



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE BACTERIAS AISLADAS DE
INSECTOS NATIVOS DE MÉXICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
BIOL. DANIA STEPHANIE BRITO BELTRÁN

TUTOR PRINCIPAL
DR. VÍCTOR HUMBERTO BUSTAMANTE SANTILLÁN
[Instituto de Biotecnología / UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. MARÍA ESPERANZA MARTÍNEZ ROMERO
[Centro de Ciencias Genómicas / UNAM](#)

DRA. CINTHIA ERNESTINA NÚÑEZ LÓPEZ
[Instituto de Biotecnología / UNAM](#)

Cuernavaca, Morelos. Diciembre, 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.

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

Comité tutorial:

Dra. María Esperanza Martínez Romero
Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

Dra. Cinthia Ernestina Núñez López
Instituto de Biotecnología, UNAM

Jurado de examen de grado:

Presidente: Dr. José Adelfo Escalante Lozada
Instituto de Biotecnología, UNAM

Secretario: Dra. Eria Rebollar Caudillo
Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

Vocal: Dra. Diana Ceapa Corina
Instituto de Química, UNAM

Vocal: Dr. Jesús Ulises Garza Ramos Martínez
Instituto Nacional de Salud Pública

Vocal: Dr. David Salvador Zamorano Sánchez
Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

AGRADECIMIENTOS

Al personal técnico y académico del Laboratorio 2 (edificio sur) del Instituto de Biotecnología de la UNAM, por compartir su tiempo y conocimientos para la realización del presente proyecto.

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP), por los fondos otorgados para la asistencia al XXXIII Congreso Nacional de Bioquímica.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada (CVU no. 1088464) para la realización de este trabajo de investigación.

Este estudio fue financiado con el donativo CONACyT - Problemas Nacionales no. 2017-01-5182.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	4
2. MARCO TEÓRICO.....	6
2.1 ANTIBIÓTICOS.....	6
2.2 RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS.....	13
2.3 BACTERIAS ESKAPE.....	22
2.4 ACCIONES MUNDIALES Y NACIONALES CONTRA LA RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS.....	25
2.5 BÚSQUEDA DE NUEVOS COMPUESTOS ANTIBIÓTICOS.....	29
3. ANTECEDENTES.....	31
3.1 IMPORTANCIA DE LA MICROBIOTA DE LOS INSECTOS.....	31
3.2 IMPORTANCIA DE LAS BACTERIAS SIMBIONTES EN LAS HORMIGAS.....	31
3.3 MICROBIOTA DE <i>Comadia redtenbacheri</i>	33
4. JUSTIFICACIÓN.....	35
5. HIPÓTESIS.....	35
6. OBJETIVO GENERAL.....	36
6.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
7. METODOLOGIA.....	37
7.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	37
7.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
7.2.1. CEPAS EMPLEADAS EN LOS ENSAYOS DE ACTIVIDAD INHIBITORIA.....	38
7.2.2. OBTENCION DE EJEMPLARES DE LA HORMIGA <i>Atta mexicana</i>	39
7.2.3. AISLAMIENTO DE LAS BACTERIAS DE LA MICROBIOTA DE <i>Atta mexicana</i>	40
7.2.4. OBTENCIÓN DE LAS BACTERIAS DE LA MICROBIOTA DEL GUSANO DEL MAGUEY <i>C. redtenbacheri</i>	42
7.2.5. ENSAYOS DE DIFUSIÓN PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA ..	42
7.2.6. IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES BACTERIANAS MEDIANTE LA SECUENCIACION DEL GEN 16S rRNA.....	43
8. RESULTADOS.....	45
8.1 Análisis de la actividad antibacteriana de cepas bacterianas aisladas del gusano de maguey <i>C. redtenbacheri</i>	45

8.2 Identificación de las especies de las cepas aisladas de <i>C. redtenbacheri</i> con actividad antibacteriana.....	49
8.3 Cepas bacterianas aisladas de la microbiota de <i>A. mexicana</i>	51
8.4 Análisis de la actividad antibacteriana de las cepas de <i>A. mexicana</i>	52
8.5 Identificación de las especies de las cepas de <i>A. mexicana</i> con actividad antibacteriana.	57
.....	58
8.6 Análisis de la actividad antibacteriana de las cepas de <i>C. redtenbacheri</i> y <i>A. mexicana</i> contra aislamientos clínicos resistentes a antibióticos	58
9. DISCUSIÓN.....	61
10. CONCLUSIONES.....	65
11. PERSPECTIVAS.....	66
12. REFERENCIAS.....	67
13. ANEXOS	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	7
Figura 2.	8
Figura 3.	8
Figura 4.	9
Figura 5.	10
Figura 6.	11
Figura 7.	12
Figura 8..	13
Figura 9..	20
Figura 10.	21
Figura 11.	27
Figura 12.	28
Figura 13..	47
Figura 14.	48
Figura 15.	55
Figura 16.	56
Figura 17.	56
Figura 18.	59
Figura 19.	60

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1.	46
Gráfica 2.	47
Gráfica 3.	52
Gráfica 4.	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.....	9
Tabla 2.....	33
Tabla 3.....	38
Tabla 4.....	39
Tabla 5.....	40
Tabla 6.....	44
Tabla 7.....	45
Tabla 8.....	49
Tabla 9.....	51
Tabla 10.....	51
Tabla 11.....	52
Tabla 12.....	54
Tabla 13.....	57
Tabla 14.....	59
Tabla 15.....	60
Tabla 16.....	63
Tabla 17.....	77
Tabla 18.....	78
Tabla 19.....	82

RESUMEN

Actualmente, la Resistencia a los Antimicrobianos (RAM) representa uno de los problemas de salud más graves para la humanidad. Se estima que en 2019 hubo 4,95 millones de muertes asociadas con la RAM, incluidas 1,27 millones de muertes directamente atribuibles a la resistencia a los antibióticos. Debido a esta alarmante situación, la Organización Mundial de la Salud estableció un plan de acción global para el control de la RAM, uno de los objetivos principales es el desarrollar nuevos antibióticos y nuevas estrategias antibacterianas. Hoy en día, para la búsqueda de nuevos antibióticos se están explorando fuentes inusuales, como los microorganismos que forman parte de la microbiota asociada a animales, incluyendo humanos e insectos.

Diferentes estudios han reportado que la microbiota de insectos es una fuente con gran potencial para la identificación de antimicrobianos y otros compuestos. Así mismo, han sugerido que existe una especialización de los microorganismos según el nicho ecológico que ocupan. En este proyecto evaluamos la actividad antibacteriana de una colección de cepas bacterianas aisladas de dos insectos nativos de México, el gusano rojo del maguey *Comadia redtenbacheri* y la hormiga *Atta mexicana*.

Analizamos la actividad antibacteriana de 344 cepas que aislamos de la microbiota de la hormiga *A. mexicana*, seleccionadas con base en las diferencias en su morfología colonial. También se analizaron 59 cepas aisladas previamente de la microbiota intestinal del gusano del maguey *C. redtenbacheri* por el grupo de investigación de la Dra. María Esperanza Martínez Romero.

La actividad antibacteriana de estas cepas se probó contra cuatro bacterias patógenas humanas de referencia que pertenecen al grupo ESKAPE: *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*. Encontramos que 20 cepas de *C. redtenbacheri* y 74 cepas de *A. mexicana* mostraron efecto inhibitorio de crecimiento contra al menos uno de estos patógenos. Posteriormente probamos la actividad antibacteriana de estas 94 cepas contra bacterias resistentes a antibióticos. Interesantemente, encontramos que una cepa aislada del gusano de maguey y una cepa aislada de la hormiga inhiben el crecimiento de aislados clínicos resistentes a antibióticos de *P. aeruginosa* y *S. aureus*, respectivamente. Mediante el análisis de la secuencia del gen 16S *rRNA* estas dos

cepas se identificaron como *Bacillus velezensis* (aislada del gusano del maguey *C. redtenbacheri*) y *Serratia* sp. (aislada de la hormiga *A. mexicana*).

Nuestros resultados muestran el potencial que tiene la microbiota de insecto nativos de México como fuente para la identificación de bacterias con actividades antibacterianas.

ABSTRACT

Currently, Antimicrobial Resistance (AMR) represents one of the most serious health problems for humanity. There were an estimated of 4.95 million AMR-associated deaths in 2019, including 1.27 million deaths directly attributable to antibiotic resistance. Due to this alarming situation, the World Health Organization established a global action plan for the control of AMR, with one major objective being the development of new antibiotics and new antibacterial strategies. Nowadays, unusual sources are being explored for the search for new antibiotic, such as the microbiota of animals, including humans and insects.

Different studies have reported that the insect microbiota is a source with great potential for the identification of antimicrobials and other compounds. They have also suggested that there is a specialization of microorganisms according to their ecological niche. In this project, we evaluated the antibacterial activity of a collection of bacterial strains isolated from two native insects of Mexico, the red maguey worm *Comadia redtenbacheri* and the *Atta mexicana* ant .

We analyzed the antibacterial activity of 344 strains that we isolated from the microbiota of the ant *A. mexicana* and selected based on their colonial morphology. Additionally, we analyzed the antibacterial activity of 59 strains previously isolated from the gut microbiota of the maguey worm *C. redtenbacheri* by the research group of Dr. María Esperanza Martínez Romero.

The antibacterial activity of these strains was tested against four reference human pathogenic bacteria that are part of the ESKAPE group: *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*. We found that 20 strains of *C. redtenbacheri* and 74 strains of *A. mexicana* showed a growth inhibitory effect against at least one of these pathogens. Subsequently, we tested the antibacterial activity of these 94 strains against antibiotic-resistant bacteria. Interestingly, we found one isolate from the maguey worm and one from the ant that inhibit the growth of antibiotic-resistant clinical isolates of *P. aeruginosa* and *S. aureus*, respectively. Through 16S rRNA gene sequence analysis, these two strains were identified as *Bacillus velezensis* (isolated from the maguey worm *C. redtenbacheri*) and *Serratia* sp. (isolated from the ant *A. mexicana*).

Our results show the potential of the microbiota of native insects of Mexico for the identification of antibacterial compounds.

1. INTRODUCCIÓN

La resistencia a compuestos antimicrobianos (RAM) representa uno de los problemas actuales más graves para la humanidad, a tal punto que la Organización Mundial de la Salud (OMS) la cataloga dentro de las diez amenazas para la salud más importantes del siglo XXI (OMS, 2019; OPS, 2019). En especial, las infecciones causadas por bacterias con resistencia a múltiples antibióticos representan un gran reto para el personal de salud al momento de ofrecer un tratamiento, ya que las opciones son realmente escasas, esto a su vez causa que se incrementen los costos médicos, se prolonguen las estancias hospitalarias y que aumente la mortalidad (OMS, 2020). La OMS ha establecido un plan de acción mundial para el control de la resistencia a los antimicrobianos e hizo un llamado para que todos los países miembros establezcan un plan nacional contra esta problemática. Este plan tiene como objetivos centrales el desarrollo de nuevos antibióticos y nuevas estrategias antibacterianas.

Alrededor del 80% de los antibióticos disponibles comercialmente provienen de microorganismos del suelo, especialmente del género bacteriano *Streptomyces* (Arango *et al.*, 2016). Por ejemplo, *S. antibioticus* produce actinomicina, *S. griseus* produce estreptomina, *S. erythreus* produce eritromicina y *S. orientalis* produce vancomicina. En la actualidad se están explorando otras fuentes para la identificación de nuevos antibióticos, como compuestos que provienen de plantas y sus derivados, de venenos de serpientes y alacranes, de microorganismos de ambientes extremos, de bacterias marinas y de la microbiota de humanos y animales. En nuestro grupo de investigación se han caracterizado bacterias marinas y bacterias provenientes de la microbiota del ajolote (*Ambystoma altamirani*) que poseen actividad antibacteriana contra bacterias patógenas de alta relevancia clínica (Aragón-García, 2023; Romero-González *et al.*, 2023).

La diversificación y el éxito evolutivo de los insectos han dependido en parte de sus innumerables relaciones con microorganismos, los cuales ayudan a mejorar dietas pobres en nutrientes, ayudan en la digestión de componentes alimentarios, protegen de depredadores, parásitos y patógenos, contribuyen en la comunicación interespecífica e intraespecífica, además de que están involucrados en los sistemas de apareamiento y reproducción (Engel y Moran, 2013). Diferentes estudios han reportado que la microbiota de los insectos tiene un gran potencial para la identificación de antimicrobianos y otros compuestos (Menegatti *et al.*, 2020; Van Arnem *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2020). Por lo que, en el presente proyecto nos enfocamos en analizar la actividad antibacteriana de una colección de cepas previamente aisladas de la

microbiota del gusano del maguey *Comadia redtenbacheri*, así como de cepas que aislamos de la microbiota de la hormiga *Atta mexicana*. Nuestro interés fue encontrar cepas que presentaran actividad contra bacterias patógenas del grupo ESKAPE: *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*, especialmente contra aislados clínicos resistentes a antibióticos. Además, mediante la secuenciación y análisis del gen *16S rRNA* identificamos la especie de varias cepas que presentaron actividad antibacteriana.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 ANTIBIÓTICOS

➤ Definición de antibiótico

Los antibióticos son moléculas que inhiben el crecimiento o matan bacterias (Adzitey, 2015). Aquellos antibióticos que matan bacterias se denominan bactericidas, mientras que los que inhiben transitoriamente el crecimiento bacteriano se denominan bacteriostáticos (De la Fuente-Salcido *et al.*, 2015; Etebu y Arikekpar, 2016). Estas moléculas son derivadas del metabolismo de microorganismos, pero también pueden ser obtenidas en parte o en su totalidad a través de síntesis química.

➤ Clasificación de los antibióticos y mecanismos de acción

Existen varias formas de clasificar los antibióticos, los esquemas de clasificación más comunes se basan en sus estructuras químicas, modo de acción y espectro de actividad (Schwalbe *et al.*, 2007; Etebu y Arikekpar, 2016). Algunas clases de antibióticos según su estructura química son: betalactámicos, macrólidos, tetraciclinas, quinolonas, aminoglucósidos, sulfonamidas y glicopéptidos.

- **Betalactámicos**

Representan el grupo más numeroso y de mayor uso en la clínica. El primer betalactámico, la penicilina, fue descubierta en 1928 por Alexander Fleming. Dicho antibiótico es un compuesto producido por el hongo *Penicillium chrysogenum*. El nombre “betalactámico” deriva de la presencia de un anillo lactámico de cuatro átomos (tres de carbono y uno de nitrógeno) con un oxígeno en posición β con respecto a un nitrógeno. En función de los radicales que se unen a este anillo se distinguen varios subgrupos, los más importantes son: penicilinas, cefalosporinas, monobactamas y carbapenemas (Figura 1) (Calvo y Martínez-Martínez, 2009; Gómez *et al.*, 2015).

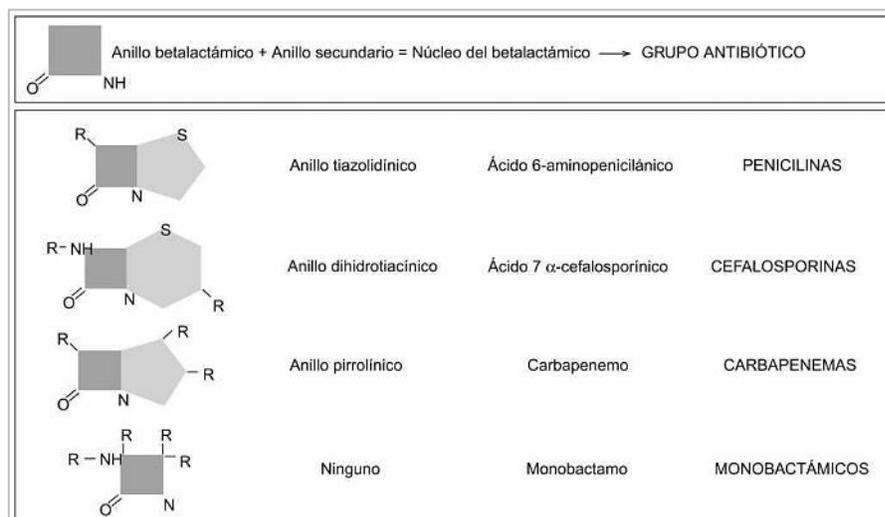


Figura 1. Estructura química de los antibióticos betalactámicos (Figura modificada de Suárez y Gudiol, 2008)

Los antibióticos betalactámicos son agentes bactericidas que actúan a través de dos mecanismos: inhibición de la síntesis de la pared bacteriana e inducción de la autólisis bacteriana (Gómez *et al.*, 2015).

La inhibición de la síntesis de la pared celular se da al afectar la fase final (transpeptidación) de la síntesis del peptidoglicano, en la que intervienen activamente las enzimas PBP (*Penicillin-Binding Proteins*). Los betalactámicos bloquean las PBP porque el anillo β -lactámico tiene una estructura espacial similar a la del residuo acil-D-alanin-D-alanina (sustrato natural de las PBP) de las cadenas del peptidoglicano. Entonces, el núcleo β -lactámico de la molécula se une irreversiblemente a las PBP. Esta unión irreversible evita el paso final (la transpeptidación) de la formación de la pared de peptidoglicanos, interrumpiendo así la síntesis de la pared celular (Calvo y Martínez-Martínez, 2009; Kohanski *et al.*, 2010). Además, la inhibición de las PBP (mediante la unión irreversible núcleo β -lactámico-PBP) ocasiona que se activen enzimas autolíticas de la pared celular, provocando así la muerte bacteriana (Suárez y Gudiol, 2009).

- **Macrólidos**

La estructura de los macrólidos consiste en un anillo macrocíclico de lactona de 14, 15 o 16 carbonos, unido a desoxiazúcares (como L-cladinosa y D-desosamina) (Figura 2 y 3).

El primer antibiótico perteneciente a esta clase fue descubierto y aislado por primera vez en 1952 por J. M. McGuire como producto metabólico del hongo del suelo *Saccharopolyspora erythraea*. (Etebu y Ariekpar, 2016).

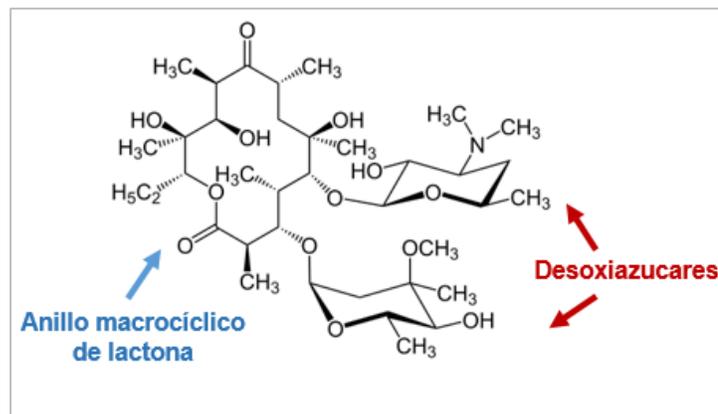


Figura 2. Estructura química de los macrólidos (Figura modificada de Hamilton-Miller, 1973)

14 átomos	15 átomos	16 átomos
Eritromicina	Azitromicina (azólido)	Diacetilmidecamicina
Claritromicina		Espiramicina
Roxitromicina		Josamicina
Telitromicina (cetólido)		

Figura 3. Clasificación de los macrólidos de acuerdo con el número de carbonos del anillo macrocíclico de lactona (Cobos-Trigueros *et al.*, 2009).

Los antibióticos macrólidos inhiben la síntesis de proteínas actuando en la subunidad 50S del ribosoma bacteriano. Específicamente, se unen de forma reversible al dominio V del ARN ribosómico 23S. La unión se realiza mediante la formación de puentes de hidrógeno entre diferentes radicales hidroxilos del macrólido (especialmente entre el OH en posición 2' del azúcar) y determinadas bases del ARNr. Esta acción bloquea la adición de aminoácidos a las cadenas

polipeptídicas durante la síntesis de proteínas, alterando a su vez la translocación del ARNt (Cobos-Trigueros *et al.*, 2009; Rodríguez-Palomares y Obrador-Vera, 2013).

- **Tetraciclinas**

La tetraciclina fue descubierta por Benjamin Duggar en 1945 y fue aislada a partir de una bacteria del suelo del género *Streptomyces*. El primer miembro de esta clase fue la clortetraciclina (Etebu y Ariekpar, 2016).

Todas las tetraciclinas poseen un núcleo de estructura tetracíclica lineal compuesta de 4 anillos fusionados al que se pueden unir distintos radicales, lo cual da origen a las diferentes tetraciclinas (Figura 4). Los miembros de esta clase de antibióticos se agrupan en diferentes generaciones según el método de síntesis. Los obtenidos por biosíntesis son de primera generación, los derivados de la semisíntesis son de segunda generación y los obtenidos por síntesis total se consideran de tercera generación (Tabla 1) (Vicente y Pérez-Trallero, 2010; Fuoco, 2012; Etebu y Ariekpar, 2016).

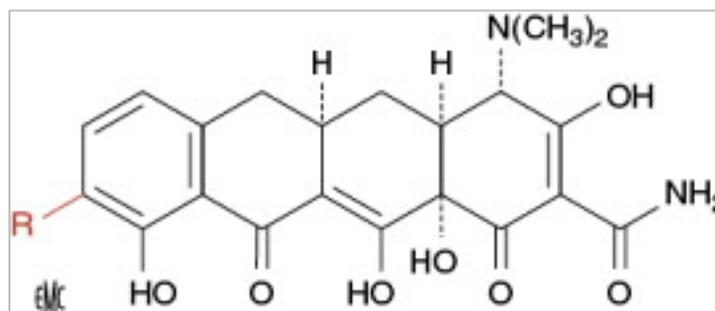


Figura 4. Estructura química de las tetraciclinas (N’Guyen y Baumard, 2013)

Tabla 1. Clasificación de las tetraciclinas según el método de síntesis

Generación	Antibiótico
1° Generación (naturales)	Clortetraciclina, Oxitetraciclina, Tetraciclina, Demeclociclina,
2° Generación (semisintéticos)	Doxiciclina, Limeciclina, Metaciclina, Minociclina, Rolitetraciclina
3° Generación (sintéticos)	Tigeciclina

Las tetraciclinas inhiben la síntesis de proteínas. Se unen a las subunidades 30s de los ribosomas bacterianos, bloqueando la fijación del aminoacil ARNt, con lo que se impide la adición de aminoácidos a la cadena peptídica (Rodríguez-Palomares y Obrador-Vera, 2013).

- **Quinolonas**

La primera quinolona producida fue el ácido nalidíxico. Fue descubierto por casualidad por científicos involucrados en la búsqueda de medicamentos contra la malaria (Etebu y Arikekpar, 2016). Las quinolonas tienen una estructura formada por dos anillos, con un nitrógeno en la posición 1, un grupo carbonilo en la posición 4 y un grupo carboxilo en la posición 3. La potencia y el espectro aumentan de manera significativa cuando llevan un átomo de flúor en la posición 6, las cuales reciben el nombre de fluoroquinolonas (Figura 5) (Alós, 2009).

