UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTI-BACTERIANA DE BACTERIAS AISLADAS DEL GOLFO DE MÉXICO

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I Ó L O G O
P R E S E N T A:

FERNANDO ANTONIO LÉVARO DOMÍNGUEZ

DIRECTORES

DR. VÍCTOR HUMBERTO BUSTAMANTE SANTILLÁN

DRA. DEYANIRA PÉREZ MORALES

CUERNAVACA, MORELOS **MAYO, 2023**

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado con el donativo CONACYT-Problemas Nacionales no. 2017-01-5182, con los recursos para mi proyecto de investigación y una beca de 5 meses para mí.

A mis padres,
por inculcarme sus valores, brindarme su guía y comprensión, por darme la atención y cariño que sirvió para alcanzar mis objetivos,
por siempre estar cuando los necesito.

A mi tío, el Dr. Fernando Lévaro,
por toda su ayuda, apoyo e interés,
por compartir su experiencia y cariño y por ser parte esencial de mi proceso formativo.

A mi tutor, el Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán,
Por darme la oportunidad y confianza de ser parte este proyecto, por siempre estar disponible cuando lo necesité, por sus enseñanzas y ampliar mi noción científica.

A mi codirectora, la Dra. Deyanira Pérez Morales,
Por enseñarme todo lo que se necesita para trabajar en un laboratorio, por su tutela indispensable y fundamental dedicación, apoyo y comprensión.

A Rebeca Herrera Trujillo,
por su disposición para ayudarme y estar pendiente de mí en el laboratorio y su confortable interés.

A mis sinodales,
la Dra. Verónica Obregón Barboza, por sus amables consejos, recomendaciones y observaciones que enriquecieron este proyecto, a la Dra. Liliana Pardo López, por sus aportaciones en el desarrollo del proyecto y ofrecer las cepas que se estudiaron y al Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís, por sus críticas y análisis que fortalecieron al proyecto.

A la Facultad de Ciencias Biológicas de la UAEM,
por la formación de calidad que me han dado, las divertidas experiencias y oportunidades que me han entregado. A mis profesores por sus enseñanzas y hacerme interesante la carrera. Al personal administrativo de mi facultad, por siempre darme un trato de excelencia y sus atenciones conmigo, en especial a Minerva Herrera Mejía, a la Biól. Sara Gutiérrez García y a la C.P. Sandra Cleotilde Aragón Salgado.

