379)
- Undabarrena, A., Beltrametti, F., Claverías, F. P., González, M., Moore, E. R., Seeger, M., & Cámara, B. (2016). Exploring the diversity and antimicrobial potential of marine actinobacteria from the comau fjord in Northern Patagonia, Chile. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1135.
- Varga, J. F., Bui-Marinos, M. P., & Katzenback, B. A. (2019). Frog skin innate immune defences: sensing and surviving pathogens. *Frontiers in immunology*, 9, 3128. DOI: [10.3389/fimmu.2018.03128](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03128)
- Vincent, M. N., Harrison, L. A., Brackin, J. M., Kovacevich, P. A., Mukerji, P., Weller, D. M., & Pierson, E. A. (1991). Genetic analysis of the antifungal activity of a soilborne *Pseudomonas aureofaciens* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(10), 2928-2934.
- Velázquez-Meza, M. E. (2005). Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente. *Salud pública de México*, 47(5), 381-387.
- Yao, Y., Tang, H., Su, F., & Xu, P. (2015). Comparative genome analysis reveals the molecular basis of nicotine degradation and survival capacities of *Arthrobacter*. *Scientific Reports*, 5(1), 1-10. DOI: [10.1038/srep08642](https://doi.org/10.1038/srep08642)

- Wasi, S., Tabrez, S., & Ahmad, M. (2013). Use of *Pseudomonas* spp. for the bioremediation of environmental pollutants: a review. *Environmental monitoring and assessment*, 185, 8147-8155.
- Wang, X., Liu, M., Zhou, L., Gu, Z., & Zhao, J. (2016). Bioremediation of marine oil pollution by *Brevundimonas diminuta*: effect of salinity and nutrients. *Desalination and Water Treatment*, 57(42), 19768-19775
- Wang, S., Cui, J., Bilal, M., Hu, H., Wang, W., & Zhang, X. (2020). *Pseudomonas* spp. as cell factories (MCFs) for value-added products: From rational design to industrial applications. *Critical reviews in biotechnology*, 40(8), 1232-1249. DOI: [10.1080/07388551.2020.1809990](https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1809990)
- Wietz, M., Månsson, M., Bowman, J. S., Blom, N., Ng Y., & Gram, L. (2012). Wide distribution of closely related, antibiotic-producing *Arthrobacter* strains throughout the Arctic Ocean. *Applied and environmental microbiology*, 78(6), 2039-2042.
- Woodhams, D. C., LaBumbard, B. C., Barnhart, K. L., Becker, M. H., Bletz, M. C., Escobar, L. A., & Minbiole, K. P. (2018). Prodigiosin, violacein, and volatile organic compounds produced by widespread cutaneous bacteria of amphibians can inhibit two *Batrachochytrium* fungal pathogens. *Microbial Ecology*, 75(4), 1049-1062. DOI: [10.1007/s00248-017-1095-7](https://doi.org/10.1007/s00248-017-1095-7)
- OMS. *Plan de Accion mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos.*; 2015. <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/es/> Consultado Febrero 20, 2021
- OMS. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics.;2017. <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> .Consultado Marzo 15,2021.
- OMS. Resistencia a los antimicrobianos.; 2020.<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> Consultado Marzo 1, 2021
- Zhang, X., Zhang, G., & Yang, H. (2016). Genomics basis of *Arthrobacter* spp. environmental adaptability—A review. *Wei Sheng wu xue bao= Acta Microbiologica Sinica*, 56(4), 570-577.
- Zipperer, A., Konnerth, M. C., Laux, C., Berscheid, A., Janek, D., Weidenmaier, C., & Krismer, B. (2016). Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. *Nature*, 535(7613), 511-516. DOI: [10.1038/nature18634](https://doi.org/10.1038/nature18634)