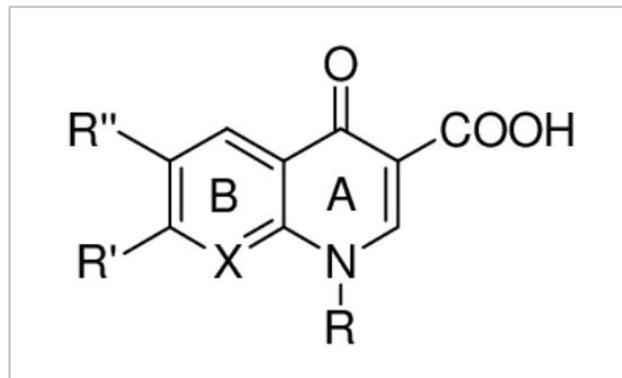


Figura 5. Estructura química de las quinolonas. X= C ó N; R= ciclopropil, etil, fluoroetil, metilamino, fluorofenilo o anillo tiazínico o oxacínico. R'= piperacino-4-ilo, 3metilpiperacino-1-ilo; R''= átomo de flúor (Gonzales-Gomez,2005)

El mecanismo de acción de estos antibióticos consiste en la inhibición de topoisomerasas, las cuales son enzimas que participan en el proceso de síntesis del ADN, enrollan y desenrollan el ADN. En bacterias Gram-negativas la topoisomerasa que inhiben las quinolonas es la ADN-girasa, que tiene una subunidad A y una subunidad B. La función más importante de la enzima ADN-girasa es mantener un nivel de enrollamiento del ADN que facilite el movimiento

de los complejos que se forman en la replicación y la transcripción. Las quinolonas interaccionan con aminoácidos de las alfa-hélices cercanas a la tirosina del centro activo de las girasas. En bacterias Gram-positivas la diana es la topoisomerasa IV, que tiene 2 subunidades: ParC y ParE. La topoisomerasa IV separa las hebras de ADN tras cada replicación. También tiene una actividad relajante sobre el ADN. La inhibición de estas enzimas produce la aparición de extremos libres de ADN, sobre los cuales actúan exonucleasas que producirán la muerte celular (Rodríguez-Martínez, 2005).

- **Aminoglucósidos**

En 1944 fue aislado el primer aminoglucósido, denominado como estreptomina, a partir de una cepa de *Streptomyces griseum* (Etebu y Arikekpar, 2016).

Los antibióticos aminoglucósidos se componen de aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos a un alcohol cíclico hexagonal con grupos amino (aminociclitol) (Figura 6) (Molina *et al.*, 2009).

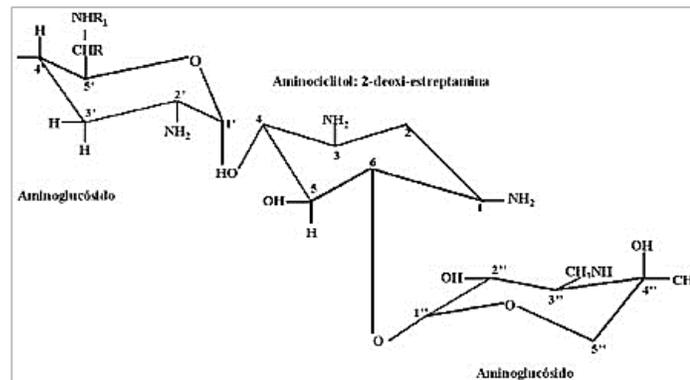


Figura 6. Estructura química de los aminoglucósidos (Mella, 2005)

Los aminoglucósidos actúan mediante su fijación al ARNr 16S de la subunidad del ribosoma 30S (Molina *et al.*, 2009). Esta interacción puede inducir una alteración del complejo formado entre un codón de ARNm y su aminoacil ARNt afín, lo cual, conduce a una lectura errónea del ARNm que finaliza de forma prematura la traducción del ARNm. Esta alteración en la lectura de los codones del ARNm puede resultar en una mala traducción en la que se producen proteínas “aberrantes” (Kohanski *et al.*, 2010).

- **Sulfonamidas**

Los antibióticos sulfonamidas contienen un grupo funcional sulfonamida, que es un azufre unido a dos 2 moléculas de oxígeno separadas, cada una a través de un doble enlace 1 nitrógeno y 1 grupo R de cadena lateral (Figura 7).

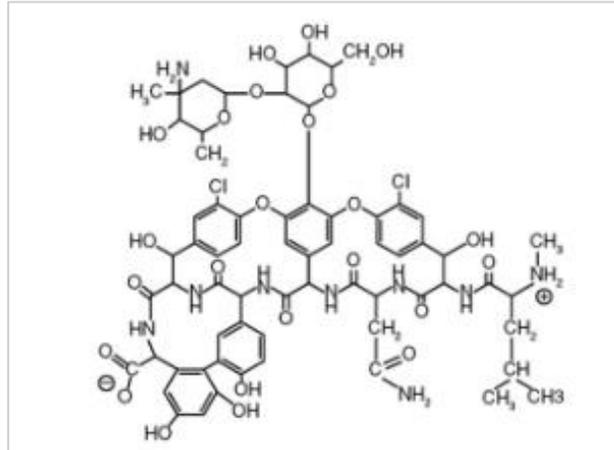


Figura 7. Estructura química de las sulfonamidas

Están estructuralmente relacionadas con ácido paraaminobenzoico (PABA), un factor requerido por las bacterias para la síntesis del ácido fólico, el cual es imprescindible para la síntesis de precursores de los ácidos nucleicos bacterianos. Las sulfonamidas compiten con PABA por la enzima dihidropteroato sintetasa, bloqueando la conversión de PABA a dihidrofolato, ocasionando que las bacterias ya no puedan sintetizar purinas necesarias para llevar a cabo la síntesis de ADN (Vicente y Pérez-Trallero, 2010).

- **Glicopéptidos**

Los antibióticos glicopéptidos se obtuvieron originalmente como productos naturales, pero en los últimos 20 años se han desarrollado derivados semisintéticos con actividad y propiedades farmacocinéticas mejoradas.

El primer y más conocido antibiótico de este grupo es la vancomicina, la cual fue aislada de *Streptomyces orientalis*, un microorganismo encontrado en suelos en Borneo (Indonesia). Naturalmente, los glicopéptidos están formados por un péptido cíclico de siete aminoácidos, al que se unen dos azúcares (Figura 8) (Etebu y Ariekpar, 2016).

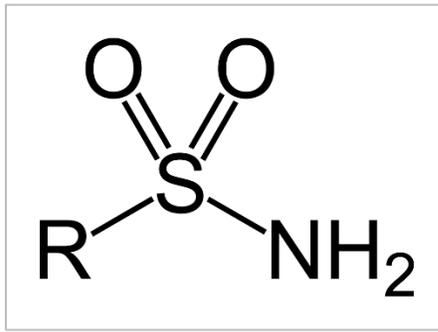


Figura 8. Estructura química de los glucopeptidos.

Los antibióticos glucopeptídicos inhiben la síntesis de peptidoglucano, uniéndose a unidades de peptidoglucano (en el dipéptido d-alanil-d-alanina) y bloqueando la actividad de la transglucosilasa y la PBP. De esta manera, los glucopeptidos, ya sean libres en el periplasma, como la vancomicina, o anclados a la membrana, como la teicoplanina, actúan como inhibidores estéricos de la maduración de los peptidoglucanos (Kohanski *et al.*, 2010).

2.2 RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

La introducción de los antibióticos en la práctica clínica fue una de las intervenciones más importantes para el control de las enfermedades infecciosas. Sin embargo, una amenaza creciente que deteriora la eficacia de estos fármacos es la resistencia bacteriana a los antibióticos (Alós, 2015).

➤ Definición de la resistencia a los antibióticos

La resistencia a los antibióticos se produce cuando las bacterias adquieren la capacidad de eludir los mecanismos que los fármacos utilizan contra ellas (Christaki *et al.*, 2019).

La resistencia a los antibióticos en patógenos bacterianos de humanos existía antes del uso de estos fármacos por el hombre, pero su prevalencia era baja. Desde el uso masivo de los antibióticos se ha constatado a nivel mundial un aumento muy importante de la prevalencia de la resistencia a antibióticos. Las infecciones causadas por patógenos resistentes a los antibióticos suelen ser más difíciles de tratar, causando una morbilidad y mortalidad significativas (Alós, 2015; Christaki *et al.*, 2019).

➤ Resistencia Intrínseca, Adquirida y Adaptativa.

La resistencia a los antibióticos que exhiben las bacterias puede ser intrínseca, adquirida o adaptativa (Christaki *et al.*, 2019).

- **Resistencia Intrínseca**

La resistencia intrínseca es un fenómeno natural que es independiente de la exposición a los antibióticos y se codifica en el genoma de las bacterias. Este tipo de resistencia es una propiedad natural de algunos grupos bacterianos (Morrison y Zembower, 2020). Un ejemplo muy común de este tipo de resistencia es aquella que presentan todas las bacterias Gram-negativas a los antibióticos glicopéptidos (como vancomicina), debido a que estos compuestos tienen una estructura que es incapaz de atravesar la membrana externa de estas bacterias. Otro ejemplo de resistencia intrínseca es la presencia de bombas de expulsión inespecíficas, las cuales expulsan antibióticos y otras sustancias del interior al exterior de las células bacterianas (Arzanlou *et al.*, 2017).

- **Resistencia Adquirida**

La resistencia adquirida se define como la resistencia exhibida cuando una bacteria previamente sensible adquiere un mecanismo de resistencia, ya sea por una mutación o por la adquisición de nuevo material genético de una fuente exógena (transferencia horizontal de genes). La transferencia horizontal de genes puede ocurrir a través de tres mecanismos principales: transformación, transducción y conjugación (Holmes *et al.*, 2016). La transformación involucra recombinación genética entre fragmentos de ADN extracelular (secretado o producto de lisis celular), que son internalizados por la bacteria receptora, y el ADN genómico. Sólo unas pocas bacterias son naturalmente transformables o competentes. El proceso de transducción implica la transferencia de material genético entre una bacteria donante y una receptora por un bacteriófago. La conjugación implica la transferencia de material genético de una célula bacteriana a otra por contacto físico directo entre las células. Se forma un pili sexual que conecta a dos células bacterianas, durante este contacto cercano un plásmido es transferido de la célula donante a la célula receptora. Múltiples genes de resistencia a menudo están presentes en un solo plásmido, lo que permite la

transferencia de resistencia a múltiples fármacos en un solo evento de conjugación. El ensamblaje de múltiples genes de resistencia en un solo plásmido está mediado por elementos genéticos móviles (transposones, integrones y elementos ISCR de región común de secuencia de inserción) (Christaki *et al.*, 2019).

- **Resistencia Adaptativa**

La resistencia adaptativa se define como la resistencia a uno o más antibióticos inducida por una señal ambiental específica (estrés, estado de crecimiento, pH, concentraciones de iones, condiciones de nutrientes y niveles subinhibitorios de antibióticos). A diferencia de la resistencia intrínseca y adquirida, la resistencia adaptativa es transitoria, es decir, las bacterias generalmente vuelven al estado original (susceptible) una vez que se elimina la presión de selección que ocasiona la señal inductora. La resistencia adaptativa parece ser el resultado de modulaciones en la expresión génica como respuesta al cambio ambiental (Arzanlou *et al.*, 2017; Christaki *et al.*, 2019).

➤ **Mecanismos de resistencia a antibióticos**

La resistencia puede ser mediada por múltiples mecanismos que se pueden englobar dentro de tres tipos principales (Chávez-Jacobo, 2020):

1. Disminución de la concentración de antibiótico

Aquellos mecanismos que reducen la concentración intracelular del fármaco, ya sea impidiendo la entrada o a través de la expulsión.

1.1. Reducción en la permeabilidad de la membrana externa

En comparación con las especies Gram-positivas, las bacterias Gram-negativas son intrínsecamente menos permeables a muchos antibióticos ya que su membrana externa forma una barrera de permeabilidad (Blair *et al.*, 2015).

Las porinas son la principal vía de entrada de los antibióticos hidrofílicos (como los betalactámicos, las fluoroquinolonas, las tetraciclinas y el cloranfenicol) a través de la membrana externa bacteriana. El número y tipo de porinas expresadas en la membrana externa afecta la entrada de antibióticos hidrofílicos y, por tanto, la susceptibilidad de la célula

bacteriana a ellos (Fernández *et al.*, 2011). Las mutaciones que afectan la expresión o la función de las porinas pueden conducir a una resistencia adquirida a los antibióticos. Estas mutaciones pueden tener diferentes efectos, como la pérdida de porinas, la modificación del tamaño o conductancia de las porinas o la reducción de la expresión de porinas (Christaki *et al.*, 2019).

Se ha observado que la absorción reducida del antibiótico debido a los cambios en la expresión de la porina aumenta el efecto de los mecanismos de resistencia coexistentes, como las bombas de expulsión o las enzimas que degradan los antibióticos, lo que da como resultado una resistencia de alto nivel (Fernández *et al.*, 2011).

1.2. Expulsión del antibiótico por bombas de eflujo

Las bombas de eflujo son sistemas protéicos bacterianos complejos presentes en la membrana citoplasmática, los cuales son capaces de bombear moléculas tóxicas fuera de la célula, lo que reduce su concentración a niveles subletales (Arzanlou *et al.*, 2017).

Los sistemas de expulsión bacterianos transportan de manera activa a la gran mayoría de los antimicrobianos y son los principales responsables de la resistencia intrínseca. Mientras que algunos sistemas de transporte tienen sustratos específicos (como las bombas de eflujo específicas para tetraciclina, macrólidos y cloranfenicol), muchos otros pueden expulsar una gran cantidad de sustancias con estructuras totalmente distintas, a estos se les conoce como sistemas de expulsión múltiple (Chávez-Jacobo, 2020). Los mecanismos de salida de múltiples fármacos casi siempre están codificados cromosómicamente, mientras que los genes que codifican bombas de eflujo específicas del sustrato tienden a ubicarse en elementos genéticos móviles (Christaki *et al.*, 2019).

2. Protección del sitio blanco del antimicrobiano

La protección del sitio blanco del antimicrobiano mediante la adquisición de mutaciones en los genes que codifican para estos determinantes o mediante moléculas que interfiere con la unión del antibiótico.

2.1. Mutación de genes que codifican la molécula blanco

La mayoría de los antibióticos tienen alta afinidad por su sitio blanco, una vez que se unen a éste tienen la capacidad de desestabilizar las funciones normales de un organelo específico o una vía metabólica fundamental para la célula bacteriana. Por lo tanto, cambios en la

estructura del blanco que impidan la unión del fármaco, pero que permitan continuar con su funcionamiento normal, confieren resistencia a los antimicrobianos (Chávez-Jacobo, 2020). Algunos ejemplos de este tipo de resistencia son las mutaciones en los genes que codifican el dominio V del ARNr 23S, las cuales son el mecanismo más común de resistencia a linezolid o la resistencia a las quinolonas, resultado de mutaciones cromosómicas en los genes de la girasa bacteriana y/o la topoisomerasa IV (Aldred *et al.*, 2014; Miller *et al.*, 2014).

2.2. Interferencia con la unión del antimicrobiano

La protección del sitio blanco mediante interferencia es una manera efectiva de evitar el efecto de un antibiótico (Chávez-Jacobo, 2020). Un ejemplo de interferencia son las proteínas Qnr, las cuales son capaces de bloquear la unión de las quinolonas con su sitio blanco, las topoisomerasas II y IV, y de esta manera conferir resistencia (Goto *et al.*, 2015). Las proteínas de protección ribosomal (RPP) son otro ejemplo de resistencia a los antimicrobianos a través de la protección del sitio objetivo, se han descrito tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-negativas (Connell *et al.*, 2003; Roberts, 2005).

3. Modificación de los antibióticos

La modificación del antibiótico mediante hidrólisis o la adición de grupos funcionales.

3.1. Modificación mediante hidrólisis

La modificación enzimática de los antimicrobianos es uno de los mecanismos más eficientes para inactivarlos. Actualmente han sido reportadas cientos de enzimas capaces de degradar o modificar betalactámicos, aminoglucósidos, fenicoles y macrólidos. El aumento en el número de antimicrobianos de la misma familia a los cuales se les han introducido modificaciones para hacerlos más efectivos, ha provocado que las enzimas capaces de degradarlos incrementen su espectro de acción; hoy en día hay betalactamasas de espectro extendido (ESBLs) y enzimas capaces de romper betalactámicos que proporcionan resistencia a todos los antimicrobianos de esta familia (Chávez-Jacobo, 2020).

3.2. Modificación mediante la adición de grupos funcionales

La adición enzimática de grupos químicos (acilo, fosfato, nucleotidil y ribitoil) provoca resistencia debido a que disminuye la afinidad del antimicrobiano por su sitio blanco, siendo los aminoglucósidos un grupo de antibióticos muy susceptible a la inactivación mediada por

acetil-transferasas, fosfo-transferasas y nucleotidil-transferasas (De la Fuente-Salcido *et al.*, 2015). Los aminoglucósidos son particularmente susceptibles a la adición de grupos funcionales debido a que su estructura cuenta con diversos grupos hidroxilo y amino expuestos (Chávez-Jacobo, 2020).

Además, se han reportado dos enzimas pertenecientes a las aminoglucósido transferasas que son capaces de modificar a la ciprofloxacina, la *AAC-Ib-cr* que es capaz de adicionar un grupo acilo, y *CrpP* que es capaz de adicionar un grupo fosfato. Esto es muy preocupante ya que la resistencia que este grupo de enzimas proporcionaba y que parecía ser exclusiva para aminoglucósidos, se ha extendido hacia otro grupo de antimicrobianos completamente diferente (Robicsek *et al.*, 2006; Chávez-Jacobo, 2020).

➤ **Problemática general de la resistencia a los antibióticos**

Si bien la causa original de la resistencia es intrínseca a la evolución bacteriana, es un hecho que el uso indiscriminado/inadecuado de los antibióticos en múltiples sectores (humanos, animales, agricultura) amplifica y acelera este proceso debido a que las bacterias se encuentran sujetas a altas presiones de selección (McEwen y Collignon, 2018; Ponce de León-Rosales *et al.*, 2015).

Entre los principales factores que aceleran la aparición de la resistencia a los antibióticos se encuentran los siguientes: la prescripción innecesaria, selección inadecuada de tratamiento (tipo, dosis, duración), automedicación, falta de adherencia al tratamiento por parte de los consumidores, medidas deficientes de prevención y control de las enfermedades, la propagación de infecciones generadas en los centros de atención de la salud, uso de antibióticos en la industria agropecuaria para el tratamiento y la profilaxis de infecciones bacterianas en diversos cultivos, uso de antibióticos para la profilaxis y como factores de crecimiento en el sector ganadero y acuícola, falta de acceso a agua limpia, saneamiento e higiene tanto para las personas como para los animales, el acceso deficiente a medicamentos, vacunas y métodos de diagnóstico asequibles, falta de sensibilización y conocimiento, y el incumplimiento de la legislación (McEwen y Collignon, 2018; OMS, 2020).

La resistencia a los antibióticos está aumentando en todo el mundo a niveles peligrosos. Día tras día están apareciendo y propagándose en todo el mundo nuevos mecanismos de resistencia que ponen en peligro nuestra capacidad para tratar las enfermedades infecciosas comunes. Sin antibióticos efectivos para la prevención y el tratamiento de infecciones, los procedimientos médicos como el trasplante de órganos, la quimioterapia contra el cáncer, el

control de la diabetes y la cirugía mayor (por ejemplo, cesáreas) se convierten en un riesgo muy alto (OPS/OMS, 2019).

En un estudio del 2014 se estimó que infecciones causadas por bacterias que presentan resistencia a antibióticos (RA) causaron al menos 700,000 en ese año y que de no controlarse esta problemática, para el 2050 esto podrían causar la muerte de 10 millones de personas por año (O'Neill, 2014).

Sin embargo, en el 2019 se realizó un reporte acerca de la carga global de resistencia bacteriana a los antimicrobianos y se estimó que las muertes asociadas a bacterias con RAM ascendieron a una cifra de 4.95 millones, de las cuales 1.27 millones de muertes fueron directamente atribuibles a la resistencia a los antibióticos. Así mismo se reportó que seis patógenos fueron responsables de más de 250000 muertes asociadas con RAM: *Escherichia coli* (*E. coli*), *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *S. pneumoniae*, *A. baumannii* y *P. aeruginosa* (Figura 9) (Murray *et al.*, 2022). Además, se estimó que en Latinoamérica y el Caribe, la carga mortal de la RAM estuvo relacionada con tres principales patógenos: *E. coli*, *S. aureus* y *K. pneumoniae* (Figura 10) (Murray *et al.*, 2022).

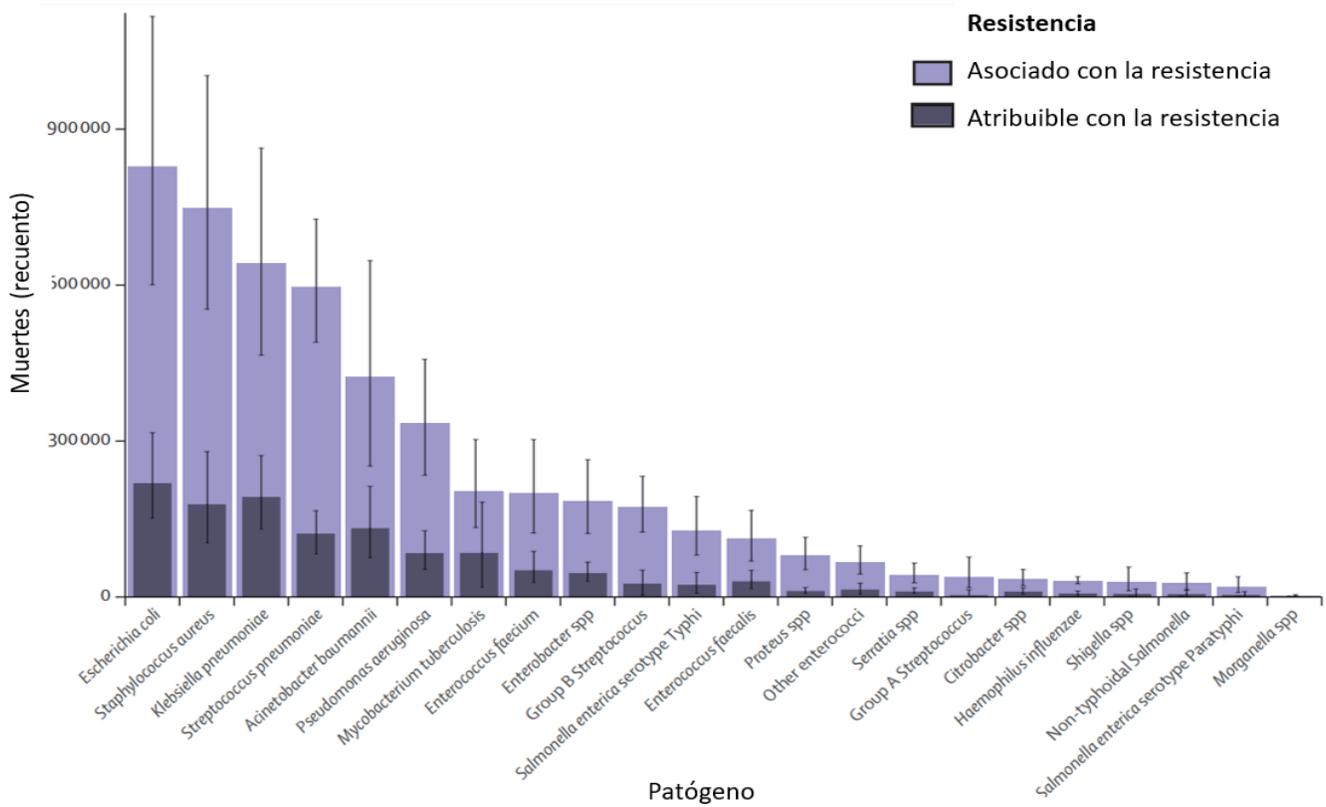


Figura 9. Muertes globales atribuibles y asociadas con la RAM de distintas bacterias patógenas en el 2019 (Murray *et al.*, 2022).