Índice

I. INTRODUCCIÓN……..... 1

1.1 Los antibióticos……... 1

1.1.1 Mecanismos de acción de los antibióticos e infección bacteriana……... 1

1.2 La resistencia a los antibióticos……...……...…..... 3

1.2.1 Concentración mínima inhibitoria……...….. 4

1.2.2 Presión de selección por antibióticos……..... 4

1.3 Mecanismos de resistencia a los antibióticos…….. 4

1.4 El uso incorrecto de los antibióticos…….....…..... 6

1.5 Acciones contra la resistencia a los antibióticos……..… 6

1.5.1 Factores que contribuyen a generar la resistencia a los antibióticos……..… 8

1.5.2 Los antibióticos en la profilaxis y promoción del crecimiento……..... 10

1.6 Defunciones por bacterias resistentes a los antibióticos……..... 12

1.6.1 La industria farmacéutica en el desarrollo de los antibióticos……. 12

1.7 Fuentes usuales de los antibióticos……. 14

1.7.1 Nuevas fuentes de antibióticos…….…… 14

II. ANTECEDENTES……..… 15

2.1 El ambiente marino como fuente de nuevos antibióticos……...…. 15

2.1.1 Las profundidades marinas, un reservorio de moléculas antibacterianas…….…… 15

2.1.2 El Golfo de México, un hábitat único…….…….. 17

3.1 Bacterias patógenas…….…….... 18

4.1 Acinetobacter baumannii……...……..…. 18

5.1 Salmonella enterica…….……..… 21

6.1 Pseudomonas aeruginosa……..…….…….. 23

III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN…….……....……. 24

IV. JUSTIFICACIÓN……....……..….. 24

V. HIPÓTESIS……..... 25

VI. OBJETIVOS…….……..... 25

Objetivo general…….… 25

Objetivos particulares…….… 25

VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL…….…….… 26

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS……..... 26

7.1 Obtención de cepas bacterianas y almacenamiento……... 26

7.2 Evaluación de la actividad antibacteriana…….……. 27

7.2.1 Preparación de los inóculos…….……..... 27

7.2.2 Actividad antibacteriana…….....… 27

7.2.3 Determinación de la producción de piocianina……...… 28

IX. RESULTADOS……....… 29

9.1 Determinación de la actividad antibacteriana……....… 29

9.2 El efecto antibacteriano de las cepas marinas LP 34, LP 35 y LP 36 probablemente se debe a la producción de piocianina……...…….……...……..... 30

X. DISCUSIÓN……....…….....… 38

XI. CONCLUSIONES……..…. 40

XII. PERSPECTIVAS……..…. 40

XIII. REFERENCIAS……...……...……. 41

I. Introducción

En la historia de la humanidad, durante la época previa al descubrimiento de los antibióticos, las principales causas de muerte fueron atribuidas a enfermedades infecciosas producidas por una amplia gama de microorganismos patógenos [1]. En el siglo XX el panorama cambió con el descubrimiento e introducción de los antibióticos, siendo Alexander Fleming el autor del hallazgo del primer antibiótico, la penicilina (1928). Posterior al descubrimiento de la penicilina se descubre la acción bactericida del rojo de prontosil (la primera sulfamida) sobre el neumococo y otros estreptococos *in vivo*, por Gerhard Domagk (1930) [2]. A partir de entonces, una gran variedad de otros antibióticos fue descubierta e inició una nueva era en el desarrollo humano.

1.1 Los antibióticos

Los antibióticos (AB) son moléculas naturales (producidos por un organismo vivo hongo, bacteria o planta) [3], sintéticas o semisintéticas, capaces de actuar en una o más áreas del funcionamiento de las bacterias y suscitar dos efectos: la muerte de la bacteria, designándose entonces como agentes bactericidas, o inhibiendo el desarrollo y reproducción de la bacteria, denominándose entonces agentes bacteriostáticos. De acuerdo con el espectro de acción de los AB (rango de bacterianas patógenas en las que actúe un antibiótico), pueden actuar tanto contra bacterias Gram positivas como Gram negativas, o bien solo ser eficaz contra familias específicas de bacterias. Ubicándolos como: de espectro reducido o estrecho en el caso de los AB de primera generación; de espectro aumentado refiriendo a AB de segunda generación; de amplio espectro constituido por AB de tercera generación, y de espectro mejorado aludiendo a los AB cuarta generación [4].

1.1.1 Mecanismos de acción de los antibióticos e infección bacteriana

La forma en que actúan los AB es uniéndose a componentes o factores que son esenciales para la supervivencia de las bacterias, como pueden ser el ribosoma, inhibiendo la síntesis de proteínas o la síntesis de su ADN; también hay AB que pueden dañar las paredes o membranas celulares, interfiriendo con la biosíntesis o propiamente generar rupturas en ellas, entre otros mecanismos (Tabla 1) [5]. Sin embargo, a través de un proceso de selección, las bacterias han desarrollado mecanismos de resistencia en respuesta a la acción de los antibióticos, por lo que estos pierden su efecto sobre las bacterias.

Tabla 1

Clasificación de los antibióticos de acuerdo a su mecanismo de acción.

Clasificación de los antibióticos de acuerdo a su mecanismo de acción		
Mecanismos de acción	**Descripción**	**Ejemplos**
Inhibición de la síntesis de la pared celular	Actúan a distintos niveles de la biosíntesis del peptidoglucano y el daño se produce por la pérdida de la rigidez de la célula bacteriana	Penicilinas, cefalosporinas, vancomicina, bacitracina, oxacilina, nafcilina o β-lactámicos
Daño a la membrana plasmática	Su acción es desorganizar la permeabilidad de la membrana ocasionando la salida de cationes de la célula bacteriana	Polimixina, nistatina, anfotericina B
Inhibición de la síntesis de proteínas	Los ribosomas 70S bacterianos están constituidos por dos subunidades designadas como subunidad 30S y subunidad 50S. Estas subunidades constituyen el sitio de acción de antibióticos, localizándose en ellas proteínas específicas a las cuales se unen los AB	Aminoglucósidos, cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina
Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos e interconversión de nucleótidos	Pueden interferir con polimerasas involucradas en la replicación y transcripción del ADN. O interferir con la síntesis de purinas y pirimidinas dando lugar a interconversión de nucleótidos o actuando como análogos de nucleótidos e incorporarse a la cadena de polinucleótidos	Trimetoprim, sulfonamidas
Antimetabolitos	Interfieren en el metabolismo de los folatos, por bloqueo competitivo en la biosíntesis de los tetrahidrofolatos precursores del ácido fólico	Trimetoprim, sulfonamidas
Antifímicos	Antituberculosos	Etambutol, pirazinamida, isoniazida, estreptomicina, rifampicina

Tabla 1. Mecanismo de acción que presentan los antibióticos, clasificados en siete grupos. Modificado de: http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/terapeutica.html

Algunas bacterias forman parte de la microbiota natural del humano, interactuando en relaciones interespecíficas como el mutualismo; por ejemplo, formando parte de nuestro sistema inmune, fungiendo como comensales al aprovechar las condiciones y nutrientes presentes en el organismo sin perjudicar al hospedero, o parásitas como es el caso de las bacterias patógenas [6, 7, 8]. Sin embargo, en algunos casos las bacterias comensales pueden volverse en nuestra contra (en el caso de bacterias patógenas comensales) y cambiar a una función patológica, si las condiciones del organismo le permiten proliferar e incluso migrar y alojarse fuera de su nicho habitual. Por mencionar algunos de estos nichos, destacan la piel, las membranas mucosas y también el intestino. Al desplazarse a otros órganos y tejidos, estos microorganismos con potencial patógeno pueden colonizar, invadir y dañar el tejido infectado [9]. Este ejemplo sirve para ilustrar dos factores determinantes en la infección bacteriana. Primero, la capacidad patogénica de una bacteria para causar enfermedades, pues una bacteria patógena cuenta con una serie de factores que facilitan que aumente su grado de virulencia. En segundo lugar, un hospedero inmunodeprimido es más susceptible a adquirir infecciones por bacterias oportunistas, a diferencia de una persona sana; sin embargo, esto no es necesariamente estricto, pues bien, hay bacterias que pueden infectar a individuos sanos, como es el caso de *Salmonella enterica*. En síntesis, la virulencia y el estado inmunitario del organismo son factores cruciales para el desarrollo de una enfermedad bacteriana.

1.2 La resistencia a los antibióticos

Es importante señalar que ha existido una coevolución entre bacterias y hospederos durante miles de años; los patógenos se adaptaron a colonizar diferentes nichos del hospedero [9]. El punto de gran relevancia en la actualidad, es la emergencia de bacterias resistentes a los antibióticos, en algunos casos a todos; un problema que disminuye las posibilidades de obtener tratamientos clínicos exitosos para la erradicación de estas bacterias patógenas, además de incrementar los costos de tratamiento, así como las tasas de morbilidad y mortalidad [10,11]. La resistencia a los antibióticos es un proceso muy antiguo que existe de manera natural en el ambiente, este problema se explica a partir del origen de la mayoría de los microorganismos productores de los antibióticos utilizados [12]. Recordando que la mayoría de los antibióticos han sido aislados de bacterias del suelo, las cuales producen sustancias antimicrobianas para inhibir a otros microorganismos, como es el caso de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa,* la cual produce metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana; por ejemplo, la piocianina (una agente oxidante que interfiere con el metabolismo celular de microbios). Al igual que todos los organismos, las bacterias han desarrollado mecanismos biológicos que las facultan para adecuarse e imponerse a diversas condiciones adversas, como la producción de compuestos que inhiben el crecimiento o matan microorganismos competidores [13]. Prueba de la antigüedad de la resistencia a los antibióticos son genes de resistencia encontrados en muestras del permahielo de 30,000 años de antigüedad [14, 15, 16]. Asimismo, en estas especies productoras de sustancias antibacterianas existen de manera innata genes de resistencia que evitan la autotoxicidad [12].