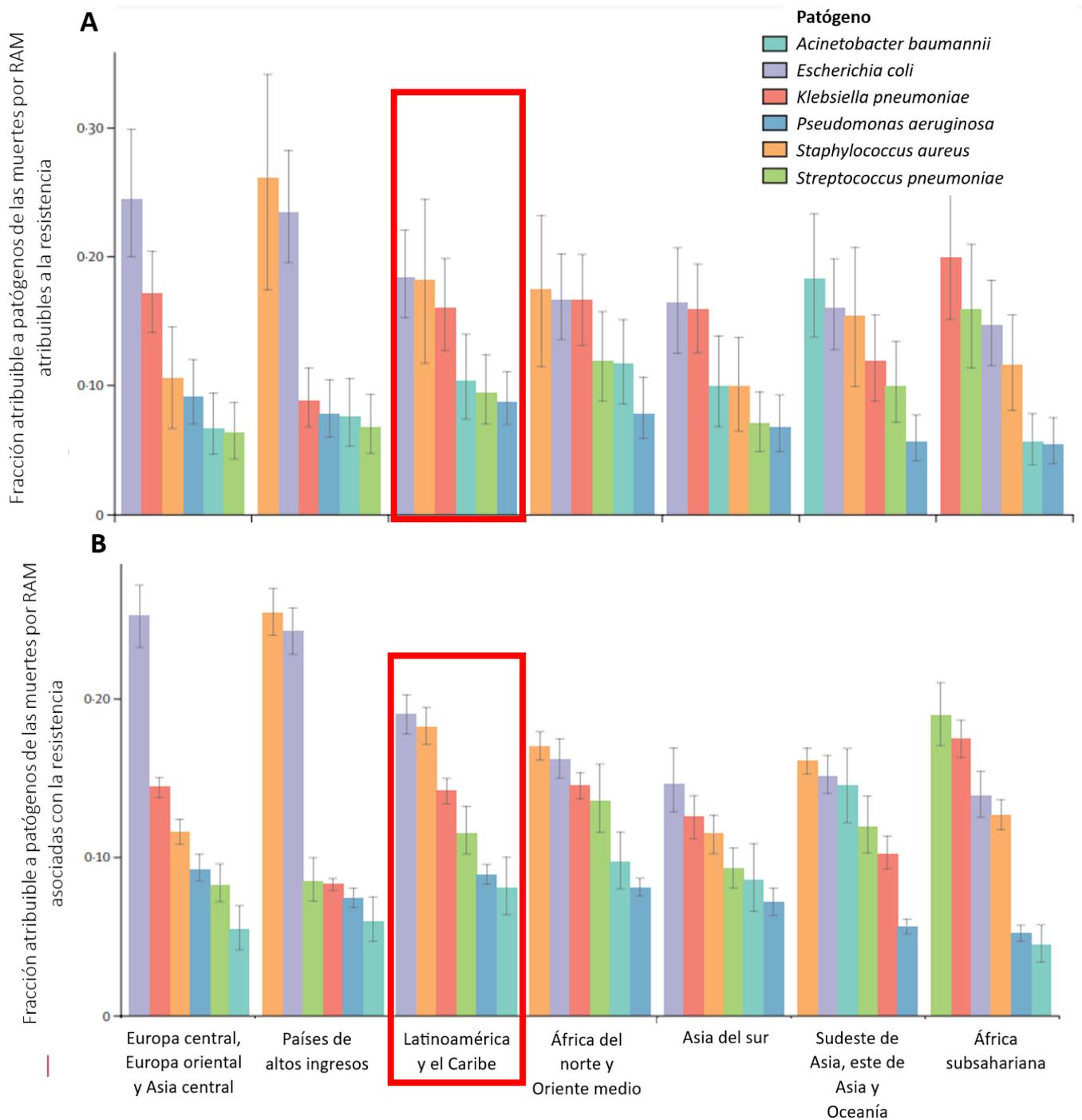


Figura 10. Muertes atribuibles (A) y asociadas (B) con la RAM para los seis patógenos principales, mostradas por regiones del mundo en 2019. (Murray *et al.*, 2022).

Diferentes estudios han reportado una alta incidencia en México de bacterias resistentes a antibióticos que causan infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS), principalmente las que pertenecen al grupo denominado ESKAPE: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp. (Plan Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana, 2019).

Un estudio realizado en el periodo de 2017-2018, en el que participaron 20 hospitales de segundo y tercer nivel de atención en México, reportó que, de 4382 hemocultivos, *E. coli* y *K. pneumoniae* fueron las bacterias más frecuentes aisladas, con resistencia >30% a la mayoría de los fármacos evaluados (ampicilina, ampicilina-sulbactam, cefuroxima, cefepima, ceftazidima, cefotaxima/ ceftriaxona, piperacilina-tazobactam, ciprofloxacino); sólo para carbapenémicos y amikacina la resistencia fue <20%. *A. baumannii* tuvo resistencia >20% a todos los fármacos (ampicilina-sulbactam, cefepima, ceftazidima, meropenem, piperacilina-tazobactam, amikacina, ciprofloxacino). La resistencia a oxacilina en *S. aureus* fue de 20% (Miranda-Navales *et al.*, 2019).

Posteriormente, en un trabajo publicado en marzo del 2019, en el que participaron 47 hospitales de 20 estados de México, se estudiaron 22,943 aislamientos obtenidos de enero a junio de 2018, en los cuales se encontró un alto porcentaje de bacterias Gram-negativas resistentes a carbapenémicos: más de 50% de *A. baumannii*, 40% de *P. aeruginosa* y 12% de *Klebsiella* spp. y *E. cloacae*. La MDR fue muy elevada en *A. baumannii* (53%) y *K. pneumoniae* (22%). En el grupo de las bacterias Gram-positivas, 21 % fue *S. aureus* resistente a meticilina y 21 % fue enterococos resistentes a vancomicina (Garza-González *et al.*, 2019; Giono *et al.*, 2020).

2.3 BACTERIAS ESKAPE

Los microorganismos multirresistentes son considerados un grave problema de salud pública, ocasionando que la elección de un tratamiento apropiado para los pacientes infectados sea todo un reto para los profesionales de salud. Entre esos microorganismos destaca el grupo denominado **ESKAPE**, acrónimo para las siguientes bacterias: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp. (Do Nascimento *et al.*, 2020). En México, este grupo de microorganismos se destaca porque son algunos de los principales agentes etiológicos de infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS) (Guevara *et al.*, 2021).

➤ ***Enterococcus faecium***

E. faecium es una bacteria Gram-positiva en forma de cocos que se disponen en pares o cadenas cortas, anaerobia facultativa, carece de flagelos, no forma esporas, fermenta la glucosa y otros carbohidratos y crece de manera óptima en un rango de temperatura de 30°C - 35 °C. Esta bacteria forma parte de la microbiota intestinal normal de humanos y animales. Los enterococos afectan principalmente a pacientes tratados con varios esquemas de antibióticos, huéspedes inmunocomprometidos, enfermos portadores de catéteres intravasculares e internados en terapia intensiva. Han sido implicados en una gran variedad de cuadros clínicos, pero en especial, están relacionados con infecciones nosocomiales, principalmente aquellas que se relacionan con el tracto urinario, infecciones intraabdominales y pélvicas, bacteriemias y septicemias (Guevara *et al.*, 2021; Herrera *et al.*, 1998).

Esta bacteria está dentro de los patógenos de prioridad alta de la lista de patógenos prioritarios de la OMS, debido a su alta resistencia a vancomicina y a que puede causar brotes a nivel hospitalario. Las cepas resistentes a vancomicina se han extendido rápidamente y ahora se detectan en varios hospitales de todo el mundo causando serios problemas. Los enterococos se vuelven resistentes a la vancomicina al adquirir los genes *vanA* y *vanB* presentes en plásmidos, los cuales permiten a las bacterias sintetizar precursores finales del peptidoglucano (polímero estructural de la pared celular) con baja afinidad para este antibiótico, de esta manera logran la resistencia (Guevara *et al.*, 2021).

➤ ***Staphylococcus aureus***

S. aureus es una bacteria Gram-positiva en forma de cocos que se agrupa en racimos, es β hemolítica, catalasa y coagulasa positiva. Esta bacteria forma parte de la microbiota normal de los seres humanos, encontrándose principalmente en la piel, en la zona nasofaríngea y otras zonas húmedas del cuerpo. Se caracteriza por generar infecciones en piel y tejidos blandos (músculos, tendones, tejidos grasos, vasos sanguíneos), osteomielitis, neumonías adquiridas en comunidad y en hospitales, y endocarditis. Afecta principalmente a pacientes después de procedimientos quirúrgicos o con dispositivos médicos como el catéter central (OPS/OMS, 2021; Pasachova *et al.*, 2019).

Las cepas más preocupantes son aquellas que tienen resistencia a meticilina (SARM), ya que se ha observado un incremento en la prevalencia de estas cepas en la comunidad, lo cual facilita su transmisión endémica y zoonótica. El producto del gen *mecA* (proteína de

unión a penicilina) le permite a la bacteria modificar su pared celular y de esta manera cambiar los blancos del antibiótico (Sánchez *et al.*, 2013).

➤ ***Klebsiella pneumoniae***

K. pneumoniae es una bacteria Gram-negativa en forma de bacilo, es anaerobia facultativa, inmóvil y usualmente encapsulada. Se encuentra de forma ubicua en el ambiente y en las superficies mucosas de mamíferos; en los seres humanos coloniza la nasofaringe y el tracto gastrointestinal. Es considerada como patógeno oportunista, ya que causa infecciones en pacientes hospitalizados o inmunodeprimidos. También es capaz de colonizar dispositivos del entorno sanitario, ya que crece de manera óptima a temperaturas entre los de 30 a 37 °C (Echeverri y Cataño, 2010; Guevara *et al.*, 2021).

K. pneumoniae es una enterobacteria de prioridad crítica, causa infecciones respiratorias, urinarias y en torrente sanguíneo, adquiridas tanto en hospitales como en la comunidad. En hospitales puede diseminarse y provocar brotes, se han aislado cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) que incluyen a las carbapenemasas. Es por esto que *K. pneumoniae* presenta alta resistencia a los antibióticos betalactámicos, que son los antibióticos más prescritos en todo el mundo (Echeverri y Cataño, 2010; Giono *et al.*, 2020).

➤ ***Acinetobacter baumannii***

A. baumannii es una bacteria Gram-negativa en forma de cocobacilo, no formadora de esporas, aerobia estricta, inmóvil, catalasa positiva y oxidasa negativa. Su temperatura óptima de crecimiento es de 20 °C a 30 °C, por lo que se puede encontrar ampliamente distribuido en la naturaleza y en el medio hospitalario. En el ser humano forma parte de la microbiota normal de la piel humana y el tracto respiratorio superior, no se considera patógeno en personas sanas. Afecta sobre todo a pacientes inmunosuprimidos y a los que se encuentran en la unidad de cuidados intensivos. *A. baumannii* es causante de múltiples infecciones nosocomiales como septicemias, neumonías, infecciones del tracto urinario, meningitis e incluso endocarditis. Hoy en día, este patógeno exhibe un alto grado de resistencia a la mayoría de los antibióticos de primera línea, como penicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación, y en muchos casos a cefalosporinas de tercera generación, aminoglucósidos y fluoroquinolonas. Incluso, recientemente se ha documentado la aparición de cepas resistentes a los carbapenémicos que hasta ahora habían constituido los antibióticos de elección para el tratamiento de infecciones por esta

bacteria (Guevara *et al.*, 2021; López y López-Brea, 2000).

➤ ***Pseudomonas aeruginosa***

P. aeruginosa es una bacteria en forma de bacilo, es Gram-negativa, aerobia (en ocasiones anaerobia facultativo), con motilidad unipolar. Este patógeno es ubicuo en el medio ambiente y puede llegar a persistir de manera eficaz en el agua y en el suelo. Puede crecer entre 20 y 43°C. En los humanos forma parte de la microbiota normal de las zonas húmedas de la piel (axilas, conducto auditivo, región perineal y mucosas), pero también es considerada como una bacteria oportunista que ocasiona altas tasas de contagio en pacientes hospitalizados, particularmente en aquellos inmunocomprometidos. Se asocia principalmente a infecciones en la sangre, los pulmones, las vías urinarias y las heridas quirúrgicas, con elevada mortalidad. Tiene la capacidad de generar resistencia a todos los antibióticos, incluyendo las nuevas moléculas. Por esta razón, está dentro del grupo "crítico" de patógenos prioritarios de la OMS cuya necesidad de nuevos antibióticos es prioritaria (Guevara *et al.*, 2021; OPS/OMS, 2021; Paz *et al.*, 2019).

➤ ***Enterobacter spp.***

Enterobacter spp. pertenece a la familia Enterobacteriaceae formada por bacterias Gram-negativas en forma de bacilos, son anaerobias facultativas que se pueden encontrar encapsuladas, se asocian comúnmente con infecciones de las vías urinarias y del tracto respiratorio, aunque también se encuentran en infecciones sanguíneas en pacientes inmunocomprometidos. *Enterobacter cloacae*, *E. coli* y *K. pneumoniae* son las bacterias más representativas de este grupo y las más comúnmente asociadas con multirresistencia a antimicrobianos. Las cepas de *Enterobacter* pueden tener resistencia a la mayoría de los betalactámicos, cefalosporinas de tercera generación e inhibidores de betalactamasas comunes: clavulanato, tazobactam y sulbactam. Hasta el momento, el empleo de colistina ha dado buenos resultados contra *Enterobacter* (Chávez-Jacobo, 2020; OMS, 2017).

2.4 ACCIONES MUNDIALES Y NACIONALES CONTRA LA RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

➤ **Principales estrategias mundiales**

• **Plan de acción mundial para el control de la resistencia a los antimicrobianos**

Ante la crisis generada por el aumento de la resistencia a los antibióticos, en el 2015 la Asamblea Mundial de la Salud estableció el "Plan de acción mundial para el control de

la resistencia a los antimicrobianos”, el cual tiene la meta de garantizar el tratamiento y la prevención de enfermedades infecciosas con medicamentos seguros, eficaces y de calidad. Dicho plan consta de 5 objetivos 1) Implementar la concientización y comprensión de la problemática de resistencia a los antimicrobianos, 2) Reforzar los conocimientos y la base científica a través de la vigilancia y la investigación, 3) Prevenir infecciones tomando medidas eficaces de higiene y saneamiento, 4) Fomentar el uso racional de los antimicrobianos y 5) Incrementar la inversión en nuevos medicamentos, medios de diagnóstico, vacunas y otras estrategias. A su vez, la OMS hizo un llamado para que todos los países establezcan un plan nacional contra esta problemática, apegándose a los objetivos de su plan de acción mundial (OMS, 2016).

- **Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (GLASS)**

Debido a que la vigilancia es una herramienta necesaria para el control y prevención de infecciones, así como para la evaluación de la propagación de la RAM, en octubre del 2015 la OMS instauró el “Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (GLASS, por sus siglas en inglés)”, con el cual se aspira a poder incorporar de forma progresiva datos procedentes de la vigilancia de la RAM en los seres humanos, la vigilancia del uso de los antimicrobianos, y la resistencia a los antimicrobianos en la cadena alimentaria y el medio ambiente. También se busca hacer posible la obtención, análisis e intercambio entre países de datos normalizados, comparables y validados sobre la resistencia a los antimicrobianos, con los cuales se podrán fundamentar procesos decisorios, impulsar las actividades locales, nacionales y regionales y aportar la base empírica necesaria para adoptar medidas y realizar labores de sensibilización sobre la resistencia los antimicrobianos (OMS, 2017, 2020, 2022).

- **Lista de patógenos prioritarios de la OMS**

Por otro lado, en febrero del 2017 la OMS publicó una lista de bacterias denominadas “patógenos prioritarios”, en la que se incluyen las 12 bacterias más peligrosas para la salud humana (Figura 11). Dichas bacterias se escogieron siguiendo ciertos criterios como: el grado de letalidad de las infecciones que provocan, la frecuencia con que presentan resistencia a los antibióticos existentes cuando infectan a las personas de las comunidades, la facilidad con la que se transmiten entre animales, de animales a personas y entre personas, cuántas opciones terapéuticas quedan y si se están investigando y desarrollando nuevos antibióticos para tratar las infecciones que causan.

Esta lista se elaboró con el objetivo de tratar de guiar y promover la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos, como parte de las actividades de la OMS para combatir el creciente problema mundial de la resistencia a los antimicrobianos (OMS, 2017; OMS, 2020).

Esta lista se clasifica en tres categorías de acuerdo con la urgencia en que se necesitan nuevos antibióticos para tratar las infecciones que las bacterias causan: prioridad crítica, alta o media. Los patógenos incluidos en la prioridad crítica incluye las bacterias multirresistentes que son peligrosas en hospitales, asilos y entre los pacientes que necesitan ser atendidos con dispositivos médicos. Por otro lado, los patógenos de prioridad alta y media contienen exhiben una farmacorresistencia creciente (OMS, 2017). En esta lista se encuentran las bacterias ESKAPE.

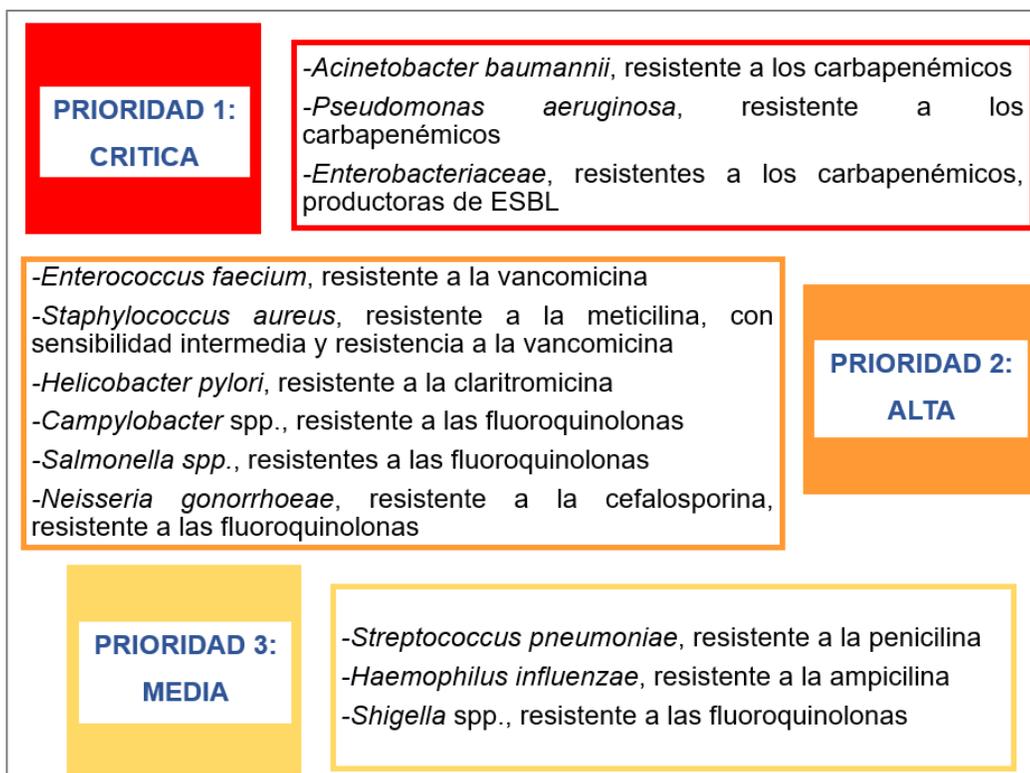


Figura 11. Lista de patógenos prioritarios establecidos por la OMS en el 2017.

- **Semana Mundial de Concienciación sobre el Uso de los Antimicrobianos**

Celebrada anualmente desde 2015, del 18 al 24 de noviembre, la “Semana Mundial de la Concienciación sobre el Uso de los Antimicrobianos” es una campaña mundial que tiene como objetivo aumentar la concienciación sobre la RAM y fomentar las mejores

prácticas entre el público en general, los trabajadores de la salud, los profesionales de la sanidad animal, los profesionales en salud agrícola y los responsables políticos, para evitar la aparición y propagación de infecciones resistentes a los antimicrobianos (OMS, 2020; OPS, 2021). El lema de este movimiento es “Antimicrobianos: manéjalos con cuidado” (Figura 12).



Figura 12. Lema general de la semana mundial de la concienciación sobre el uso de los antimicrobianos.

➤ Principales estrategias nacionales

- **Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos**

En respuesta a las peticiones de la OMS para el combate contra la resistencia antimicrobiana, en el 2018 el gobierno mexicano publicó en el Diario Oficial de la Federación el Acuerdo por el que se declara la obligatoriedad de la Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos. Dicha estrategia involucra el trabajo de colaboración intersecretarial con el fin de que en el país se haga un uso racional de antimicrobianos para la salud humana, salud animal y en los cultivos, con el objetivo de reducir la diseminación de la RAM en los diferentes sectores de salud pública, agricultura y medio ambiente (SEGOB, 2018).

- **Plan Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana (PUCRA)**

Por su parte, también en el 2018, la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), a través del Programa Universitario de Investigación en Salud (PUIS), instauró el Plan Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana (PUCRA). Este plan establece un red para generar información sobre el estado actual de la resistencia antimicrobiana en nuestro país, considerando la salud humana y animal, así como la del medio ambiente, buscando que de esta manera se genere un espacio de análisis y reflexión técnica especializada que permita proponer estrategias para contrarrestar el avance de

la resistencia antimicrobiana en los próximos años (Programa Universitario de Investigación en Salud, 2018).

- **Declaración para el Control de la Resistencia Antimicrobiana CDMX 2021**

Recientemente, se dio a conocer la Declaración para el Control de la Resistencia Antimicrobiana CDMX 2021, la cual señala la importancia de contar con acciones a nivel local y nacional en las que participen todos los sectores del gobierno, establecer planes y calendarizar metas con indicadores verificables para los próximos tres años, con una primera meta: alcanzar una disminución del consumo de antimicrobianos en un 30% al cabo de 2024 (Plan Universitario de Control a la Resistencia Antimicrobiana (PUCRA), 2021).

2.5 BÚSQUEDA DE NUEVOS COMPUESTOS ANTIBIÓTICOS

La creciente problemática de la resistencia a los antibióticos plantea una grave amenaza para la salud pública. Es bien conocido que la tasa de aparición de cepas resistentes es mucho mayor que el desarrollo de nuevos antimicrobianos. Si esta situación continúa entraremos en una era similar a cuando no había antibióticos (Ali *et al.*, 2018). Por lo tanto, es de suma importancia encontrar nuevos compuestos con actividad antibacteriana para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por bacterias multirresistentes.

A pesar de la creciente popularidad del diseño antimicrobiano sintético, la naturaleza sigue siendo una fuente valiosa para el descubrimiento de nuevos compuestos activos. Los productos naturales son producidos por células, ya sea como metabolitos primarios que están involucrados en el crecimiento, desarrollo y reproducción, o como metabolitos secundarios que no están directamente involucrados en estos procesos, pero que tienen una función importante como la defensa y comunicación. La mayoría de los fármacos se han obtenido a partir de metabolitos secundarios de plantas, hongos, bacterias y organismos marinos. Estas moléculas naturales son generalmente complejas y constituyen más de la mitad de todos los medicamentos utilizados clínicamente (Ali *et al.*, 2018; Verpoorte, 1998; Wink, 2003).

De todos los antimicrobianos actualmente en el mercado, el 69 % se deriva de un compuesto natural, de los cuales, el 97 % es de origen microbiano. Los productos naturales parecen resistir la prueba del tiempo cuando se trata del desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos. La búsqueda de nuevos compuestos antibióticos que se originen a partir de fuentes inusuales y naturales generará pistas útiles en la identificación de nuevos fármacos que puedan utilizarse

contra patógenos bacterianos cada vez más resistentes (Van Moll *et al.*, 2021).