1.2.1 Concentración mínima inhibitoria

La efectividad de los antibióticos se sustenta en someter a las bacterias patógenas a una concentración mínima del antibiótico que no puedan tolerar, para conseguir erradicarlas, lo que se conoce como concentración mínima inhibitoria (MIC). El problema existe cuando la concentración mínima inhibitoria no es suficiente para eliminar a las bacterias, ya que se adaptan para neutralizar el efecto de los antibióticos, y como consecuencia se tienen que elevar las dosis del antibiótico, lo que puede resultar contraproducente, dado que elevar las dosis estandarizadas del antibiótico puede inducir efectos tóxicos en el organismo [17].

1.2.2 Presión de selección por antibióticos

La resistencia inducida por los antibióticos es promovida por la exposición constante o inferior a la MIC de estos medicamentos, lo cual genera una presión de selección sobre las bacterias, donde se mantiene la perpetuidad de las especies que se han adaptado al efecto de los antibióticos. Significa que, así como pueden desarrollar mecanismos para inhibir el efecto de los antibióticos de primera generación, pueden hacerlo con los de segunda, tercera e incluso con los de cuarta generación simultáneamente, a estos microorganismos "multidrogoresistentes (MDR)" se les denomina típicamente "superbacterias".

El problema de la resistencia a los antibióticos no atañe exclusivamente a las bacterias patógenas, contra las que está dirigido el antibiótico. Como ya se mencionó anteriormente, en la microbiota intestinal, habitualmente residen microrganismos comensales con potencial patógeno (patógenos facultativos) conocidos como patobiontes, que no ocasionan ningún problema cuando la microbiota intestinal se encuentra en correcto equilibro (mayormente bacterias simbióticas que protegen al intestino de la colonización de bacterias patógenas) y el intestino se encuentra saludable. No obstante, en determinadas circunstancias, la proporción de los patobiontes puede ser mayor, produciendo así, distintas patologías. Al igual que las bacterias patógenas expresan distintos mecanismos de resistencia, los patobiontes también cuentan con ellos o pueden adquirirlos, gracias a la transferencia (horizontal) de determinantes de resistencia. El problema se agrava cuando la población de los patobiontes prolifera en la cantidad suficiente para ocasionar enfermedades infecciosas que no pueden ser tratadas con antibióticos, en el caso de que los patobiontes previamente adquirieron mecanismos de resistencia como consecuencia de la exposición constante a los antibióticos o bacterias que han sido expuestas a ellos, todo esto favorecido por un uso inadecuado de los antibiótico [18, 19].

1.3 Mecanismos de resistencia a los antibióticos

El incremento de bacterias resistentes también ha propiciado en paralelo la investigación y el aporte del conocimiento sobre los mecanismos moleculares de resistencia a los antibióticos. Los mecanismos que las bacterias desarrollan pueden ser intrínsecos, adaptativos o adquiridos (Tabla 2). Los primeros son innatos y van codificados en el genoma de la bacteria de manera natural, como ejemplo, pueden capacitar a la bacteria para que produzca enzimas que destruyan o modifiquen al fármaco, convirtiéndolo en

innocuo, o expresar sistemas de eflujo o de expulsión, los cuales sacan al fármaco de la bacteria, evitando que se alcancen altas concentraciones intracelulares [16].