Algunas de las fuentes inusuales que se están explorando en la actualidad son: compuestos producidos por plantas y sus derivados, compuestos presentes en venenos de animales, compuestos producidos por bacterias marinas y de ambientes extremos, compuestos producidos por animales y compuestos producidos por la microbiota asociada a animales.

➤ **Compuestos producidos por la microbiota asociada a animales**

Los microorganismos se involucran en una multitud de interacciones simbióticas con los animales, que van desde relaciones mutualistas hasta relaciones parasitarias. La mayoría de los microorganismos simbióticos tienen un efecto positivo sobre el hospedero, principalmente a través de la nutrición y/o la defensa (Engel & Moran, 2013; Krishnan *et al.*, 2014). Por lo cual, en muchos estudios se ha reportado que la microbiota de los animales que viven en diferentes tipos de ambientes pueden producir sustancias para inhibir las infecciones bacterianas o fúngicas, tal es el caso del gusano de la hoja de algodón (*Spodoptera littoralis*) el cual puede ser colonizado por la bacteria *Enterococcus faecalis* y causar infecciones e inhibir el desarrollo larval, pero la especie *Enterococcus mundtii* presente en la microbiota intestinal de este insecto puede competir eficazmente con este patógeno y suprimirlo, tanto in vivo como in vitro (Shao *et al.*, 2017). También se han aislado cepas del género *Bacillus* de la microbiota de la termita productora de hongos *Odontotermes formosanus* que tienen actividad antifúngica contra *Trichoderma harzianum*, el cual afecta el crecimiento de sus cultivos del hongo *Termitomyces* (Mathew *et al.*, 2012). Con el objetivo de explorar e identificar microorganismos con capacidades antibióticas que pudieran utilizarse contra bacterias patógenas humanas se han explorado distintos sistemas biológicos por ejemplo, se ha estudiado la microbiota de la piel de anfibios como *Phyllomedusa distinta* en donde se han identificado bacterias pertenecientes a los géneros *Serratia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Enterobacter* con actividad antibacteriana contra *M. luteus*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. enterica*, *A. hydrophila* y *E. coli*. Otro ejemplo interesante es el estudio de la microbiota intestinal de las cucarachas *Gromphadorhina portentosa* y *Blattella germanica*, en donde observaron que las bacterias simbiotas *Serratia marcescens*, *E. coli*, *Klebsiella sp.*, y *Streptococcus sp.*, poseen actividad contra bacterias Gram-positivas (*S. aureus* SARM, *S. pyogenes*, *B. cereus*) y Gram-negativas (*E. coli* K1, *S. enterica*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*) (Akbar *et al.*, 2018).

3. ANTECEDENTES

3.1 IMPORTANCIA DE LA MICROBIOTA DE LOS INSECTOS

Los insectos representan el grupo más exitoso de animales, tanto en términos de diversidad como de supervivencia (Engel y Moran, 2013). Tan solo en México existen alrededor de 48 mil especies de insectos, lo cual equivale al 5.2% del total de la biodiversidad de insectos a nivel mundial (CONABIO, 2020). Parte del éxito evolutivo y ecológico de los insectos se atribuye a las bacterias y hongos asociados a ellos, los cuales amplían sus capacidades metabólicas y/o les permiten resistir estrés o parasitosis (Poveda, 2019). Los microorganismos colonizan diferentes partes de los insectos, como el exoesqueleto, el intestino, el hemocele e incluso las células. Los microorganismos asociados juegan un papel muy importante en todas las etapas del desarrollo de los insectos (Van Moll *et al.*, 2021). Por ejemplo, las avispas solitarias requieren de la bacteria *Streptomyces* para la protección de sus pupas en las cámaras de cría; de igual forma, esta bacteria ayuda a proteger los recursos nutricionales del insecto (Van Arnam *et al.* 2018). Asimismo, la comunidad microbiana nativa ayuda a reducir la colonización de los insectos por entomopatógenos.

En artículos recientes se destaca la importancia de la microbiota de insectos como fuente de nuevos antibacterianos. Por ejemplo, Chevrette y colaboradores (2019) reportaron que cepas de *Streptomyces* aisladas de la hormiga *Cyphomyrmex sp.* producen antimicrobianos que no producen cepas de *Streptomyces* aisladas del suelo o de plantas (Chevrette *et al.*, 2019). Esto nos muestra la especialización de los microorganismos de acuerdo al nicho ecológico que exploran. Asimismo, se ha reportado que bacterias asociadas a otros insectos, como termitas y abejas, tienen la capacidad de producir compuestos con actividad antimicrobiana (Menegatti *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020).

3.2 IMPORTANCIA DE LAS BACTERIAS SIMBIONTES EN LAS HORMIGAS

Las hormigas son insectos sociales, viven en colonias dentro de las cuales es posible distinguir una casta obrera y una reproductora. En México, es posible encontrar hormigas en prácticamente todos los ecosistemas y hábitats. Sin embargo, aún no se sabe con certeza cuántas especies hay, ni la distribución exacta en el país, ya que existen muchos sitios aún inexplorados, o bien, existen ejemplares colectados pero que no se ha podido identificar su especie. Se tiene un estimado de que en México existen 973 especies de hormigas, lo cual es

equivalente al 8% del total mundial. Es común decir que las hormigas son organismos del suelo; sin embargo, de manera secundaria, una gran cantidad de hormigas están adaptadas a la vida arbórea, viviendo en troncos, ramas, o cavidades subcorticales (Ríos, 2014).

Al ser organismos sociales, requieren de sistemas de protección para defenderse de agentes peligrosos para tanto para los individuos como para la colonia. Uno de estos sistemas de protección son las relaciones simbióticas con microorganismos, ya sea para complementar funciones nutritivas, de desarrollo o de defensa (Engel y Moran, 2013; Moreau, 2020). Estas interacciones van desde mutualistas a parasitarias, con varios casos de manipulación del comportamiento del huésped (Moreau, 2020). Las relaciones simbióticas de las hormigas se pueden dar con microorganismos eucariotas, hongos, virus y bacterias. Sin embargo, en la literatura podemos encontrar más reportes de asociaciones bacterianas que de otros microorganismos con las hormigas. Las bacterias simbiotas encuentran en diversas partes de la hormiga, como en el exoesqueleto, boca, órganos reproductores y todos los compartimentos del tracto digestivo (Poveda, 2019). Unas de las bacterias que más se ha documentado su presencia en hormigas son las del género *Wolbachia*, pero su función dentro de estos insectos no ha quedado del todo clara (Moreau, 2020). Ponteri y colaboradores (2017) sugirieron que esta bacteria puede influir en la distribución de sexos en las hormigas, pero esto solo se ha documentado en una especie, *Monomorium pharaonis*. Bacterias del género *Blochmannia*, que se alojan en bacteriocitos asociados al intestino medio de la hormiga carpintera (de la tribu Camponotini), son importantes para proveer aminoácidos esenciales y no esenciales (como fenilalanina y tirosina, respectivamente) a su hospedero, ya que se cree que estas hormigas tienen una dieta pobre en nitrógeno (Feldhaar *et al.*, 2007; Moreau, 2020). Asimismo, la bacteria *Serratia marcescens* presente en la microbiota de *Atta sexdens rubropilosa* es capaz de producir pirazinas que el insecto utiliza para demarcar su camino hasta el nido (Silva-Junior *et al.*, 2018). En diversos artículos también se han reportado bacterias asociadas a hormigas con propiedades antimicrobianas, en primera instancia tenemos a las bacterias del género *Pseudonocardia* y *Amycolatopsis*, las cuales tienen función de defensa contra el hongo parásito *Escovopsis* (Little y Currie, 2007). *S. marcescens* tiene un papel en la protección de las colonias de la hormiga arriera *Atta cephalotes*, ya que inhibe el crecimiento y altera la función de los hongos entomopatógenos (*Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*) y micopatógenos (*Trichoderma harzianum*) (Ortiz, 2013).

De igual forma, en la literatura podemos encontrar diversos compuestos antimicrobianos que se han aislado de cepas bacterianas provenientes de hormigas de distintos géneros (Tabla 2)

(Van Moll *et al.*, 2021; Xie *et al.*, 2019). La mayoría de estos compuestos presentan actividad contra hongos entomopatógenos y contra hongos patógenos resistentes a múltiples fármacos. Estos hallazgos nos pueden dar una idea de la diversidad de microorganismos y compuestos que podemos encontrar al estudiar estos insectos.

Tabla 2. Compuestos con actividad antimicrobiana aislados de cepas simbiotes de hormigas.

Compuesto	Clasificación estructural	Actividad contra	Cepa bacteriana de la que fue aislado	Hormiga hospedera
Cifomicina	Macrólido	- <i>Candida albicans</i> - <i>Candida glabrata</i> - <i>Candida auris</i> - <i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Cyphomyrmex</i> sp.
<i>Dentigerumicina</i>	Policétido-péptido	- <i>Escovopsis</i> sp. - <i>Candia albicans</i>	<i>Pseudonocardia</i> sp.	<i>Apterostigma dentigerum</i>
<i>Selvamicina</i>	Polieno	- <i>Candida albicans</i> - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> - <i>Aspergillus fumigatus</i> - <i>Trichoderma harzianum</i>		
Canducidina	Macrólido	- <i>Candida albicans</i> , - <i>Escovopsis</i> sp.	<i>Streptomyces griceus</i>	<i>Acromyrmex octospinosus</i>

3.3 MICROBIOTA DE *Comadia redtenbacheri*

C. redtenbacheri es un lepidóptero de la familia Cossidae. Las principales especies hospedantes de *C. redtenbacheri* son los magueyes pulqueros *Agave salmiana*, *Agave mapisaga* y *Agave atrovirens*. Las hembras de *C. redtenbacheri* ovipositan masas de huevos

en la base de las hojas del agave y el periodo de incubación es 30 a 35 días. Después de la eclosión, las larvas se establecen en el rizoma del agave donde completan su desarrollo. Las larvas de *C. redtenbacheri*, llamada gusano rojo del maguey, son de color rojizo, con una longitud de hasta 5 cm y son de hábitos endófitos. Son consideradas como una plaga que ataca al maguey ya que, durante la temporada de lluvias, roen los tallos y horadan las hojas para poder alcanzar el interior de estas plantas (Delgado *et al.*, 2017). El gusano rojo del maguey es un insecto importante en México, como una valiosa fuente de alimento. A pesar de la importancia económica que tienen las larvas de *C. redtenbacheri*, existen muy pocos reportes a cerca de las comunidades bacterianas que forman parte de la microbiota de estos insectos, lo cual debería ser conveniente estudiar más a fondo ya que estas larvas se utilizan para el consumo humano.

No obstante, en uno de los primeros trabajos realizados para estudiar las bacterias cultivables externas e internas presentes en las larvas de *C. redtenbacheri*, se encontró que bacterias como *Paenibacillus* sp., *Bacillus safensis*, *Pseudomonas* sp., *Bacillus pseudomyoides*, *Corynebacterium variabile*, *Enterococcus* sp., *Gordonia* sp., *Acinetobacter calcoaceticus*, *Arthrobacter* sp., *Micrococcus* sp. y *Bacillus cereus*, forman parte de la microbiota de este insecto (Hernández *et al.*, 2015). Hasta al momento, no existen reportes respecto a compuestos con actividad antimicrobiana producidos por cepas bacteriana proveniente de la microbiota de la larva de *C. redtenbacheri*.

Con base a lo anterior, en nuestro proyecto nos planteamos identificar bacterias que inhiban el crecimiento o maten a bacterias ESKAPE. Para esto analizamos una colección de 59 cepas de distintas especies bacterianas que fueron aisladas por el grupo de la Dra. María Esperanza Martínez Romero, investigadora del CCG / UNAM, a partir de la microbiota del gusano del maguey *C. redtenbacheri*. Asimismo, aislamos y analizamos bacterias de la hormiga *A. mexicana*. Con esto, evaluamos la factibilidad de utilizar estos insectos nativos de México como fuente para la identificación de nuevos antibióticos contra patógenos prioritarios establecidos por la OMS.

4. JUSTIFICACIÓN

La resistencia a los antibióticos es una gran amenaza para la salud. Por esta razón es urgente el desarrollo de nuevos antimicrobianos, en especial antibióticos contra las bacterias ESKAPE. Diferentes estudios han mostrado que la microbiota de insectos representa una fuente diversa para la identificación de nuevos antimicrobianos. Sin embargo, aún queda mucho que investigar sobre dicho potencial. Con el fin de aportar al control de la problemática mencionada, nos planteamos analizar si la microbiota de insectos nativos de México representa una fuente importante, y tal vez con propiedades únicas, para la identificación de nuevos antibióticos contra bacterias ESKAPE.

5. HIPÓTESIS

Bacterias de la microbiota de insectos nativos de México representan una fuente con gran potencial para la identificación de nuevos antibióticos contra bacterias ESKAPE.

6. OBJETIVO GENERAL

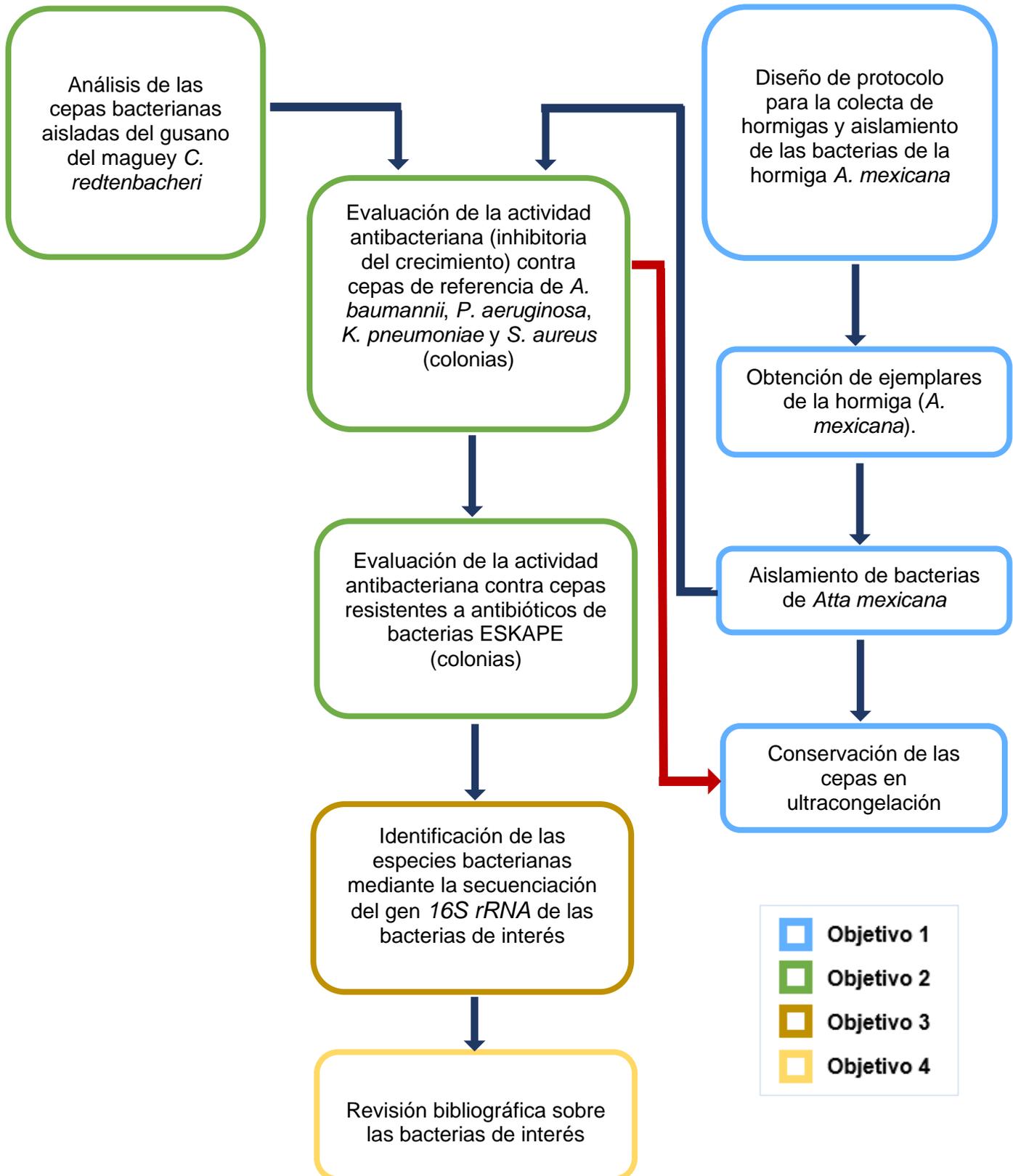
Identificar bacterias provenientes de la microbiota de insectos nativos de México que inhiban el crecimiento o maten a bacterias ESKAPE (*A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *S. aureus*).

6.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar un método de aislamiento de bacterias de la microbiota de la hormiga *Atta mexicana*.
2. Analizar la actividad antibacteriana (inhibitoria del crecimiento) de bacterias aisladas del gusano del maguey (*C. redtenbacheri*) y de la hormiga chicatana (*Atta mexicana*) contra cepas referencia y cepas resistentes a antibióticos de *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *S. aureus*.
3. Identificar las especies de las bacterias que muestren actividad antibacteriana contra los patógenos prioritarios analizados.
4. Revisar si existen reportes sobre la producción de antibacterianos de las bacterias identificadas en nuestro estudio.

7. METODOLOGIA

7.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



7.2 MATERIALES Y MÉTODOS

7.2.1. CEPAS EMPLEADAS EN LOS ENSAYOS DE ACTIVIDAD INHIBITORIA

La actividad inhibitoria de crecimiento de las cepas aisladas de la microbiota de *C. redtenbacheri* y de *A. mexicana* fue evaluada inicialmente contra las cepas patógenas de referencia: *A. baumannii* ATCC 17978, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S. aureus* ATCC 29213. Posteriormente, seleccionamos algunas cepas (basándonos en la apariencia del halo de inhibición) que mostraron actividad antibacteriana contra las cepas patógenas de referencia antes mencionadas y probamos su actividad contra aislados clínicos resistentes a antibióticos (Tabla 3). Como control positivo de actividad antibacteriana se usó el compuesto CinnAcar, el cual es un extracto de canela (*Cinnamomun zeylanicum*) que tiene efecto antibacteriano de amplio espectro.

Tabla 3. Aislamientos clínicos con resistencia a antibióticos utilizados en los ensayos de difusión en colonia.

Aislamiento clínico		Resistencia a antibióticos
<i>A. baumannii</i>	A797 MDR	AK, GEN, CAZ, FEP, CIP, DOR, IMP, MEM, COL, AMP
	A801 MDR	CAZ, FEP, CIP, DOR, IMP, MEM
	A805 MDR	GEN, CAZ, FEP, CIP
	A822 MDR	CAZ, FEP, IMP, MEM, AMP
<i>P. aeruginosa</i>	17-3375 MDR	
	P1165 XDR	
	P1473 MDR	AK, GEN, AZT, CAZ, FEP, CIP, LVX, DOR, IMP, MEM
	P1483 MDR	AK, CAZ, CIP, DOR, FEP, GEN, IMP, LVX, MEM, TZP
<i>S. aureus</i>	6N3 SARM	MET
	18F1 SARM	MET
	24N2A MDR	PEN, TRA, ERT, CLIN, GEN
	17N3A MDR	PEN, ERT, CLIN

AK: amikacina/ **AMP:** ampicilina/ **AZT:** aztreonam/ **CAZ:** ceftazidima /**CIP:** ciprofloxacina/ **CLIN:** clindamicina/ **COL:** colistina/ **DOR:** doripenem/ **ERT:** eritromicina/ **FEP:** cefepime / **GEN:** gentamicina/ **IMP:** imipenem / **LVX:** levofloxacina / **MEM:** meropenem/ **MET:** metilicina/ **PEN:** penicilina/ **TRA:** tetraciclina/ **TZP:** tazobactam + piperacilina

7.2.2 OBTENCION DE EJEMPLARES DE LA HORMIGA *Atta mexicana*

➤ Colecta de hormigas

Para obtener ejemplares de la hormiga *A. mexicana* se realizaron cuatro colectas en diferentes ubicaciones (Tabla 4). Estos insectos fueron colectados usando pinzas estériles y depositados en frascos de vidrio previamente esterilizados y etiquetados. Se procuró capturar ejemplares de distintos tamaños de un mismo hormiguero.

Tabla 4. Ubicación de las colectas realizadas y número de especímenes capturados por colecta

Lugar de colecta	Coordenadas	Fecha de colecta	No. de especímenes colectados
San Andrés de la Cal, Tepoztlán Morelos	18.963493,-99.114338	14/03/2022	2 hormigas soldado
Flores Magón, Cuernavaca Morelos.	18.926754,- 99.192018	20/03/2022	17 hormigas soldado y obreras
El Limón de Cuauchichinola, Tepalcingo Morelos	18.543430410502914, - 98.9335296794041	14/05/2022	17 hormigas soldado y obreras
Lomas de Chamilpa, Cuernavaca Morelos	18.985683227255993, - 99.24207595806423	07/07/2022	3 hormigas reina

➤ Identificación de la especie de las hormigas colectadas

Para confirmar la especie de las hormigas colectadas inicialmente hicimos uso de la página de internet [antweb](http://antweb.org), la cual alberga imágenes, registros de especímenes e información sobre la historia natural de distintas especies de hormigas. Así mismo, contamos con el apoyo del Dr. Víctor Hugo Toledo Hernández, quien es investigador del Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación (CIByC) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) y es un experto entomólogo.

Posterior a la identificación, los especímenes fueron almacenados a 4°C por un tiempo no excedente a más de 5 días, para que las hormigas entraran en un proceso de letargo.

7.2.3. AISLAMIENTO DE LAS BACTERIAS DE LA MICROBIOTA DE *Atta mexicana*

Para el aislamiento de la microbiota de las hormigas de *A. mexicana* se siguió el protocolo establecido por Chevrette y colaboradores (2019) (aplicando algunas modificaciones) para el “procesamiento y aislamiento bacteriano”.

➤ Medios de cultivo utilizados

Para el aislamiento de la microbiota de las hormigas se utilizaron siete medios de cultivo distintos (Tabla 5), a los cuales se le adicionó el antifúngico nistatina a una concentración final de 20 µg/ml (Anexo 1 y 2).

Tabla 5. Medios de cultivo utilizados para el aislamiento de la microbiota de la hormiga *A. mexicana*.

Medio de cultivo
Agar extracto de levadura y peptona (PY)
Agar Lysogeny Broth (LB)
Agar Tripteína de Soya (TSA)
Agar MacConkey
Agar Sal Manitol
Agar <i>Pseudomonas</i>
Agar <i>Streptomyces</i>

➤ Aislamiento de la microbiota externa

Inicialmente se analizaron grupos de tres hormigas, cada grupo se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml. (para hormigas soldado u obreras) o en un tubo Falcon de 15 ml (para hormigas reina). Para el aislamiento de la microbiota externa, a cada tubo (eppendorf o Falcon) se le agregó 1 ml de PBS al 1X; posteriormente, los tubos con las hormigas se agitaron suavemente en el vortex (al 50% de velocidad) por 10 segundos. Luego se realizaron diluciones 1:10 de la mezcla original agregando 100 µl de la suspensión del paso anterior (suspensión madre) a un tubo eppendorf con 900 µl de PBS, hasta llegar a la dilución 10^{-3} . Se transfirieron 100 µL de la solución que contenía a las hormigas a cada una de las cajas con medio de cultivo a inocular y se esparció uniformemente por toda la caja con ayuda de perlitas de vidrio. Posteriormente, se

retiraron las perlitas y se dejó secar la caja por 15 minutos. Por último, las cajas se incubaron por 24 horas a 30°C.

➤ **Esterilización superficial**

Después de sembrar los aislamientos externos, se realizó un lavado de esterilización para aislar la microbiota interna. Para esto, el mismo tubo (eppendorf o Falcon) de donde se aisló la microbiota externa se llenó con 1 ml de etanol al 70 % y se mezcló suavemente por inversión durante 1 min. Se eliminó el desecho de etanol y se agregó 1 ml de cloro al 1% con solución de tween 20 al 0,1% y se mezcló suavemente por inversión durante 30 segundos. Se eliminó el sobrenadante y la muestra se enjuagó 5 veces con 1 ml de PBS 1X, mezclando por inversión durante 10 segundos. Al final, se retiró todo el excedente de PBS.

➤ **Aislamiento de la microbiota interna**

Después de la esterilización externa se añadió al tubo 1ml de PBS 1X. Después, la muestra se trituró utilizando puntas de micropipeta (de capacidad 1000 µL) estériles hasta obtener una mezcla semi-homogénea. Luego, se realizaron diluciones 1:10 de la mezcla agregando 100 µl de la suspensión del paso anterior (suspensión madre) a un tubo eppendorf con 900 µl de PBS, hasta llegar a la dilución 10^{-3} . Posteriormente, se inocularon 100 µl de cada dilución a cada una de las cajas con medio de cultivo y se esparció la muestra uniformemente por toda la caja con ayuda de perlitas de vidrio. Se retiraron las perlitas de las cajas y se dejaron secar por 15 minutos. Para finalizar, las cajas se incubaron por 24 horas a 30°C.

➤ **Aislamiento de las colonias bacterianas**

Después de las 24 horas de incubación se examinaron las cajas y se seleccionaron colonias bacterianas con base a su morfología (color, forma, tamaño, tipo de bordes y consistencia). Solo se eligieron colonias que estuvieran separadas.

Posteriormente, con un palillo estéril se tomó cuidadosamente una pequeña cantidad de la colonia bacteriana y se inoculó realizando una pequeña línea en un cuadrante de una nueva caja del medio de cultivo correspondiente. Se realizó el mismo procedimiento con todas las colonias seleccionadas. Todas las cajas se incubaron por 24 horas a 30°C y posteriormente éstas se almacenaron a 4°C para poder utilizarlas en los ensayos posteriores.

7.2.4. OBTENCIÓN DE LAS BACTERIAS DE LA MICROBIOTA DEL GUSANO DEL MAGUEY *C. redtenbacheri*

Las cepas bacterianas provenientes de la microbiota intestinal del gusano del maguey que se analizaron en este estudio fueron proporcionadas por el grupo de la Dra. María Esperanza Martínez Romero, investigadora del Centro de Ciencias Genómicas (CCG).

Se analizaron 59 cepas, las cuales fueron cultivadas en cajas de agar PY y LB. En nuestro laboratorio se prepararon stocks en glicerol de todas estas cepas bacterianas (cepas productoras), los cuales fueron almacenados a -70°C para poder utilizarlas en los ensayos posteriores.

7.2.5. ENSAYOS DE DIFUSIÓN PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Se realizó el método de difusión en colonia para evaluar la actividad antibacteriana de las cepas del gusano del maguey (*C. redtenbacheri*) y la hormiga (*A. mexicana*) contra cepas patógenas de referencia y contra cepas de aislamientos clínicos resistentes a antibióticos.

➤ Preparación de preinóculos

Se prepararon preinóculos de las cepas bacterianas a evaluar (cepas productoras) en 5 ml de LB y PY (según corresponda). Los preinóculos de las cepas a evaluar se incubaron por 24 horas a la temperatura correspondiente (37°C y 30°C). También se prepararon preinóculos con 5 ml de medio líquido LB de las cuatro cepas patógenas de referencia: *A. baumannii* ATCC 17978, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S. aureus* ATCC 2921; y de aislamientos clínicos de patógenos resistentes a antibióticos (Tabla 3) (cepas césped) que se incubaron a 37°C por 16 horas en agitación.

➤ Preparación del césped bacteriano

Con los preinóculos crecidos durante toda la noche de las cepas césped se realizaron nuevos cultivos realizando una dilución 1:50 en medio líquido LB (1 ml del preinóculo + 49 ml de medio líquido LB). Estos nuevos cultivos se pusieron a incubar a 37°C en agitación hasta alcanzar una D.O._{600nm} de 0.6 (~1X10⁹ bacterias / ml). Posteriormente, se agregaron 5 ml de cultivo césped a las cajas con agar LB o PY (dependiendo del medio en el que crezca la cepa productora), el cultivo se esparció uniformemente en la caja y se dejó incubando durante 3 min para que bacterias de la suspensión se quedaran adheridas al agar LB o PY. El exceso de la suspensión

bacteriana se retiró con una pipeta estéril de 5 ml y se dejaron secando las cajas abiertas en la campana de flujo laminar durante 20 min.

➤ **Preparación de las cepas productoras**

Los preinóculos de las cepas productoras crecidos por 24 horas se concentraron. Para esto se colocó 1.5 ml del preinóculo en un tubo eppendorf estéril y se centrifugó a 3 min a 13,000 rpm, posteriormente se retiró el sobrenadante, la pastilla se resuspendió con 50 μ l de LB líquido. Finalmente, se realizó la inoculación de 10 μ l de la suspensión de las cepas productoras sobre el tapete de las cepas césped en las cajas de agar. Como control positivo de inhibición bacteriana se utilizó 3 μ l del extracto de canela CinnAcar (*Cinnamomun zeylanicum*). Las cajas se incubaron a la temperatura correspondiente (37°C o 30°C).

7.2.6. IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES BACTERIANAS MEDIANTE LA SECUENCIACION DEL GEN 16S rRNA.

Para la identificación de las especies de las bacterias de interés, primero realizamos la extracción del ADN total, utilizando el kit *GenElute™ Bacterial Genomic DNA* de la marca Sigma-Aldrich (Anexo 3).

Al finalizar el aislamiento del ADN, éste se cuantificó por nanodrop y mediante un gel de agarosa al 1% se observó su integridad. Posteriormente se realizó una amplificación por PCR del gen 16S rRNA, usando los oligos: 16S-fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 16S-rP2 (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'), en las condiciones que se muestran en la tabla 6. Después, los productos de PCR se observaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, para asegurar la presencia de un amplicón del tamaño adecuado. Luego, los productos de PCR se purificaron utilizando el kit *DNA Clean and Concentrator* de la marca *Zymo Research* (Anexo 4) y nuevamente se cuantificó la concentración de DNA por nanodrop. Posteriormente, las muestras se mandaron a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología, UNAM. Una vez obtenida la secuencia, los cromatogramas se analizaron y editaron utilizando el programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*. Finalmente, las secuencias se compararon con las secuencias del gen 16S rRNA depositadas en bases de datos (*Nucleotide BLAST* de *NCBI* y *16S-based ID* de *EzBioCloud*). Para determinar el taxon de mayor similitud de cada una de las secuencias de las cepas identificadas, en cada base de datos tomamos en cuenta aquella secuencia que tuviera el mayor porcentaje de identidad.

Tabla 6. Condiciones del termociclador para realizar la amplificación por PCR del gen *16S rRNA*.

Número de ciclos	Etapa	Temperatura	Tiempo
1 ciclo	Desnaturalización inicial	95°C	5 minutos
35 ciclos	Desnaturalización	95°C	1 minuto
	Alineamiento	55°C	30 segundos
	Extensión	72°C	1 minuto 40 segundos
1 ciclo	Extensión final	72°C	5 minutos

8. RESULTADOS

8.1 Análisis de la actividad antibacteriana de cepas bacterianas aisladas del gusano de maguey *C. redtenbacheri*

Se analizó la actividad antibacteriana de un total de 59 cepas bacterianas aisladas de la microbiota intestinal del gusano del maguey *C. redtenbacheri*, contra cuatro cepas patógenas de referencia (*A. baumannii* ATCC 17978, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S. aureus* ATCC 29213), a dos temperaturas distintas (30°C y 37°C). Un total de 20 cepas aisladas de *C. redtenbacheri* mostraron actividad inhibitoria del crecimiento contra al menos una de las cepas patógenas de referencia (Tabla 7); el 90% (n=18) tuvieron actividad exclusivamente a 37°C, el 10% (n=2) a ambas temperaturas y ninguna cepa tuvo actividad única a 30°C (Gráfica 1).

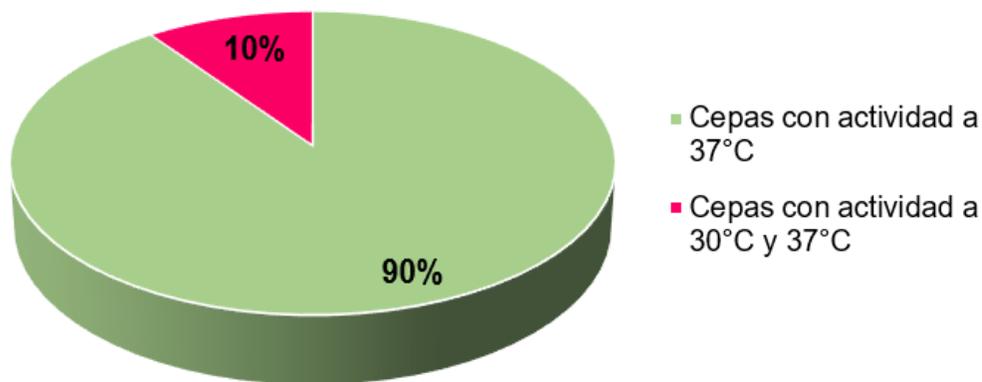
Tabla 7. Cepas del gusano del maguey *C. redtenbacheri* con actividad antibacteriana frente a cepas patógenas de referencia

Cepas productoras	Bacterias patógenas				Temperatura de actividad
	<i>A. baumannii</i> ATCC 17978	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	
<i>Staphylococcus vitulinus</i>	-	-	+	-	37°C
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	-	-	+	-	37°C
<i>Enterococcus canintestini</i>	-	-	+	-	37°C
EM L3-9	-	-	+	-	37°C
EM L2-11	-	-	+	-	37°C
EM HDA-Hm1	-	-	+	-	37°C
<i>Arthrobacter nicotianae</i>	-	-	+	-	37°C
<i>Bacillus litoralis</i>	-	-	+	-	37°C
<i>Brevudimonas vesicularis</i>	-	-	+	-	37°C

EM OMRF	-	-	+	-	37°C
EM L2-9	-	-	+	-	37°C
<i>Enterococcus mundtii</i>	-	-	+	-	37°C
EM L2-2	-	-	+	-	37°C
EM B3	-	-	+	-	37°C
EM KMRF	-	-	-	+	37°C
EM B7	-	-	-	+	37°C
EM I2-2	-	+	-	+	37°C
EM I6-1	-	+*	-	+*	30°C y 37°C
EM I7-1	-	+*	+	+*	30°C y 37°C
<i>Bacillus velezensis</i>	+	-	+	+	37°C

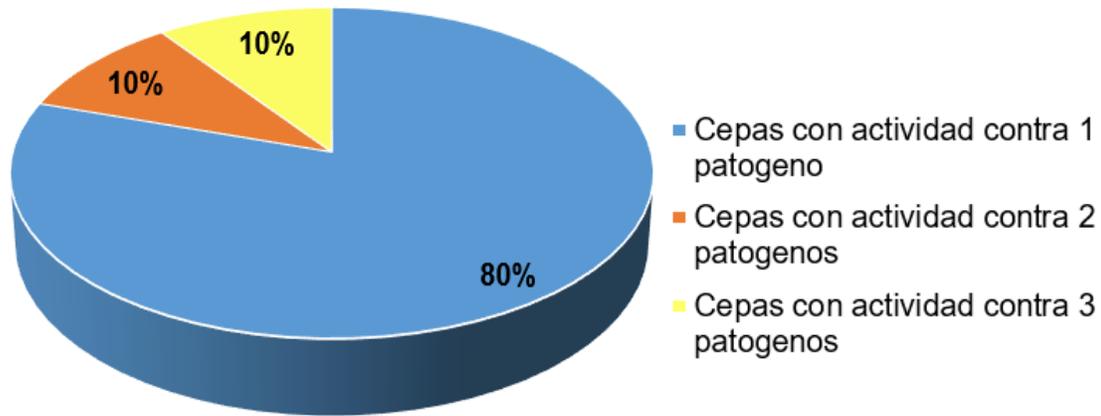
- Cepas con actividad antibacteriana contra 1 patógeno.
- Cepas con actividad antibacteriana contra 2 patógenos.
- Cepas con actividad antibacteriana contra 3 patógenos.

- +: Con actividad antibacteriana
- : Sin actividad antibacteriana
- *: Actividad a 30° y 37°C



Gráfica 1. Cepas del gusano del maguey *C. redtenbacheri* con actividad antibacteriana a 30°C y 37°C

Del total de las cepas con actividad antibacteriana (n=20), el 80% (n=16) tuvo efecto contra un solo patógeno, el 10% (n=2) contra dos patógenos y el 10% (n=2) contra tres patógenos; no hubo alguna cepa que tuviera actividad contra las cuatro cepas patógenas de referencia probadas (Gráfica 2).



Gráfica 2. Cepas del gusano del maguey *C. redtenbacheri* con actividad antibacteriana contra las cepas patógenas de referencia probadas (*A. baumannii* ATCC 17978, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S. aureus* ATCC 29213).

Dentro de las cepas que tuvieron actividad contra un solo patógeno, tenemos 14 cepas que tuvieron actividad inhibitoria contra la cepa de referencia *P. aeruginosa* ATCC 27853 a 37°C (Tabla 6) (Figura 13). Mientras que solo dos cepas (KMRF y B7) presentaron actividad única contra *S. aureus* ATCC 29313.

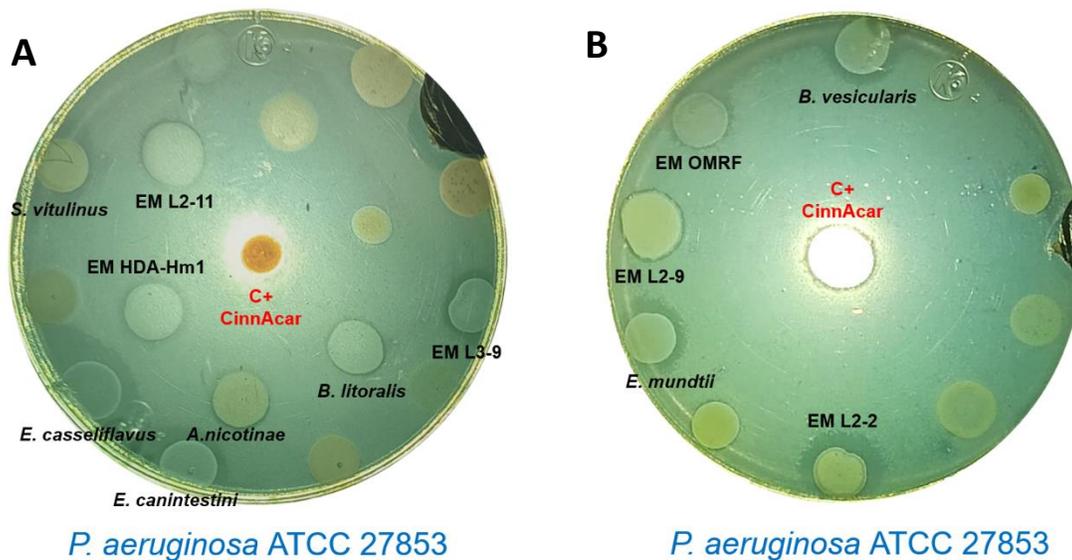


Figura 13. Halos de inhibición del crecimiento contra la cepa de referencia *P. aeruginosa* ATCC 27853 generado por las cepas aisladas de *C. redtenbacheri*. **A.** *Staphylococcus vitulinus*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus canintestini*, EM L3-9, EM L2-11, EM HDA-Hm1, *A. nicotinae* y *Bacillus litoralis*. **B.** *Brevudimonas vesicularis*, EM OMRF, EM L2-9, *Enterococcus mundtii* y EM L2-2.

Por otro lado, las cepas EM I2-2 y EM I6-1 mostraron actividad inhibitoria de crecimiento contra las cepas *K. pneumoniae* ATCC 700603 y *S. aureus* ATCC 29213

Una de las cepas que tuvo actividad contra tres patógenos, *Bacillus velezensis*, afectó a *A. baumannii* ATCC 17978, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S. aureus* ATCC 29213. Como se esperaba, el extracto CinnAcar (control positivo) mostró actividad contra todos los patógenos probados (Figura 14), ya que el principal compuesto de este extracto es el cinamaldehído que se conoce tiene efecto antibacteriano de amplio espectro (Erazo-Guijarro, 2017).

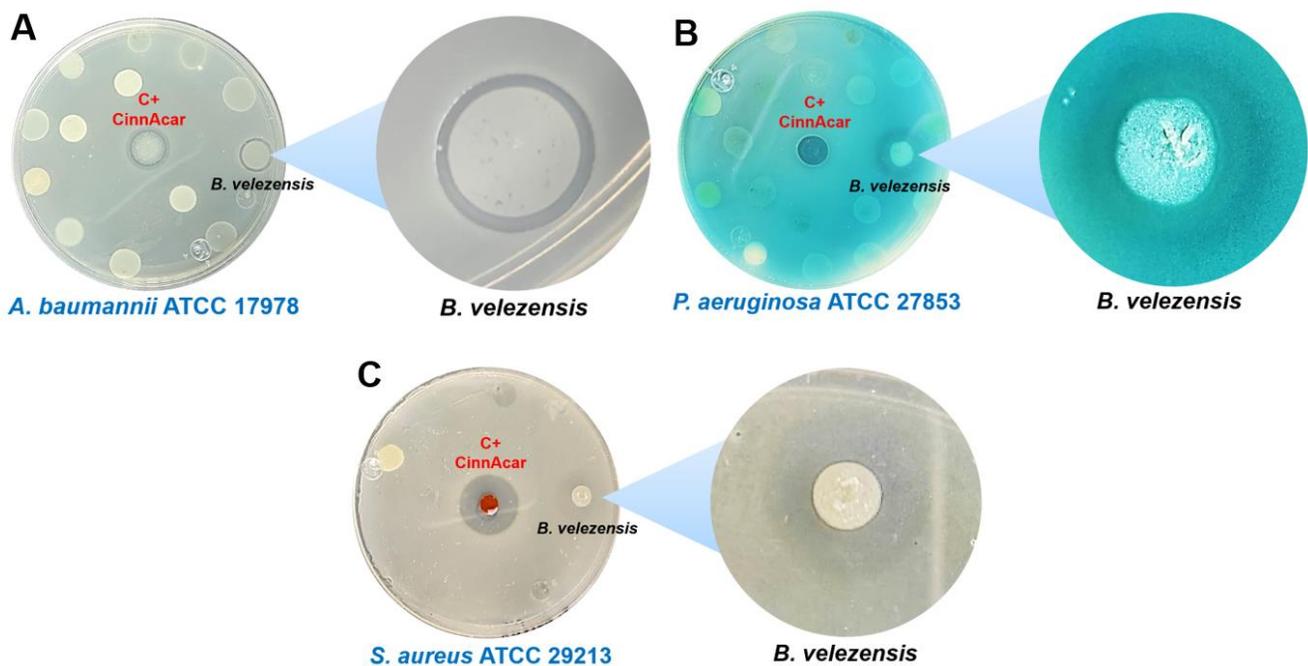


Figura 14. Halos de inhibición de crecimiento generados por la cepa *Bacillus velezensis* en las cepas patógenas de referencia *A. baumannii* ATCC 17978 (A), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (B) y *S. aureus* ATCC 29213 (C).

Estos resultados muestran que en la microbiota del gusano de maguey *C. redtenbacheri* hay bacterias que presentan actividad inhibitoria del crecimiento contra diferentes patógenos prioritarios.

8.2 Identificación de las especies de las cepas aisladas de *C. redtenbacheri* con actividad antibacteriana.

Se realizó la identificación de la especie mediante la secuenciación del gen *16S rRNA* de 12 cepas bacterianas aisladas de *C. redtenbacheri* que presentaron actividad antibacteriana (EM L3-9, EM L2-11, EM HDA-Hm1, EM OMRF, EM L2-9, EML2-2, EM B3, EM KMRF, EM B7, EM I2-2, EM I6-1, EM I7-1) y se confirmó la identidad de 8 cepas previamente identificadas (*S. vitulinus*, *E. casseliflavus*, *E. canintestini*, *A. nicotianae*, *B. litoralis*, *B. vesicularis*, *E. mundtii* y *B. velezensis*) por el grupo de la Dra. Esperanza Martínez Romero . En la tabla 7 se puede observar que para la mayoría de las secuencias se obtuvo un porcentaje de identidad que osciló entre el 99% y el 100%. Ocho de los veinte aislamientos secuenciados presentaron una alta similitud con bacterias del género *Staphylococcus*, el resto de las secuencias tuvo similitud con los géneros *Enterococcus*, *Pseudomonas* y *Klebsiella*. Así mismo, para confirmar la identidad de las cepas previamente identificadas (marcadas con un asterisco en la Tabla 8), se secuenció el gen ARNr 16S de dichas cepas sólo con el oligo 16S-fD1. Observamos que solo las cepas *B. litoralis* y *B. vesicularis* no coincidieron con el género con el que previamente habían sido identificadas.

Tabla 8. Comparación de secuencias del gen *16S rRNA* de veinte cepas de *C. redtenbacheri* con las bases de datos NCBI y EzBioCloud.