Entre los mecanismos adaptativos se encuentran las mutaciones aleatorias, adaptativas o compensatorias, que, mediante la deleción, modificación o inserción genética, pueden dotar a la bacteria de mecanismos como, modificar el sitio blanco del antibiótico o generar una vía metabólica alterna que evite que el fármaco alcance su objetivo molecular. También pueden expresar adaptaciones fenotípicas, como capacidad de producir biopelículas (aglomeraciones bacterianas en forma de capas viscosas), las cuáles brindan a la bacteria de una mayor protección al ambiente, por ende, menor susceptibilidad a los antibióticos, o modificación de acuaporinas, evitando así la entrada de moléculas antibacterianas [5, 10]. En cuanto a los mecanismos adquiridos se encuentra la transferencia horizontal de genes, que es el proceso que utilizan las bacterias para trasmitir los genes de resistencia o los determinantes específicos de resistencia a los antibióticos, ya sea entre mismas especies o incluso con distintos géneros. La trasferencia horizontal de genes puede darse por conjugación, transducción o transformación; dotando a la bacteria de la capacidad de resistir el efecto de los antibióticos, que posteriormente pueden heredar a células hijas por medio de la replicación.

Tabla 2

Mecanismos de resistencia bacteriana de acuerdo con el tipo de antibiótico.

Ejemplos de mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos	
Mecanismo de resistencia	**Ejemplos**
Enzimas que hidrolizan al anillo β-lactámico	Betalactamasas, cefalosporinasas
Modificación del receptor del antibiótico	Mutación en proteínas de unión a la penicilina
Inactivación del antibiótico	Acetilación del cloranfenicol
Inactivación del antibiótico	Acetilación de aminoglucósidos
Cambios en la permeabilidad de membrana	Tetraciclina, cloranfenicol
Metilación enzimática del RNA 23S	Eritromicina y lincomicina
Bombas de eflujo	Expulsan y evitan altas concentraciones del antibiótico
Bypass	Síntesis de una enzima resistente a la inactivación

Tabla 2. Algunos ejemplos de mecanismos de resistencia bacteriana de acuerdo con el tipo de antibiótico. Modificado de http://www microbiologia.facmed.unam.mx/deptos/ /bacteriologia/terapeutica.html

4.1 El uso incorrecto de los antibióticos

Los antibióticos son considerados como un bien público global, por lo tanto, su uso debe adecuarse a la importancia que les corresponden, pero en ocasiones se utilizan de manera inadecuada. En México han ocurrido casos de mala praxis de parte de los consumidores en cuanto al uso de estos medicamentos. Tal es el caso de la epidemia de influenza A (H1N1) ocurrida en 2010, ya que gran sector de la población optó por utilizar antibióticos disponibles en farmacias que no requieren receta médica para tratar sus síntomas. Esto provocó exacerbaciones del cuadro clínico (además de la exposición de la microbiota a los AB) ya que los antibióticos no tienen actividad contra infecciones víricas como la influenza, resultando contraproducente, dado que estos fármacos advierten diversos efectos adversos; asimismo, requieren un régimen de dosificación específico y de seguimiento clínico. Extrapolando el ejemplo anterior a la actualidad, la pandemia ocasionada por el coronavirus SARS-CoV-2 (COVID-19) en 2019, nos demostró el mismo fallo en el control, educación y uso pertinente de los antibióticos. En este caso la urgencia de encontrar un tratamiento para curar la infección de este virus llevó a la práctica clínica el uso de antibióticos de parte del personal de salud, alcanzando cifras de hasta 80% de antibióticos administrados en pacientes COVID-19 positivos. Entre estas prácticas, destaca la administración de "kits médicos" por parte del gobierno de la Ciudad de México, que incluían siete medicamentos distintos, en los cuales se incluía ivermectina y azitromicina (un antiparasitario de uso veterinario y un antibiótico, respectivamente) a pesar de las advertencias y evidencias de distintos organismos de salud acerca de su nula eficacia como tratamiento contra el SARS-CoV-2 [20, 21]. También se administraron AB en pacientes inmunosuprimidos para tratar o prevenir la coinfección por bacterias oportunistas, como es el caso de pacientes que requieren ser atendidos con equipos de ventilación mecánica [22, 23,24, 25, 26, 27, 28, 29]. Es así que, debido a la recurrencia de este mismo problema en todo el mundo, existen planteamientos para establecer regulaciones más estrictas sobre estos medicamentos indispensables [30, 31, 32, 33]