Cepa	Taxón de mayor similitud en NCBI	Porcentaje de identidad	Taxón de mayor similitud en EzBioCloud	Porcentaje de identidad
EM L3-9	<i>Pseudomonas abietaniphila</i> (NZ_FNCO011000040.1) **	98.81%	<i>Pseudomonas abietaniphila</i> (FNCO01000040) **	99.77%
EM L2-11	<i>Enterococcus</i> spp. (NZ_AP025635.1; NZ_020995.1; NZ_KZ84656.1) **	99.63%	<i>Enterococcus</i> sp. (Cepa KE350284_s) (KE350284) **	99.71%
EM HDA-Hm1	<i>Enterococcus casseliflavus</i> (NC_020995.1) **	99.43%	<i>Enterococcus casseliflavus</i> (AF039903) **	100%
EM OMRF	<i>Klebsiella variicola</i> (NZ_CP045783.1) **	99.42%	<i>Klebsiella quasivariicola</i> (CP022823) **	99.71%
EM L2-9	<i>Pseudomonas abietaniphila</i> (NZ_FNCO01000040.1) **	99.28%	<i>Pseudomonas abietaniphila</i> (FNCO01000040) **	99.85%

EM L2-2	<i>Mammaliicoccus sciuri</i> (NZ_CP022046.2) **	99.86%	<i>Mammaliicoccus sciuri</i> (AJ421446) **	100%
EM B3	<i>Staphylococcus hominis</i> (NZ_CP033732.1) **	99.92%	<i>Staphylococcus hominis</i> (AB233326) **	99.92%
EM KMRF	<i>Staphylococcus edaphicus</i> (NZ_MRZN01000038.1) **	99.71%	<i>Staphylococcus edaphicus</i> (KY315825) **	100%
EM B7	<i>Staphylococcus hominis</i> (NZ_CP033732.1) **	99.69%	<i>Staphylococcus hominis</i> (AB233326) **	99.69%
EM I2-2	<i>Staphylococcus borealis</i> (NZ_CUEE01000014.1) **	99.54%	<i>Staphylococcus borealis</i> (MT586030) **	99.85%
EM I6-1	<i>Staphylococcus ureilyticus</i> (NZ_CP094825.1) **	99.92%	<i>Staphylococcus ureilyticus</i> (AB009936) **	100%
EM I7-1	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (NZ_CP013911.1) **	99.85%	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (LILF01000056) **	99.57%
<i>Staphylococcus vitulinus</i>*	<i>Mammaliicoccus vitulinus</i> (NZ_CP068061.1) **	96.52%	<i>Mammaliicoccus fleuretii</i> (UHDL01000001) **	96.87%
<i>Enterococcus casseliflavus</i>*	<i>Enterococcus casseliflavus</i> (NC_020995.1) **	97.70%	<i>Enterococcus casseliflavus</i> (AF039903) **	97.68%
<i>Enterococcus canintestini</i>*	<i>Enterococcus</i> spp. (NZ_AP025635.1; NC_020995.1) **	98.13%	<i>Enterococcus casseliflavus</i> (AF039903) **	96.45%
<i>Arthrobacter nicotianae</i>*	<i>Glutamicibacter halophytocola</i> (NZ_CP012750) **	96.14%	<i>Glutamicibacter mishrai</i> (KT444697) **	96.43%
<i>Bacillus litoralis</i>*	<i>Enterococcus casseliflavus</i> (NC_020995.1) **	99.78%	<i>Enterococcus casseliflavus</i> (AF039903) **	100%
<i>Brevundimonas vesicularis</i>*	<i>Enterococcus casseliflavus</i> (NC_020995.1) **	99.64%	<i>Enterococcus casseliflavus</i> (AF039903) **	100%
<i>Enterococcus mundtii</i>*	<i>Enterococcus mundtii</i> (NZ_CP018061.1) **	97.24%	<i>Enterococcus mundtii</i> (JXKV01000056) **	98.22%
<i>Bacillus velezensis</i>*	<i>Bacillus velezensis</i> (NZ_CP009679.1) **	98.05%	<i>Bacillus velezensis</i> (AY603658) **	97.43%

*: cepas previamente identificadas.

** : número de acceso

8.3 Cepas bacterianas aisladas de la microbiota de *A. mexicana*

En la Tabla 9 se muestra el número total de bacterias que se obtuvieron en los diferentes medios de cultivo, del exterior y del interior de hormigas *A. mexicana*. Con base a la morfología (color, forma, tamaño, bordes, consistencia) observada en cada medio de cultivo, se seleccionaron 344 colonias en total para probar su actividad antibacteriana (Tabla 10). La tabla 11 indica el número de colonias bacterianas de la microbiota externa e interna de las hormigas que se seleccionaron de cada medio de cultivo.

Tabla 9. Promedio de UFCs obtenidas por hormiga en los diferentes medios de cultivo usados

Tipo de aislamiento	PY	LB	TSA	Mac Conkey	Sal Manitol	<i>Pseudomonas</i>	<i>Streptomyces</i>
Aislamiento interno	282500	278300	204200	15000	13800	1400	2600
Aislamiento externo	222500	235900	150900	11000	11400	1300	2100
Aislamiento total	350000	380000	248300	21400	22400	1700	3100

Tabla 10. Número de colonias de la microbiota de *A. mexicana* seleccionadas por tipo de aislamiento para probar la actividad antibacteriana.

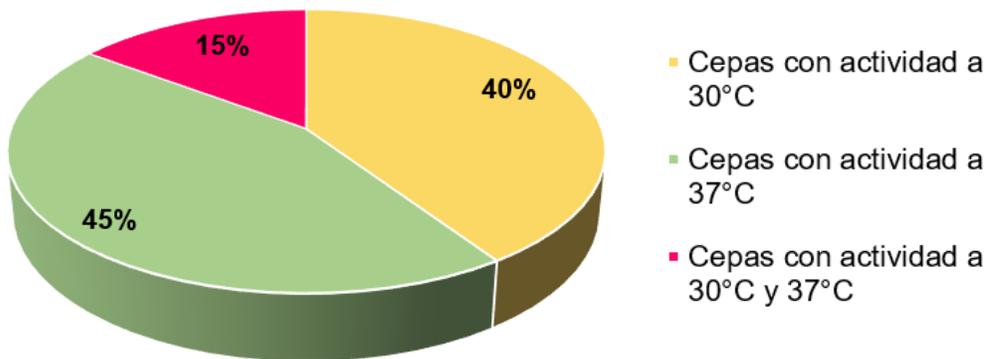
Tipo de aislamiento	Número de colonias seleccionadas
Aislamiento externo	86
Aislamiento interno	80
Aislamiento total	178

Tabla 11. Número de colonias de la microbiota de *A. mexicana* seleccionadas por cada medio de cultivo para probar la actividad antibacteriana.

	PY	LB	TSA	Mac Conkey	Sal Manitol	Agar <i>Pseudomonas</i>	Agar <i>Streptomyces</i>
Aislamiento interno	37	12	11	9	2	2	13
Aislamiento externo	12	24	14	12	9	1	8
Aislamiento total	34	14	32	30	22	3	43
Número total de colonias seleccionadas	83	50	57	51	33	6	64

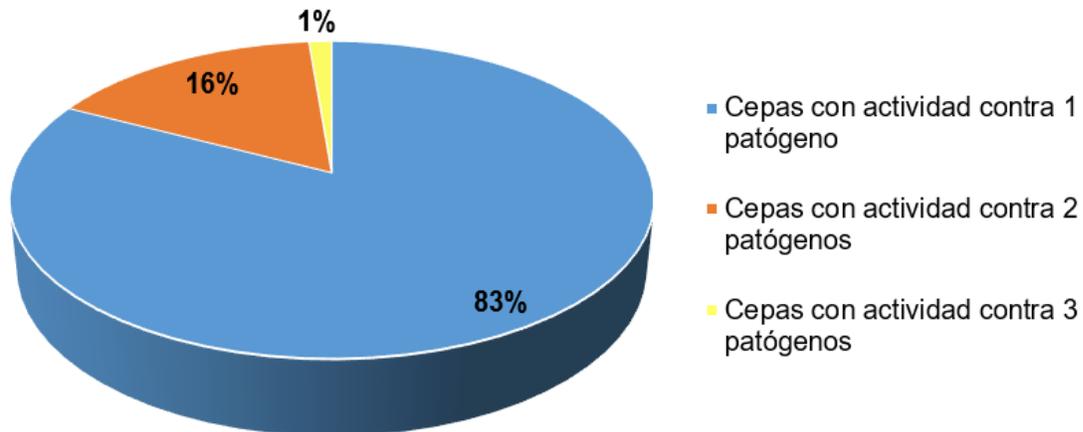
8.4 Análisis de la actividad antibacteriana de las cepas de *A. mexicana*

Se analizó la actividad antibacteriana de las 344 colonias seleccionadas contra las cepas de referencia *A. baumannii* ATCC 17978, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S. aureus* ATCC 29213, a las temperaturas de 30°C y 37°C. Interesantemente, 74 de las cepas aisladas de las hormigas presentaron actividad inhibitoria contra alguna(s) de las cepas patógenas probadas. El 45% (n=33) de estas cepas presentaron actividad únicamente a 37°C, el 40% (n=30) tuvo actividad exclusiva a 30°C y el resto de las cepas (15%, n=11) presentó actividad a ambas temperaturas (Gráfica 3).



Gráfica 3. Cepas de la hormiga *A. mexicana* con actividad antibacteriana a 30°C y/o 37°C.

Respecto al número de patógenos a los que presentaron actividad, el 83% (n=61) de las cepas aisladas de las hormigas tuvieron actividad contra un solo patógeno, el 16% (n=12) contra 2 patógenos y solo el 1% (n=1) presentó actividad contra 3 patógenos, ninguna cepa presentó actividad contra 4 patógenos (Gráfica 4).



Gráfica 4. Cepas de la hormiga *A. mexicana* que presentaron actividad antibacteriana contra 1,2,3 o 4 cepas patógenas de referencia.

Específicamente, la mayoría de las cepas que tuvieron actividad frente a un solo patógeno fue contra la cepa de referencia *P. aeruginosa* ATCC 27853, en una menor proporción estuvieron las cepas que tuvieron actividad única contra *S. aureus* ATCC 29213 y *K. pneumoniae* ATCC 700603. Por otro lado, las cepas con actividad antibacteriana contra dos patógenos presentaron su efecto en diferentes combinaciones de patógenos, los cuales fueron: *A. baumannii* ATCC 17978 y *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* ATCC 700603 y *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 29213 y *P. aeruginosa* ATCC 27853. Como se observa, todas las combinaciones involucran la actividad contra *P. aeruginosa* ATCC 27853. Por último, la cepa H1A121, la única con actividad contra 3 patógenos, tuvo efecto inhibitorio contra *K. pneumoniae* ATCC 700603, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S. aureus* ATCC 29213.

Del total de las cepas con actividad antibacteriana aisladas de las hormigas, se eligieron 14 cepas para continuar con las pruebas posteriores (Tabla 12). Estas cepas fueron seleccionadas con base a su actividad contra más de un patógeno o que tuvieran efecto contra *A. baumannii* ATCC 17978, *K. pneumoniae* ATCC 700603 o *P. aeruginosa* ATCC 27853 por su relevancia clínica.

Tabla 12. Cepas seleccionadas de *A. mexicana* con actividad antibacteriana contra diferentes patógenos.

Cepas productoras	Bacterias patógenas				Temperatura de actividad
	<i>A. baumannii</i> ATCC 17978	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	
G3AT303	-	-	+*	-	30° y 37°C
G3AT304	-	-	+	-	30°C
G3AT305	-	-	+*	-	30°C y 37°C
G1AI314	-	-	+	-	30°C
G3AT319	-	-	+	-	30°C
H1AI7	-	-	+	+	37°C
H2AT59	-	+	+	-	30°C y 37°C
G1AI96	-	-	+	+	30°C
G3AT135	-	-	+	+	37°C
G2AE186	+	-	+*	-	30°C y 37°C
G3AT299	+	-	+*	-	30°C y 37°C
G1AI334	-	+	+	-	37°C
G1AI338	-	+	+	-	37°C
H1AI21	-	+	+	+	30°C

■ Cepas con actividad antibacteriana contra 1 patógeno.

■ Cepas con actividad antibacteriana contra 2 patógenos.

■ Cepas con actividad antibacteriana contra 3 patógenos.

+: Con actividad antibacteriana

-: Sin actividad antibacteriana

*****: Actividad a 30° y 37°C

Las cepas G2AE186 y G3AT299 presentaron actividad contra *A. baumannii* ATCC 17978 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Figura 15). Estas cepas fueron aisladas de la microbiota externa y microbiota total de las hormigas, respectivamente, en agar PY.

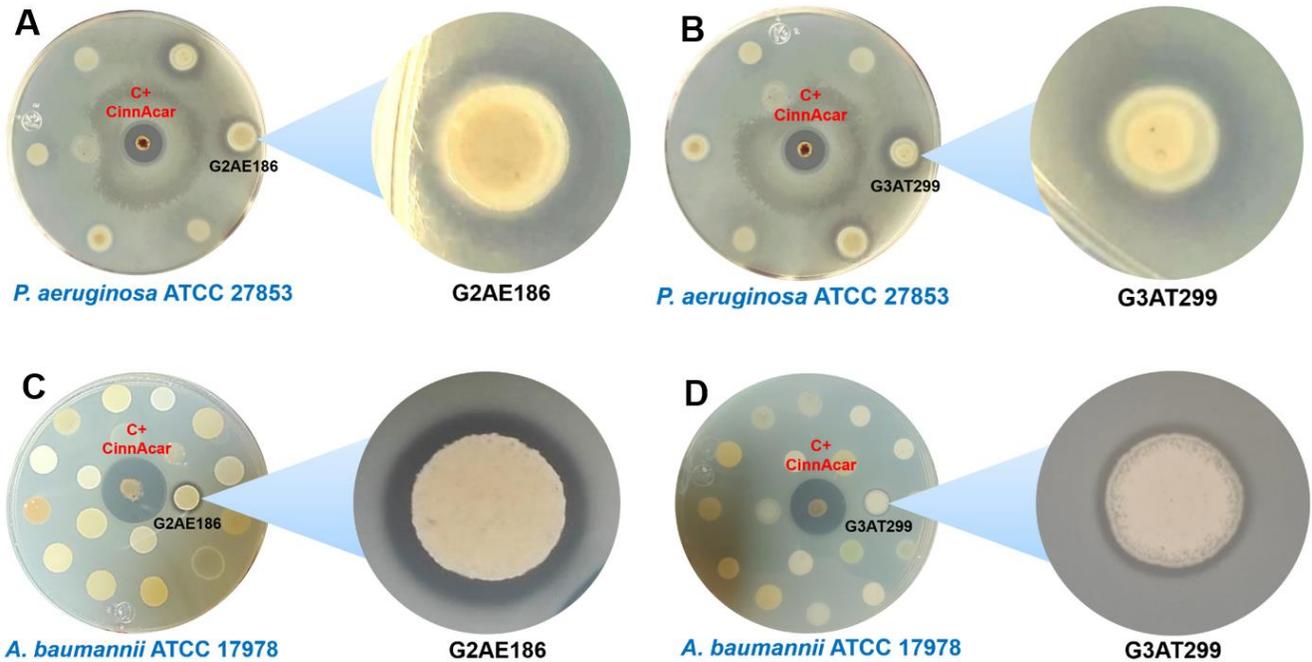


Figura 15. Halos de inhibición de crecimiento generados por las cepas G2AE186 y G3AT299 en las cepas patógenas de referencia *P. aeruginosa* ATCC 27853 (A y B) y *A. baumannii* ATCC 17978 (C y D).

Las cepas G1AI96 y G3AT135 presentaron actividad contra los patógenos *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S. aureus* ATCC 29213 (Figura 16). Ambas cepas crecieron en agar MacConkey a partir de la microbiota interna (G1AI96) y total (G3AT135) de la hormiga *A. mexicana*.

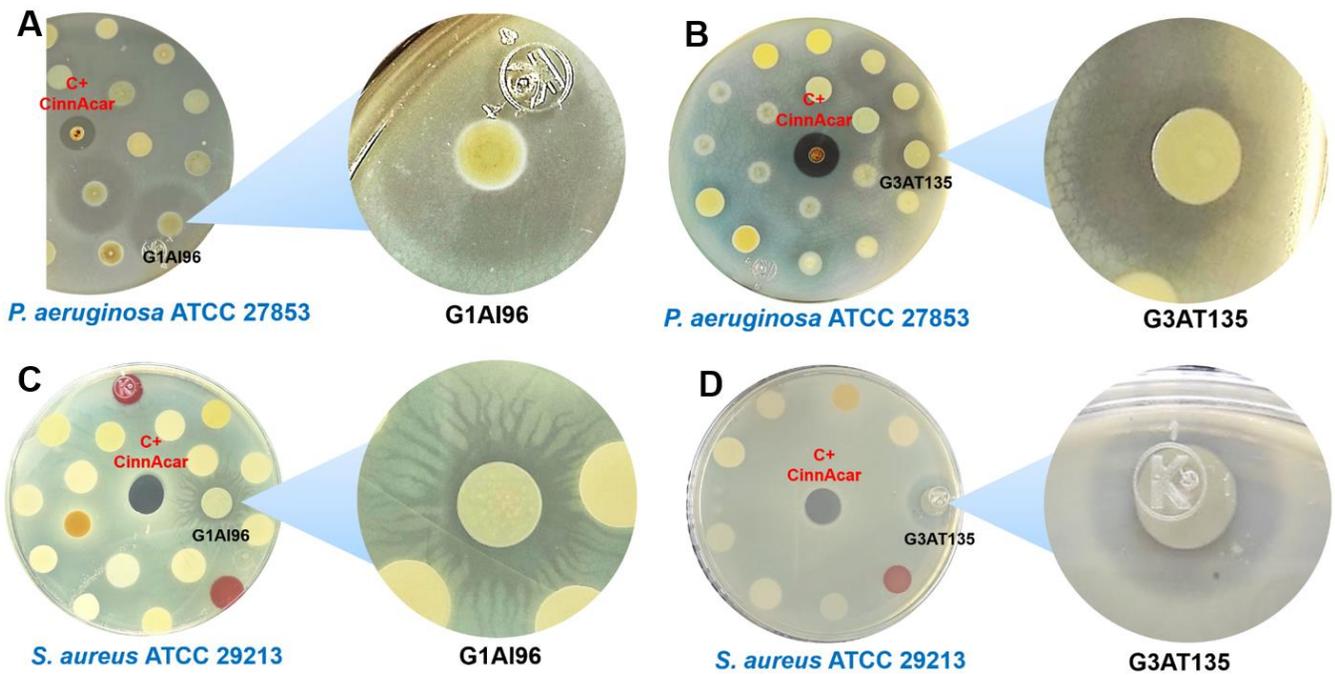


Figura 16. Halos de inhibición de crecimiento generados por las cepas G1AI96 y G3AT135 en las cepas patógenas de referencia *P. aeruginosa* ATCC 27853 (A y B) y *S. aureus* ATCC 29213 (C y D)

La Figura 17 muestra las cepas de *A. mexicana* que tuvieron actividad antibacteriana únicamente contra la cepa patógena *P. aeruginosa* ATCC 27853. Las cepas G3AT303, G3AT304 y G3AT305 se aislaron de la microbiota total de la hormiga y se obtuvieron de medios de cultivo ricos (PY y TSA). Por otro lado, las cepas G1AI314 y G3AT319 fueron aisladas de la microbiota interna y total respectivamente, éstas crecieron inicialmente en el medio de cultivo agar *Streptomyces*.

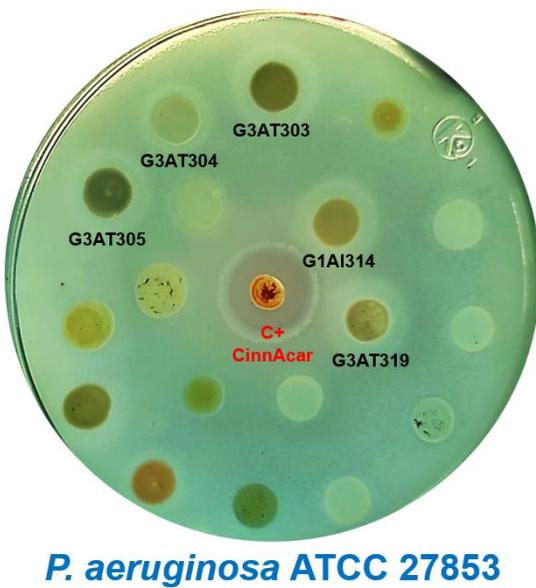


Figura 17. Halos de inhibición de crecimiento generados por las cepas G3AT303, G3AT304, G3AT305, G1AI314 y G3AT319 en la cepa de referencia *P. aeruginosa* ATCC 27853.

P. aeruginosa ATCC 27853

En conjunto, nuestros resultados muestran que en la microbiota de la hormiga *A. mexicana* hay bacterias que presentan actividad inhibitoria de crecimiento contra los patógenos *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

8.5 Identificación de las especies de las cepas de *A. mexicana* con actividad antibacteriana.

Realizamos la secuenciación del gen 16S rRNA para la identificación de la especie bacteriana de las 14 cepas seleccionadas, aisladas de *A. mexicana* (G3AT303, G3AT304, G3AT305, G1AI314, G3AT319, H1AI7, H2AT59, G1AI96, G3AT135, G2AE186, G3AT299, G1AI334, G1AI338, H1AI21). En la tabla 13 se puede observar que para la mayoría de las secuencias se obtuvo un porcentaje de identidad que osciló entre el 100% y 99%. De las 14 cepas identificadas, 6 de ellas presentaron una alta similitud con bacterias del género *Staphylococcus*, el resto tuvo similitud con los géneros *Serratia*, *Bacillus*, *Enterococcus* y *Enterobacter*.

Tabla 13. Comparación de secuencias del gen 16S rRNA de catorce cepas de *A. mexicana* con las bases de datos NCBI y EzBioCloud.

Cepa	Taxón de mayor similitud en NCBI	Porcentaje de identidad	Taxón de mayor similitud en EzBioCloud	Porcentaje de identidad
G3AT303	<i>Staphylococcus gallinarum</i> (NZ_CP086207.1) **	99.93%	<i>Staphylococcus gallinarum</i> (D83366) **	100%
G3AT304	<i>Enterococcus faecalis</i> (NZ_KB944666.1) **	99.86%	<i>Enterococcus faecalis</i> (ASDA01000001) **	99.93%
G3AT305	<i>Serratia ureilytica</i> (NZ_CP071320.1) **	99.78%	<i>Serratia marcescens</i> (JMPQ01000005) **	99.29%
G1AI314	<i>Staphylococcus gallinarum</i> (NZ_CP086207.1) **	99.93%	<i>Staphylococcus gallinarum</i> (D83366) **	100%
G3AT319	<i>Staphylococcus gallinarum</i> (NZ_CP086207.1) **	100%	<i>Staphylococcus gallinarum</i> (D83366) **	100%
H1AI7	<i>Staphylococcus succinus</i> (NZ_CP018199.1) **	99.93%	<i>Staphylococcus succinus</i> (AF004220) **	100%
H2AT59	<i>Staphylococcus succinus</i> (NZ_CP018199.1) **	99.49%	<i>Staphylococcus succinus</i> (AF004220) **	99.56%

G1AI96	<i>Serratia ureilytica</i> (NZ_CP071320.1) **	99.85%	<i>Serratia marcescens</i> (JMPQ01000005) **	99.85%
G3AT135	<i>Serratia marcescens</i> (NZ_CP027798.1) **	99.27%	<i>Serratia</i> sp. (Cepa CP012685_S) (CP012685) **	99.49%
G2AE186	<i>Bacillus subtilis</i> (NC_000964.3) **	99.81%	<i>Bacillus subtilis</i> (ABQL01000001) **	99.48%
G3AT299	<i>Bacillus subtilis</i> (NC_000964.3) **	99.63%	<i>Bacillus subtilis</i> (ABQL01000001) **	99.56%
G1AI334	<i>Enterobacter</i> <i>huaxiensis</i> (NZ_CP043342.1) **	99.40%	<i>Enterobacter</i> <i>huaxiensis</i> (MK049964) **	99.55%
G1AI338	<i>Enterobacter</i> <i>huaxiensis</i> (NZ_CP043342.1) **	99.48%	<i>Enterobacter</i> <i>huaxiensis</i> (MK049964) **	99.34%
H1AI21	<i>Staphylococcus</i> <i>pseudoxylosus</i> (NZ_CP075500.1) **	99.93%	<i>Staphylococcus</i> <i>pseudoxylosus</i> (MH643903) **	99.93%

** : número de acceso

8.6 Análisis de la actividad antibacteriana de las cepas de *C. redtenbacheri* y *A. mexicana* contra aislamientos clínicos resistentes a antibióticos

Basándonos en el aspecto de los halos formados de las cepas de *A. mexicana* y *C. redtenbacheri* con actividad frente a patógenos de referencia, seleccionamos 6 cepas de *C. redtenbacheri* (*E. casseliflavus*, *E. canintestini*, *B. vesicularis*, *E. mundtii*, *M. sciuri*-L2-2, *B. velezensis*) y 8 cepas de *A. mexicana* (*Bacillus subtilis*-G2AE186, *Serratia* sp-G1AI96, *Staphylococcus gallinarum*-G3AT303, *Serratia* sp-G3AT305, *Serratia* sp-G3AT135, *Staphylococcus gallinarum*-G1AI314, *Staphylococcus gallinarum*-G3AT319 y *Bacillus subtilis*-G3AT299) con actividad antibacteriana contra cepas referencia, para evaluar su actividad contra aislamientos clínicos resistentes a antibióticos. Como control positivo se utilizó CinnAcar y como control negativo se utilizó a la cepa B10A que fue aislada de *C. redtenbacheri* y que no presentó actividad contra las cepas patógenas de referencia.