1.5 Acciones contra la resistencia a los antibióticos

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha instado a los países miembros a adoptar una estrategia nacional enfocada en el desarrollo e investigación de nuevos antibióticos, y en ánimos de evitar reincidir en el uso y mala gestión de los antibióticos, se busca añadir a la estrategia la introducción de acciones educativas, además de políticas regulatorias y de gestión. De esta manera se busca implementar el comienzo de un uso racional de los antibióticos, iniciando una nueva etapa de responsabilidad y así sacar el mejor provecho a estos fármacos [34].

En vista de que la resistencia a los antibióticos representa una amenaza que significa un problema de salud mundial, la OMS aprobó en el año 2015 un plan de acción mundial para enfrentar la resistencia bacteriana. Asimismo, publicó en el año 2017 la lista de patógenos prioritarios para la identificación de nuevos antibióticos (Figura 1), con el objetivo de "guiar y promover la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos" [35]. Para incluir a los patógenos de esta lista se consideraron los siguientes criterios, el grado de letalidad que las infecciones provocan, el tiempo de estancia de hospitalización prolongada, frecuencia con la que aparecen bacterias resistentes a los AB, fácil transmisibilidad entre animales, animales a humanos y entre humanos, si es posible prevenir la infección con medidas de higiene o

vacunación, la cantidad de opciones terapéuticas que quedan y si las bacterias patógenas se encuentran en investigación así como en desarrollo de nuevos AB que traten sus infecciones [35].