Solo la cepa *B. velezensis*, aislada de la microbiota del gusano rojo del maguey, presentó actividad contra aislados clínicos de *P. aeruginosa* (Tabla 14) (Figura 18). En estos ensayos obtuvimos un resultado no esperado para la cepa B10A, utilizada como control negativo, ya que ésta mostró actividad contra la cepa *P. aeruginosa* P1165 a 30°C y 37°C (Figura 18).

Tabla 14. Actividad de *B. velezensis* aislada de la microbiota de *C. redtenbacheri* contra aislados clínicos de *P. aeruginosa*.

Insecto	Cepas productoras	Aislamientos clínicos de <i>P. aeruginosa</i>				Temperatura de actividad
		17-3375	P1165	P1473	P1483	
<i>C. redtenbacheri</i>	<i>B. velezensis</i>	+	+	-	+	30°C y 37°C

*: Actividad a 30° y 37°C

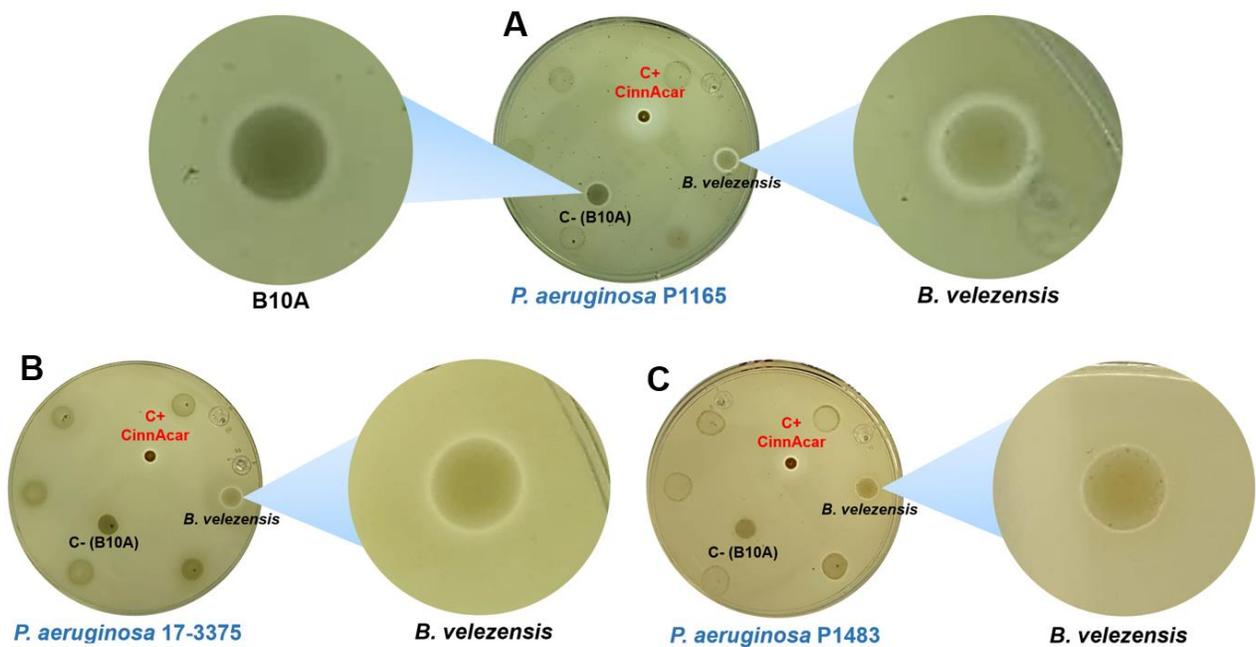


Figura 18. Halos de inhibición de crecimiento generados por la cepa *B. velezensis* contra aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*. P1165 (A), *P. aeruginosa* 17-3375 (B) y *P. aeruginosa* P1483 (C).

Por otra parte, las cepas aisladas de *A. mexicana*, *Serratia* sp.-G1A196 y *Serratia* sp.-G3AT135, fueron evaluadas contra aislamientos clínicos de *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Sólo *Serratia* sp.-G3AT135 presentó actividad contra cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos (Tabla 15) (Figura 19).

Tabla 15. Actividad de *Serratia* sp.-G3AT135 contra aislados clínicos de *S. aureus*.

Insecto	Cepas productoras	Aislamientos clínicos de <i>S. aureus</i>				Temperatura de actividad
		6N3	18F1	24N2A	17N3A	
<i>A. mexicana</i>	<i>Serratia</i> sp.-G3AT135	+	+	+	+	30°C

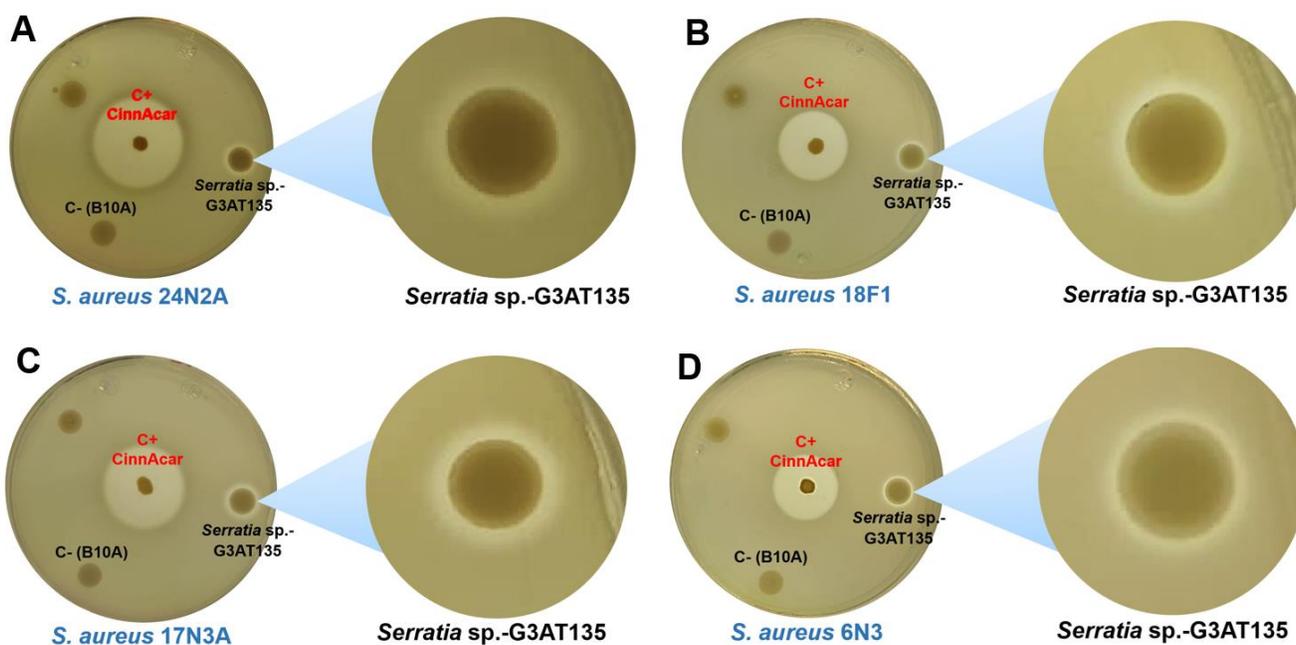


Figura 19. Halos de inhibición de crecimiento generados por la cepa *Serratia* sp.-G3AT135 contra aislamientos clínicos de *S. aureus* 24N2A (A), *S. aureus* 18F1 (B), *S. aureus* 17N3A (C) y *S. aureus* 6N3 (D).

Ninguna de las cepas seleccionadas de *C. redtenbacheri* (*B. velezensis*) y de *A. mexicana* (*Bacillus subtilis*-G2AE186 y *Bacillus subtilis*-G3AT299), presentó actividad inhibitoria de crecimiento contra los aislamientos clínicos de *A. baumannii*.

Nuestros resultados muestran que una cepas de la microbiota de la hormiga *A. mexicana* y una cepa de la microbiota del gusano del maguey *C. redtenbacheri* presentan actividad contra aislados clínicos resistentes a antibióticos de *S. aureus* y *P. aeruginosa*, respectivamente.

9. DISCUSIÓN

Las bacterias aisladas de ambientes poco explorados representan una fuente prometedora para el descubrimiento de nuevos metabolitos con actividad antibacteriana contra cepas bacterianas resistentes a múltiples antibióticos.

El interés de nuestro estudio fue identificar bacterias de la microbiota del gusano del maguey *C. redtenbacheri* y la hormiga *A. mexicana* que tuvieran actividad antibacteriana contra aislados clínicos resistentes a antibióticos de los patógenos *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*, debido a que, actualmente, hay una escasa disponibilidad de antibióticos eficaces contra estas bacterias multirresistentes.

Inicialmente seleccionamos bacterias que presentaron actividad contra cepas de referencia de los patógenos antes mencionados. Se obtuvieron 20 cepas aisladas de *C. redtenbacheri* y 74 cepas aisladas de *A. mexicana* que mostraron actividad contra al menos una cepa de referencia.

La mayoría de estas cepas productoras presentaron actividad frente a un solo patógeno, específicamente contra *P. aeruginosa*. Es conocido que las bacterias del género *Pseudomonas* presentan una gran diversidad y que suelen habitar una amplia variedad de ambientes incluyendo plantas, agua y suelo. De hecho, está reportado que este género de bacterias también puede ser endófito de plantas de agave y que suelen jugar en éstas un papel benéfico en el crecimiento y de protección contra depredadores como los insectos (Delgado *et al.*, 2017; Hernández Flores, 2017). Con estos datos podríamos pensar que las larvas de *C. redtenbacheri* al momento roer los tallos de esta planta, podría ingerir bacterias *Pseudomonas* que podrían llegar a infectar a *C. redtenbacheri*. Es posible que las bacterias simbiotes protejan al gusano *C. redtenbacheri* de la infección por *Pseudomonas*, produciendo compuestos con actividad antibacteriana. Un fenómeno similar puede ocurrir en la hormiga *A. mexicana*, las bacterias de su microbiota pueden darle protección contra la infección de bacterias como *Pseudomonas* y *Staphylococcus*.

Del grupo de cepas con actividad antibacteriana contra patógenos de referencia, seleccionamos 14 y las probamos contra aislamientos clínicos resistentes a antibióticos de *A. baumannii*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Finalmente, las cepas identificadas como *B. velezensis* (aislada de *C. redtenbacheri*) y *Serratia* sp.-G3AT135 (aislada de *A. mexicana*) presentaron actividad contra cepas resistentes a antibióticos de *P. aeruginosa* y *S. aureus*, respectivamente.

La cepa identificada como *B. velezensis*, aislada de la microbiota intestinal de *C. redtenbacheri*, presentó actividad contra 3 aislados clínicos de *P. aeruginosa* (173375, P1165, P1483). *B. velezensis* es una bacteria aeróbica, Gram-positiva, formadora de endosporas y, según diversos estudios, con una amplia actividad antimicrobiana. Se ha reportado que esta especie promueve el crecimiento de las plantas y que también tiene otras propiedades que suprimen el crecimiento de patógenos microbianos, incluidas bacterias, hongos y nemátodos en plantas. Algunos de los compuestos bioactivos con actividad antibacteriana que se ha identificado que esta bacteria produce están en la Tabla 16. También se ha reportado su actividad antimicrobiana contra especies bacterianas patógenas de peces (*Aeromonas hydrophila*) (Yi *et al.*, 2018). Recientemente se informó que péptidos antimicrobianos obtenidos de cepas de *B. velezensis* aisladas de productos de meliponinos (abejas sin aguijón) tienen actividad antibacteriana contra los patógenos: *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Alcaligenes faecalis* y cepas MRSA de *S. aureus* (Baharudin *et al.*, 2021). Estos resultados coinciden con la actividad antibacteriana que nosotros observamos para la cepa de *B. velezensis* aislada del gusano *C. redtenbacheri*, contra bacterias patógenas de referencia de distintas especies. Adicionalmente, cabe destacar que nuestros resultados indican que la cepa de *B. velezensis* aislada del gusano *C. redtenbacheri* tiene actividad antibacteriana contra *P. aeruginosa*, incluyendo cepas resistentes a antibióticos, lo cual no se había observado antes. Por los antecedentes previamente mencionados, podríamos pensar que la actividad antibacteriana presentada por la cepa de *B. velezensis* aislada del gusano *C. redtenbacheri* podría estar mediada por péptidos, sin embargo, se necesitan realizar varios análisis para determinar esto.

Tabla 16. Reportes de compuestos con actividad antimicrobiana producidas por cepas de *B. velezensis* y *S. marcescens*.

Bacteria productora	Compuesto(s) con actividad antibacteriana	Actividad contra	Fuente de aislamiento
<i>B. velezensis</i>	-Dificidina (macrolido) -Bacilisina (<i>dipeptido</i>) -Bacilaeno (polieno) -Fengicina (lipopeptido) -Plantazolicina (péptido)	- <i>Bacillus anthracis</i> - <i>Bacillus cereus</i> - <i>Vibrio parahaemolyticus</i> - <i>Vibrio alginolyticus</i> - <i>Aeromonas hydrophila</i> , - <i>Alcaligenes faecalis</i> - <i>S. aureus</i> SARM	-Plantas -Peces -Productos de meliponinos
<i>Serratia marcescens</i>	-Prodigiosina (alcaloide) -Serrawettin W1 (lipopéptido) - Bioemulsionante	- <i>S. aureus</i> / <i>S. aureus</i> SARM - <i>E. faecalis</i> - <i>S. pyogenes</i> - <i>P. aeruginosa</i> MDR - <i>Cryptococcus neoformans</i> . - <i>Salmonella</i> spp. - <i>Klebsiella</i> spp. - <i>Lesteria</i> spp.	-Muestras ambientales -Intestino de <i>Periplaneta americana</i>

Por otra parte, la cepa identificada como *Serratia* sp.-G3AT135, aislada de la microbiota de *A. mexicana*, presentó un gran potencial antimicrobiano contra cuatro cepas clínicas de *S. aureus* (6N3, 18F1, 24N2A y 17N3A). En general, se desconoce el impacto que tiene *S. aureus* (u otras especies de *Staphylococcus*) en el ciclo de vida de la hormiga *A. mexicana*; sin embargo, confirmamos que ciertas bacterias de su microbiota, como *Serratia* spp., son capaces de producir compuestos antibacterianos en una posible situación de competencia contra *S. aureus* o alguna especie cercana a ésta. Hay estudios sobre compuestos antibacterianos producidos por *Serratia* spp (Tabla 16). Un ejemplo representativo es el compuesto llamado prodigiosina, el cual es un alcaloide y pigmento rojo natural producido por *S. marcescens*. La prodigiosina tiene propiedades antimicrobianas contra *S. aureus*, *E. faecalis* y *S. pyogenes* (Lapenda *et al.*,

2015). Para nuestro estudio, podemos descartar que la actividad antibacteriana se atribuya a la prodigiosina porque nuestra cepa no produce este pigmento. Otro ejemplo es otra cepa de *S. marcescens* aislada de fuentes ambientales, la cual es productora del biosurfactante serrawetin W1 y de prodigiosina, con actividad contra *P. aeruginosa* MDR, *S. aureus* SARM y *Cryptococcus neoformans* (Clements *et al.*, 2019). También se ha reportado la actividad de un compuesto presente en el sobrenadante del cultivo de *S. marcescens* aislada del intestino de la cucaracha *P. americana*, con efecto inhibitorio de crecimiento frente a *Lesteria spp.*, *Salmonella spp.*, *Klebsiella spp.* y *S. aureus* (Ahmed y Hassan, 2013).

Nuestro estudio aporta datos sobre la capacidad antibacteriana de dos cepas, *B. velezensis* y *Serratia sp.*, que podrían ser una valiosa fuente de compuestos antibacterianos, particularmente contra los patógenos prioritarios (resistentes a antibióticos) *P. aeruginosa* y *S. aureus*, respectivamente.

De forma general, nuestro estudio muestra que la microbiota de insectos nativos de México representa una fuente con gran potencial para la identificación de compuestos con actividad antibacteriana, y posiblemente también de compuestos con otras actividades biológicas.

10. CONCLUSIONES

-Encontramos 20 cepas del gusano del maguey *C. redtenbacheri* que poseen actividad antibacteriana contra diferentes patógenos prioritarios de referencia, la mayoría contra *P. aeruginosa*.

-La cepa identificada como *B. velezensis*, aislada de *C. redtenbacheri*, presentó actividad contra aislados clínicos resistentes a antibióticos de *P. aeruginosa*.

-Seleccionamos 74 cepas simbiotes de la hormiga *A. mexicana*, las cuales presentaron actividad antibacteriana contra diferentes patógenos prioritarios de referencia, una gran parte contra *P. aeruginosa*.

-La cepa identificada como *Serratia* sp.-G3AT135, aislada de *A. mexicana*, presentó actividad contra 4 aislados clínicos resistentes a antibióticos de *S. aureus*.

11. PERSPECTIVAS

- Evaluar la actividad de las cepas de *B. velezensis* y *Serratia* sp.-G3AT135 contra un mayor número de aislados clínicos resistentes a antibióticos de la respectiva bacteria patógena que afectan.
- Evaluar la actividad antibacteriana de sobrenadantes de cultivos y de extractos con solventes orgánicos de las cepas *B. velezensis* y *Serratia* sp.-G3AT135.
- Caracterización de la naturaleza química de los compuestos con actividad antibacteriana producidos por las cepas *B. velezensis* y *Serratia* sp.-G3AT135, mediante pruebas de estabilidad a distintas temperaturas, con tratamiento de proteasas y peryodato de sodio.
- Purificar los posibles compuestos con actividad antibacteriana mediante el uso de diferentes tipos de cromatografía, como cromatografía en capa fina y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
- Identificar la estructura química de los compuestos con actividad antibacteriana, por medio de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).
- Secuenciar y analizar el genoma de las cepas *B. velezensis* y *Serratia* sp.-G3AT135 para la identificación de genes relacionados a la biosíntesis de compuestos antimicrobianos.

12. REFERENCIAS

- Ahmed, E., y Hassan, S. (2013). Antimicrobial activity of a bioemulsifier produced by *Serratia marcescens* S10. *Journal of Al-Nahrain University Science*, 16(1), 147–155. <https://doi.org/10.22401/JNUS.16.1.22>
- Aldred, K., Kerns, R., y Osheroff, N. (2014). Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*, 53(10), 1565–1574. <https://doi.org/10.1021/bi5000564>
- Ali, S., Siddiqui, R., y Khan, N. (2018). Antimicrobial discovery from natural and unusual sources. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 70(10), 1287–1300. <https://doi.org/10.1111/jphp.12976>
- Alós, J.(2009). Quinolonas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(5), 290–297. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.03.001>
- Alós, J.(2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: Una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(10), 692–699. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>
- Aragón García, María Mónica (2023). Análisis de la actividad antimicrobiana de bacterias aisladas de la piel del ajolote *Ambystoma altamirani*. Instituto de Biotecnología, maestría en Ciencias Bioquímicas, UNAM
- Arango, R., Carlson, M., Currie, R., McDonald, R., Book, J., Green, F., Lebow, K., y Raffa, F. (2016). Antimicrobial activity of actinobacteria isolated from the guts of subterranean termites. *Environmental Entomology*, 45(6), 1415–1423. <https://doi.org/10.1093/ee/nvw126>
- Arzanlou, M., Chai, C., y Venter, H. (2017). Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Essays in Biochemistry*, 61(1), 49–59. <https://doi.org/10.1042/EBC20160063>
- Baharudin, A., Ngalimat, S., Mohd Shariff, F., Balia Yusof, N., Karim, M., Baharum, N., y Sabri, S. (2021). Antimicrobial activities of *Bacillus velezensis* strains isolated from stingless bee products against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLOS ONE*, 16(5), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251514>
- Blair, J., Webber, M., Baylay, A., Ogbolu, D., y Piddock, L. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>

- Calvo, J., y Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001>
- Chávez-Jacobo, V. (2020). La batalla contra las superbacterias: No más antimicrobianos, no hay ESKAPE. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 23. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.202>
- Chevrette, G., Carlson, M., Ortega, E., Thomas, C., Ananiev, E., Barns, J., Book, J., Cagnazzo, J., Carlos, C., Flanigan, W., Grubbs, J., Horn, A., Hoffmann, M., Klassen, L., Knack, J., Lewin, G., McDonald, B., Muller, L., Melo, W., y Currie, C. (2019). The antimicrobial potential of *Streptomyces* from insect microbiomes. *Nature Communications*, 10(1), 516. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08438-0>
- Christaki, E., Marcou, M., y Tofarides, A. (2019). Antimicrobial resistance in bacteria: mechanisms, evolution, and persistence. *Journal of Molecular Evolution*, 88(1), 26–40. <https://doi.org/10.1007/s00239-019-09914-3>
- Clements, T., Ndlovu, T., y Khan, W. (2019). Broad-spectrum antimicrobial activity of secondary metabolites produced by *Serratia marcescens* strains. *Microbiological Research*, 229, 126329. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126329>
- Cobos, N., Ateka, O., Pitart, C., y Vila, J. (2009). Macrólidos y cetólidos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(7), 412–418. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.06.002>
- CONABIO. (2020, enero). *¿Cuántas especies hay?* Biodiversidad Mexicana. <https://www.biodiversidad.gob.mx/especies/cuantasesp>
- De la Fuente -Salcido, N., Villareal-Prieto, J., Díaz, M., y García, A. (2015). Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 46(2).
- Delgado, I., Llanderal, C., Miranda, K., y Santos, H. (2017). Pupación, emergencia de adultos y oviposición de comadreja *redtenbacheri* (Lepidoptera: Cossidae) en vivero. *Agrociencia*, 51(4), 447–454.
- Do Nascimento, F., Da Silva, M., Soares, R., Gabrieli, A., y Tondello, F. (2020). Colonización por ESKAPES y características clínicas de pacientes críticos. *Enfermería Global*, 19(3), 214–254. <https://doi.org/10.6018/eglobal.406691>
- Echeverri, L., y Cataño, J. (2010). *Klebsiella pneumoniae* como patógeno intrahospitalario: Epidemiología y resistencia. *Iatreia*, 23(3), 240–249.