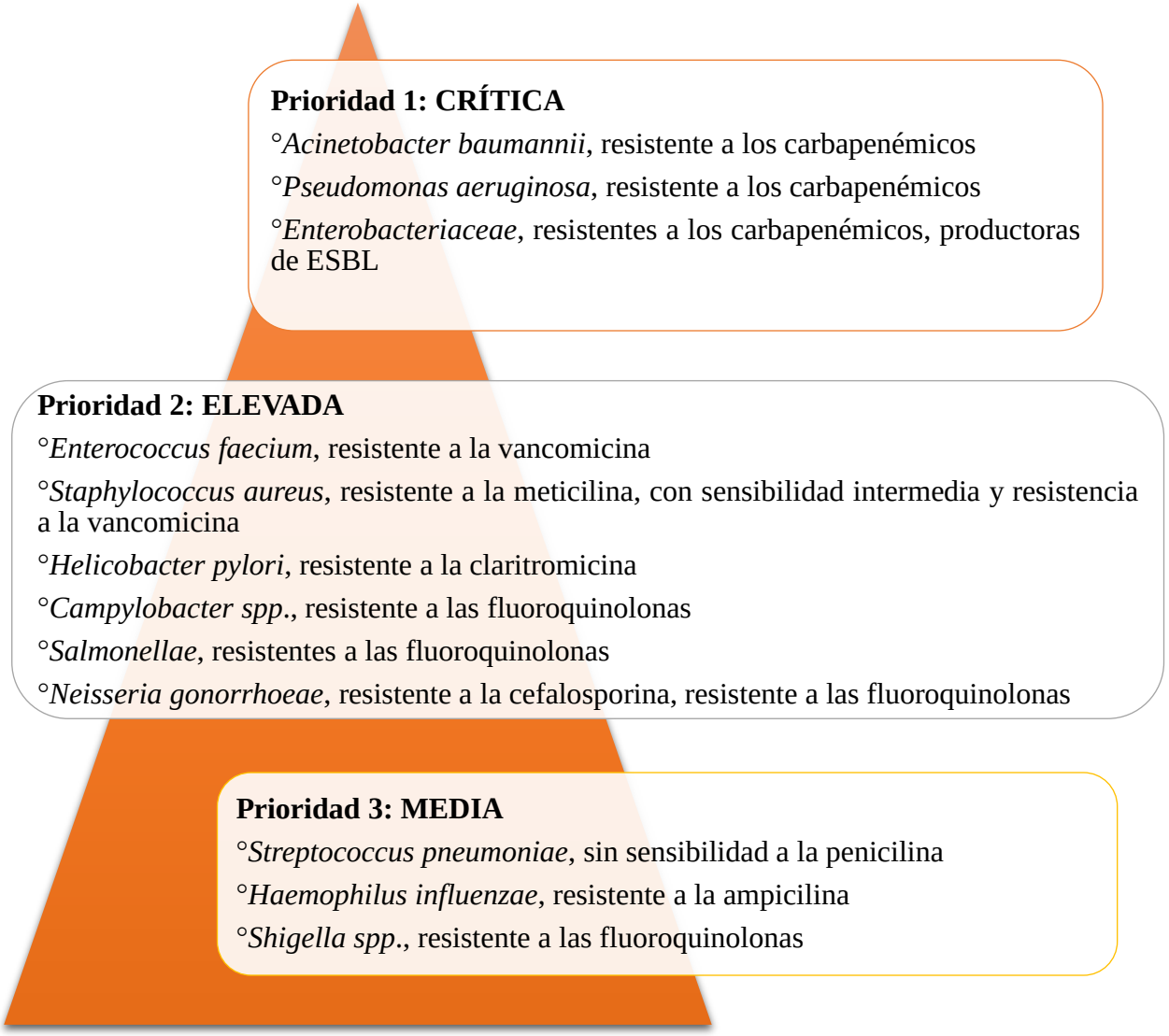


Figura 1. Lista publicada de la Organización Mundial de la Salud sobre patógenos prioritarios resistentes a los antibióticos, en la que se incluyen las 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana [36].

1.5.1 Factores que contribuyen a generar la resistencia a los antibióticos

La resistencia a los antibióticos se ha fundamentado hasta la actualidad como una crisis global que es promovida mayormente por el uso excesivo e inadecuado de los antibióticos, pero dentro la mala gestión de estos también existen algunos factores de riesgo que favorecen la proliferación de bacterias resistentes a los antibióticos, como los siguientes [37].

1. **Migración global:** la amplia variedad de medios de transporte disponibles en la actualidad proveen a las bacterias vías directas para diseminarse a escala mundial y colonizar distintas regiones del planeta, lo que aumenta el índice de infecciones bacterianas.
2. **Sobrepoblación:** una alta densidad poblacional promueve mayor incidencia de la transmisión de infecciones, facilitando el contagio entre individuos y una mayor dispersión y proliferación de las bacterias.
3. **Sector agropecuario:** en este ámbito se conocen diferentes maneras que favorecen la selección y proliferación de bacterias resistentes, que en conjunto conforman un "ciclo de resistencia a los antibióticos", en donde un sector fomenta la contaminación de otro. En principio los antibióticos deben ser utilizados para tratar a los animales enfermos y así controlar la propagación de enfermedades. En la ganadería también se han utilizado antibióticos como profilácticos y factores de crecimiento, con el objetivo de prevenir infecciones y aumentar el peso de los animales (ya que se ha observado que mejoran el rendimiento metabólico y los ayuda a ganar peso) [38, 39, 40]. En la agricultura, los cultivos se abonan con excrementos de animales tratados con antibióticos, transfiriendo a los alimentos, residuos de antibióticos y bacterias resistentes a los mismos; asimismo, el agua (residual) con la que son regados los campos de cultivo tiene el mismo problema subyacente, ya que carece de un tratamiento adecuado, por lo que contiene bacterias resistentes y residuos de antibióticos no metabolizados. También hay registro donde se menciona que se rocían árboles frutales con antibióticos. En la acuicultura, los antibióticos son adicionados en el alimento (pellets), lo cual dificulta mantener un control de los antibióticos subministrados. Cerca del 80% de los antibióticos consumidos en los Estados Unidos están dirigidos a la agricultura y la acuicultura (Figura 2) [41].
4. **Mala regulación y gestión del uso de antibióticos:** el problema subyace en la falta de regulaciones de estos fármacos, lo cual ha generado un problema de autoprescripción y la dispensación inapropiada de los antibióticos en farmacias. Si no hay políticas regulatorias, se facilita la adquisición de antibióticos, en ocasiones guiada por desinformación, lo que provoca que los usuarios utilicen de manera incorrecta un antibiótico al desconocer la naturaleza de la patología que los aqueja.
5. **Zoonosis:** se ha reportado la prevalencia de bacterias resistentes a los antibióticos en algunos animales de compañía, mamíferos y aves silvestres, siendo estos un reservorio con potencial transmisible y del mismo modo de humanos a animales. Por mencionar algunos ejemplos, se han asilado bacterias productoras de betalactamasas, como *Klebsiella pneumoniae*, en caballos, *Escherichia coli* en heces de zorros, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina o *Salmonella enterica* productora de carbapenemasas en aves [42, 43, 44].