- Engel, P., y Moran, N. (2013). The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 699–735. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12025>
- Erazo Guijarro, María José, Arroyo Bonilla, Felipe Andrés, Arroyo Bonilla, David Alejandro, Castro García, Marlon Reinaldo, Santacruz Terán, Stalin Gustavo, y Armas Vega, Ana Del Carmen. (2017). Efecto antimicrobiano del cinamaldehído, timol, eugenol y quitosano sobre cepas de *Streptococcus mutans*. *Revista Cubana de Estomatología*, 54(4), 1-9. Recuperado en 18 de agosto de 2023, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072017000400005&lng=es&tlng=pt.
- Etebu, E., y Arikekpar, I. (2016). Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research*, 4, 90–101.
- Feldhaar, H., Straka, J., Krischke, M., Berthold, K., Stoll, S., Mueller, M., y Gross, R. (2007). Nutritional upgrading for omnivorous carpenter ants by the endosymbiont *Blochmannia*. *BMC Biology*, 5(1), 48. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-5-48>
- Fernández, L., Breidenstein, E., y Hancock, R. (2011). Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. *Drug Resistance Updates*, 14(1), 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2011.01.001>
- Fuoco, D. (2012). Classification framework and chemical biology of tetracycline-structure-based drugs. *Antibiotics*, 1(1), 1–13. <https://doi.org/10.3390/antibiotics1010001>
- Garza-González, E., Morfín-Otero, R., Mendoza-Olazarán, S., Bocanegra-Ibarias, P., Flores-Treviño, S., Rodríguez-Noriega, E., Ponce-de-León, A., Sanchez-Francia, D., Franco-Cendejas, R., Arroyo-Escalante, S., Velázquez-Acosta, C., Rojas-Larios, F., Quintanilla, L., Maldonado-Anicacio, J., Martínez-Miranda, R., Ostos-Cantú, H., Gómez-Choel, A., Jaime-Sanchez, J., Avilés-Benítez, L., y 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209865>
- Giono, S., Santos, J., Morfín, M. del R., Torres, F., y Alcántar, M. (2020). Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. *Gaceta de México*, 156(2), 3610. <https://doi.org/10.24875/GMM.20005624>
- Gómez, J., Vázquez-García, E., y Hernández-Torres. (2015). Los betalactámicos en la práctica clínica. *Revista Española de Quimioterapia*, 1(28), 1–9.

- Goto, K., Kawamura, K., y Arakawa, Y. (2015). Contribution of QnrA, a plasmid-mediated quinolone resistance peptide, to survival of *Escherichia coli* Exposed to a lethal ciprofloxacin concentration. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 68(3), 196–202. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2014.153>
- Guevara, J., Maldonado, M., Valdez, D., Muro, R., y Matsumoto, I. (2021). Resistencia bacteriana: organismos del grupo ESKAPE. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. 41(3), 111–117.
- Hernández., L. (2017). Microorganismos presentes en larvas de *Comadia redtenbacheri* *Hammerschmidt* (Lepidoptera: Cossidae). <http://colposdigital.colpos.mx:8080/xmlui/handle/10521/3538>
- Hernández, L., Llanderal, C., Guzmán, A., y Aranda, S. (2015). Bacteria present in *Comadia redtenbacheri* larvae (Lepidoptera: Cossidae). *Journal of Medical Entomology*, 52(5), 1150–1158. <https://doi.org/10.1093/jme/tjv099>
- Herrera, M., Vargas, A., y Campos, M. (1998). Aislamientos de *Enterococcus* spp., resistentes a la vancomicina, en muestras de heces de niños costarricenses. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 33(1–2), 29–38.
- Holmes, A., Moore, L., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., Guerin, P., y Piddock, L. (2016). Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet*, 387(10014), 176–187. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00473-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00473-0)
- Krishnan, M., Bharathiraja, C., Pandiarajan, J., Prasanna, V. A., Rajendhran, J., y Gunasekaran, P. (2014). Insect gut microbiome – An unexploited reserve for biotechnological application. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4, S16-S21. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C95>
- Kohanski, M., Dwyer, D., y Collins, J. (2010). How antibiotics kill bacteria: From targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, 8(6), 423–435. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2333>
- Lapenda, J., Silva, P., Vicalvi, M., Sena, K., y Nascimento, C. (2015). Antimicrobial activity of prodigiosin isolated from *Serratia marcescens* UFPEDA 398. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(2), 399–406. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1793-y>

- Little, A., y Currie, C. (2007). Symbiotic complexity: Discovery of a fifth symbiont in the attine ant–microbe symbiosis. *Biology Letters*, 3(5), 501–504. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2007.0253>
- López, S., y López-Brea, M. (2000). ¿Qué debemos saber acerca de las infecciones por *Acinetobacter baumannii*? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 18(3), 153–156.
- Mathew, M., Ju, Y.-M., Lai, C.-Y., Mathew, D. C., y Huang, C. C. (2012). Microbial community analysis in the termite gut and fungus comb of *Odontotermes formosanus*: The implication of *Bacillus* as mutualists. *FEMS Microbiology Ecology*, 79(2), 504–517. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01232.x>
- McEwen, S., y Collignon, P. (2018). Antimicrobial Resistance: a one health perspective. *Microbiology Spectrum*, 6(2), 6.2.10. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017>
- Menegatti, C., Lourenzon, V., Rodríguez-Hernández, D., da Paixão Melo, W., Ferreira, L., Andricopulo, A., do Nascimento, F., y Pupo, M. (2020). Meliponamycins: Antimicrobials from stingless bee-associated *Streptomyces* sp. *Journal of Natural Products*, 83(3), 610–616. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01011>
- Miller, W., Munita, J., y Arias, C. (2014). Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 12(10), 1221–1236. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.956092>
- Miranda-Navales, M., Flores-Moreno, K., López-Vidal, Y., Rodríguez-Álvarez, M., Solórzano-Santos, F., Soto-Hernández, J. L., Ponce De León-Rosales, S., y Network, U. (2019). Antimicrobial resistance and antibiotic consumption in Mexican hospitals. *Salud Pública de México*, 62(1), 42. <https://doi.org/10.21149/10543>
- Molina, J., Cordero, E., Palomino, J., y Pachón, J. (2009). Aminoglucósidos y polimixinas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(3), 178–188. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.02.001>
- Moreau, C. (2020). Symbioses among ants and microbes. *Current Opinion in Insect Science*, 39, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.01.002>
- Morrison, L., y Zembower, T. R. (2020). Antimicrobial Resistance. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*, 30(4), 619–635. <https://doi.org/10.1016/j.giec.2020.06.004>
- Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F.,

- Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., y Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- OMS. (2017). *Sistema mundial de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos: Manual para la primera fase de implementación*. Organización Mundial de la Salud. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/253135>
- OMS. (2016). *Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos*. <https://www.who.int/es/publications/i/item/9789241509763>
- OMS. (2017). *Lista OMS de patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos*. <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- OMS. (2020). *Resistencia a los antimicrobianos*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- OMS. (2022). *Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS)*. <https://www.who.int/initiatives/glass>
- O'Neill, J. (2014). *Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations*. 20, 1–16.
- OPS. (2021). *Semana mundial de concientización sobre el uso de los antimicrobianos 2021*. <https://www.paho.org/es/campanas/semana-mundial-concientizacion-sobre-uso-antimicrobianos-2021>
- OPS/OMS. (2019). *Resistencia a los antimicrobianos*. <https://www.paho.org/es/temas/resistencia-antimicrobianos>
- OPS/OMS. (2021). *Patógenos multirresistentes que son prioritarios para la OMS*. <https://www.paho.org/es/noticias/4-3-2021-patogenos-multirresistentes-que-son-prioritarios-para-oms>
- Ortiz, D. (2013). Actividad de *Serratia marcescens* sobre tres hongos de uso comercial para el control biológico de la hormiga arriera, *Atta cephalotes*. *Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle*, 14(2), 33–34.
- Pasachova, J., Ramírez, S., y Muñoz, L. (2019). *Staphylococcus aureus*: Generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. *Nova*, 17(32), 25–38.
- Paz, V., Mangwani, S., Martínez, A., Álvarez, D., Solano, S., y Vázquez, R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: Patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección

urinaria. *Revista Chilena de Infectología*, 36(2), 180–189. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182019000200180>

Plan Universitario de Control a la Resistencia Antimicrobiana (PUCRA). (2021). *Declaración para el control de la resistencia antimicrobiana CDMX 2021* (pp. 1–4). <http://www.puis.unam.mx/declaracionControlRAMCDMX.pdf>

Plan Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana (PUCRA). (2019, noviembre). *Segundo Reporte de los Hospitales de la Red del PUCRA: Resistencia antimicrobiana y consumo de antimicrobianos*. <http://www.puis.unam.mx/>

Ponce de León-Rosales, S., Arredondo-Hernández, R., y López-Vidal, Y. (2015). La resistencia a los antibióticos: Un grave problema global. *Gaceta Médica de México*, 151(5), 681–689.

Poveda, J. (2019). The microorganisms associated with insects and their application in agriculture. *Revista Digital Universitaria*, 20(1). <https://doi.org/10.22201/codeic.16076079e.2019.v20n1.a2>

Programa Universitario de Investigación en Salud. (2018). *Plan universitario de control de la resistencia antimicrobiana*. <http://www.puis.unam.mx/>

Ríos, L. (2014). Biodiversidad de hormigas en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 392–398. <https://doi.org/10.7550/rmb.32519>

Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G. A., Macielag, M., Abbanat, D., Hye Park, C., Bush, K., y Hooper, D. (2006). Fluoroquinolone-modifying enzyme: A new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nature Medicine*, 12(1), 83–88. <https://doi.org/10.1038/nm1347>

Rodríguez-Martínez, J. (2005). Mecanismos de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 23(1), 25–31. <https://doi.org/10.1157/13070406>

Rodríguez-Palomares, C., y Obrador-Vera, G. (2013). Capítulo 12: Antibióticos macrólidos y lincosamidas. En *Fichero Farmacológico* (1a ed., p. 820). McGRAW-HILL.

Rodríguez-Palomares, C., y Obrador-Vera, G. (2013). Capítulo 15: Antibacterianos tetraciclinas y cloranfenicol. En *Fichero Farmacológico* (1a ed., p. 820). McGRAW-HILL.

Romero-González LE, Rojas-Vargas J, Muriel-Millán LF, Bustos-Martínez J, Bustamante VH, Pardo-López L. (2023) Genomic and phenotypic characterization of *Pseudomonas* sp. GOM7, a novel marine bacterial species with antimicrobial activity against multidrug-

- Sánchez, M., Hernández, O., Velásquez, L., Rivas, D., Marín, A., González, L., y Duque, C. (2013). Caracterización del gen *mecA* de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina aislados de tres grupos poblacionales de la ciudad de Medellín. *Infectio*, 17(2), 66–72.
- Schwalbe, R., Steele-Moore, L., y Goodwin, A. (2007). *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*. CRC Press.
- Shao, Y., Chen, B., Sun, C., Ishida, K., Hertweck, C., y Boland, W. (2017). Symbiont-derived antimicrobials contribute to the control of the Lepidopteran gut microbiota. *Cell Chemical Biology*, 24(1), 66-75. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.11.015>
- SEGOB. (2018). *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. http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5525043&fecha=05/06/2018
- Silva-Junior, E., Ruzzini, A., Paludo, C., Nascimento, F., Currie, C., Clardy, J., y Pupo, M. (2018). Pyrazines from bacteria and ants: Convergent chemistry within an ecological niche. *Scientific Reports*, 8(1), 2595. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20953-6>
- Suárez, C., y Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>
- Van Arnem, E., Ruzzini, A., Sit, C., Horn, H., Pinto-Tomás, A., Currie, C., y Clardy, J. (2016). Selvamycin, an atypical antifungal polyene from two alternative genomic contexts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(46), 12940–12945. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613285113>
- Van Moll, L., De Smet, J., Cos, P., y Van Campenhout, L. (2021). Microbial symbionts of insects as a source of new antimicrobials: A review. *Critical Reviews in Microbiology*, 47(5), 562–579. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2021.1907302>
- Verpoorte, R. (1998). Exploration of nature's chemodiversity: The role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug Discovery Today*, 3(5), 232–238. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(97\)01167-7](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(97)01167-7)
- Vicente, D., y Pérez-Trallero, E. (2010). Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(2), 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.10.002>

- Vieira, A., Ramalho, M., Martins, C., Martins, V., y Bueno, O. (2017). Microbial communities in different tissues of *Atta sexdens rubropilosa* leaf-cutting ants. *Current Microbiology*, 74(10), 1216–1225. <https://doi.org/10.1007/s00284-017-1307-x>
- Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64(1), 3–19. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00300-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00300-5)
- Xie, S., Lan, Y., Sun, C., y Shao, Y. (2019). Insect microbial symbionts as a novel source for biotechnology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(2), 25. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2599-8>
- Yi, Y., Zhang, Z., Zhao, F., Liu, H., Yu, L., Zha, J., y Wang, G. (2018). Probiotic potential of *Bacillus velezensis*: Antimicrobial activity against fish pathogenic bacteria and immune enhancement effects on *Carassius auratus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 78, 322–330. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.04.055>
- Zhang, L., Song, T., Wu, J., Zhang, S., Yin, C., Huang, F., Hang, Y., Abbas, N., Liu, X., y Zhang, Y. (2020). Antibacterial and cytotoxic metabolites of termite-associated *Streptomyces* sp. BYF63. *The Journal of Antibiotics*, 73(11), 766–771. <https://doi.org/10.1038/s41429-020-0334-1>
- Zhukova, M., Sapountzis, P., Schiøtt, M., y Boomsma, J. (2017). Diversity and transmission of gut bacteria in *Atta* and *Acromyrmex* leaf-cutting ants during development. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1942. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01942>

13. ANEXOS

➤ ANEXO 1. PREPARACIÓN DE NISTATINA Y MEDIOS DE CULTIVO CON NISTATINA

Para la preparación de un stock de 10 ml de nistatina a una concentración de 20 mg/ml, se pesan 0.2 g de polvo de nistatina y se adicionan a un tubo Falcon con 10 ml de agua MiliQ estéril. Se mezcla perfectamente y se conserva el stock a 4°C.

Para la preparación de medios con nistatina, templar el medio de cultivo al que se le agregará la nistatina, sin dejar que éste empiece a solidificarse. Después, agregar 250 µl de nistatina (del stock con concentración 20 mg/ml) al medio de cultivo deseado con volumen de 250 ml. Este medio de cultivo tendrá una concentración final de nistatina de 20 µg/ml. Homogenizar perfectamente. Vaciar el medio de cultivo con nistatina a cajas Petri y dejar solidificar. Conservar las cajas a 4 °C hasta su utilización.

➤ ANEXO 2. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

- **Agar LB**

Disolver 25 g del polvo de medio LB en 1 litro de agua destilada. Adicionar 15 g de bacto agar. Mezclar bien y disolver calentando con agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta disolver por completo. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Templar y vaciar el medio de cultivo a cajas Petri, dejar solidificar. Conservar las cajas a 4 °C hasta su utilización.

- **Agar PY**

Pesar los componentes señalados en la Tabla 17 y resuspender en 1 litro de agua destilada. Calentar agitando suavemente y hervir durante 1 o 2 minutos para disolución total. Aparte, prepara una solución de cloruro de calcio (CaCl_2) 10.47 g/100ml. Esterilizar en autoclave ambas preparaciones a 121°C durante 15 minutos. Templar y agregar al medio 1 ml de CaCl_2 por cada 100 ml de medio. Homogeneizar perfectamente y vaciar el medio de cultivo a cajas Petri, dejar solidificar. Conservar las cajas a 4 °C hasta su utilización.

Tabla 17. Formula de preparación del medio agar PY

Componentes	Cantidad
Extracto de levadura	3 g
Peptona de caseína	5 g
Agar	15 g

- **Agar MacConkey**

Se pesan 50 g del polvo de agar MacConkey y se resuspende en 1 litro de agua destilada. Reposar 5 minutos. Calentar con agitación frecuente y llevar a ebullición 1 a 2 minutos hasta disolver completamente. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Templar y vaciar el medio de cultivo a cajas Petri, dejar solidificar. Conservar las cajas a 4 °C hasta su utilización.

- **Agar sal y manitol**

Resuspender 111 g del polvo de medio agar sal y manitol en 1 litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y calentar con agitación frecuente, llevando a ebullición durante 1 o 2 minutos para disolución total. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Templar y vaciar el medio de cultivo a cajas Petri, dejar solidificar. Conservar las cajas a 4 °C hasta su utilización.

- **Agar TSA**

Disolver 40 g del polvo de agar TSA en 1 litro de agua destilada. Mezclar y reposar 5 minutos. Calentar agitando suavemente y hervir durante 1 o 2 minutos para disolución total. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Templar y vaciar el medio de cultivo a cajas Petri, dejar solidificar. Conservar las cajas a 4 °C hasta su utilización.

- **Agar *Pseudomonas***

Resuspender 46.4 g del polvo agar *Pseudomonas* en 1 litro de agua destilada. Agregar 10 ml de glicerina. Calentar con agitación constante para homogeneizar el producto. Llevar a ebullición para que se disuelva por completo. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Templar y vaciar el medio de cultivo a cajas Petri, dejar solidificar. Conservar las cajas a 4 °C hasta su utilización.

- **Agar *Streptomyces***

Pesar todos los componentes señalados en la Tabla 18 y resuspender en 1 litro de agua destilada. Calentar agitando suavemente y hervir durante 1 o 2 minutos para disolución total. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Templar y vaciar el medio de cultivo a cajas Petri, dejar solidificar. Conservar las cajas a 4 °C hasta su utilización.

Tabla 18. Fórmula de preparación del medio *Streptomyces*

Componentes	Cantidad
Extracto de malta	10 g
Extracto de levadura	4 g
Dextrosa	4 g
Carbonato de calcio	2 g
Agar	12 g

➤ ANEXO 3. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

Para la extracción de AND total se utilizó el kit *GenElute™ Bacterial Genomic DNA* de la marca Sigma-Aldrich, siguiendo el protocolo de extracción incluido en el kit, el cual consiste en:

- Preparar:
 - Baño de agua o bloque calentador a 37 °C
 - Bloque calentador a 55 °C
 - Lisozima a 45 mg/mL
 - Lisostafina (para *Staphylococcus*)
- **A. Preparación de bacterias Gram-negativas**

1a. Recolecta de células

Concentrar 1.5 ml de un cultivo bacteriano de toda la noche mediante centrifugación durante 2 minutos a 12.000–16.000 × g. Retirar completamente el medio de cultivo y desecharlo.

2a. Resuspender células

Volver a suspender completamente el pellet de células en 180 µl de solución de lisis T/buffer STL para el kit de ADN genómico de mamíferos GenElute™ (B6678). Si el ARN residual no es una preocupación, continuar con el paso 3a. Tratamiento opcional con ARNasa A: si se requiere ADN genómico sin ARN, agregar 20 µL de solución de ARNasa A (R6148), mezclar e incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente, luego continuar con el paso 3a.

3a. Lisis celular

Agregar 20 µL de la solución de Proteinasa K a la muestra. Mezclar e incubar durante 30 minutos a 55 °C.

4a. Células lisadas

Agregar 200 µL de la Solución de lisis C (B8803), agitar en el vórtex completamente (alrededor de 15 segundos) e incubar a 55 °C durante 10 minutos. Una mezcla homogénea es esencial para una lisis eficiente. Continúe con el paso 5.

- **B. Preparación de bacterias Gram-positivas**

1b. Preparar la solución de lisozima utilizando lisozima de clara de huevo de gallina (L4919). Preparar una solución madre de lisozima de $2,115 \times 10^6$ unidades/mL como se describe en las Instrucciones de preparación. Para cada extracción de ADN a realizar, se requieren 200 μ L de Solución de Lisozima. Preparar una solución adicional para tener en cuenta el error de pipeteo.

Nota: Si se trabaja con especies de estafilococos, complementar la solución de lisozima con 200 unidades/mL de Lisostafina. Para las especies de *Streptococcus*, complementar la solución de lisozima con 250 unidades/ml de mutanolisina (M9901).

2b. Recolecta de células

Concentrar 1.5 ml de un cultivo bacteriano de toda la noche mediante centrifugación durante 2 minutos a $12.000\text{--}16.000 \times g$. Retirar completamente el medio de cultivo y desecharlo.

3b. Resuspender células

Volver a suspender completamente el pellet bacteriano en 200 μ L de solución de lisozima (preparada en el paso 1b) e incubar durante 30 minutos a 37 °C.

Tratamiento opcional con ARNasa A: si el ARN residual no es un problema, continuar con el paso 4b. Si se requiere ADN genómico libre de ARN, agregar 20 μ L de solución de ARNasa A e incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente, luego continuar con el paso 4b.

4b. Lisis celular

Agregar 20 μ L de la solución de proteinasa K a la muestra, seguido de 200 μ L de Solución de lisis C. Mezclar bien (durante 15 segundos) e incubar a 55 °C durante 10 minutos. Una mezcla homogénea es esencial para una lisis eficiente. Continuar con el paso 5.

- **Aislamiento de ADN de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas**

Esta es una continuación del procedimiento de los lisados preparados en los pasos 1–4a y/o pasos 1–4b.

5. Preparación de la columna

Agregar 500 μ l de la solución de preparación de columna a cada columna de unión GenElute™ Miniprep preensamblada, asentada en un tubo de recolección de 2 ml. Centrifugar a $12.000 \times g$ durante 1 minuto. Desechar el líquido sobrante.

Nota: la solución de preparación de columnas maximiza la unión del ADN a la membrana, lo que da como resultado rendimientos más uniformes.

6. Preparación de la unión

Agregar 200 μL de etanol (95–100 %) al lisado celular y mezclar bien durante 5–10 segundos. Una mezcla homogénea es esencial.

7. Carga del lisado

Transferir todo el contenido del tubo a la columna de unión. Utilizar una punta de pipeta de calibre ancho para reducir pérdidas de ADN al transferir el contenido a la columna. Centrifugar a $\geq 6500 \times g$ durante 1 minuto. Desechar el tubo de recolección que contiene el líquido sobrante y coloque la columna en un nuevo tubo de recolección de 2 ml.

8. Primer lavado

Agregar 500 μL de solución de lavado 1 a la columna y centrifugar durante 1 minuto a $\geq 6500 \times g$. Desechar el tubo de recolección que contiene el líquido sobrante y coloque la columna en un nuevo tubo de recolección de 2 mL.

9. Segundo lavado

Agregar 500 μL de solución de lavado a la columna y centrifugar durante 3 minutos a máxima velocidad (12 000–16 000 $\times g$) para secar la columna. La columna debe estar libre de etanol antes de eluir el ADN.

Centrifugar la columna durante 1 minuto más a máxima velocidad si se observa etanol residual. Se puede vaciar y reutilizar el tubo de recolección si se necesita este paso de centrifugado adicional. Finalmente, desechar el tubo de recolección que contiene el líquido sobrante y colocar la columna en un tubo eppendorf nuevo de 1,5 ml.

10. Eluir ADN

Pipetear 80 μL de agua Milli-Q directamente en el centro de la columna; centrifugar durante 1 minuto a $\geq 6500 \times g$ para eluir el ADN. Para aumentar la eficiencia de elución, incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente después de agregar el agua Milli-Q, luego centrifugar.

➤ ANEXO 4. PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR

Los productos de PCR se purificaron utilizando el kit *DNA Clean and Concentrator* de la marca *Zymo Research*, siguiendo el protocolo de extracción incluido en el Kit el cual consiste en:

*Nota: considerar que todos los pasos de centrifugación deben realizarse entre 10000 y 16000 x g.

En un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, agregar de 2 a 7 volúmenes de buffer de unión de ADN por cada volumen de muestra de ADN (consultar la tabla 19). Mezclar brevemente mediante vortex. Transferir la mezcla a una columna Zymo-Spin™ ensamblada en un tubo de recolección. Centrifugar durante 30 segundos. Desechar el líquido sobrante. Agregar 200 µl de buffer de lavado de ADN a la columna. Centrifugar a 30 segundos. Repetir el paso de lavado. Añadir ≥ 25 µl de buffer de elución de ADN o agua directamente a la matriz de la columna e incubar a temperatura ambiente durante un minuto. Transferir la columna a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y centrifugar durante 30 segundos para eluir el ADN. El ADN ultrapuro ya está listo para su uso.

Tabla 19. Volumen de buffer de unión de ADN a agregar por cada volumen de muestra de ADN

Aplicación	Buffer de unión de ADN: Muestra	Ejemplo
Plásmido, ADN genómico (>2kb)	2:1	200 µl: 100 µl
Producto de PCR, Fragmento de ADN	5:1	500 µl: 100 µl
ssDNA (Ej. cDNA, Fago M13)	7:1	700 µl: 100 µl