6. **Medicina veterinaria:** en principio los antibióticos deben ser utilizados para tratar a los animales enfermos y así controlar la propagación de enfermedades. Pero, hay pocas clases de antibióticos específicos para la medicina veterinaria, así que se utilizan los antibióticos utilizados en medicina humana. Esto quiere decir que las cepas bacterianas que generen resistencia en animales pueden presentar resistencia al mismo antibiótico en humanos [45].
7. **Productos de uso diario, antisépticos y desinfectantes:** los desinfectantes y antisépticos son utilizados diariamente y de carácter obligatorio en el ambiente hospitalario, negativamente estos presentan la desventaja de estimular y manifestar en las bacterias mecanismos biológicos de resistencia a causa de la presión selectiva, así como ocurre con los antibióticos. En la industria cosmética y de higiene personal, los desinfectantes y antisépticos también son incluidos como conservadores en los productos comerciales de uso diario en el hogar, como champús, jabones, geles antibacteriales, colutorios, dentífricos, etc. Principalmente los antisépticos y desinfectantes con mayores reportes de generar resistencia a antibióticos se encuentran el glutaraldehído, compuestos de amonio cuaternario (CAC), triclosán, acridinas, peróxidos, formaldehído, etc. [46, 47]. Particularmente, otra inquietud acerca de estos productos, son aquellos que destacan por el contenido del triclosán, pues afectan la microbiota intestinal (generando disbiosis intestinal), favorecen la inflamación del colon y el cáncer colorrectal [48].
8. **Ambientes insalubres:** en el caso de regiones con un sistema de drenaje y alcantarillado poco eficiente, las condiciones sanitarias insalubres proveen un ambiente que permite el crecimiento de bacterias patógenas y el contacto cercano con las mismas. Directamente, los antibióticos no metabolizados o sus residuos pueden encontrarse en las heces y orina, tanto humana como de animales. Por ejemplo en la India se han detectado niveles significativos de antibióticos en las plantas de tratamiento de aguas residuales que manejan agua de 90 instalaciones farmacéuticas, donde se ha determinado que hay un mínimo de 45 kg de antibióticos que se descargan todos los días [49, 50].
9. **Desecho inadecuado:** a menudo los AB son incorrectamente depositados en botes de basura o arrojados al drenaje, como consecuencia de la desinformación sobre su correcto desecho. Una vez que estos fármacos son arrojados al sistema séptico pueden filtrarse a las aguas subterráneas que frecuentemente son utilizadas como fuente de agua potable, a pesar de que el agua pasa por procesos de potabilización y purificación, a su paso ya han contaminado el ambiente [51].

Otro factor para considerar son los sistemas de almacén de agua en zonas urbanizadas, como los sistemas de presas, ya que brindan las condiciones para el desarrollo de biopelículas que permiten que las bacterias persistan en condiciones de estrés ambiental [52].

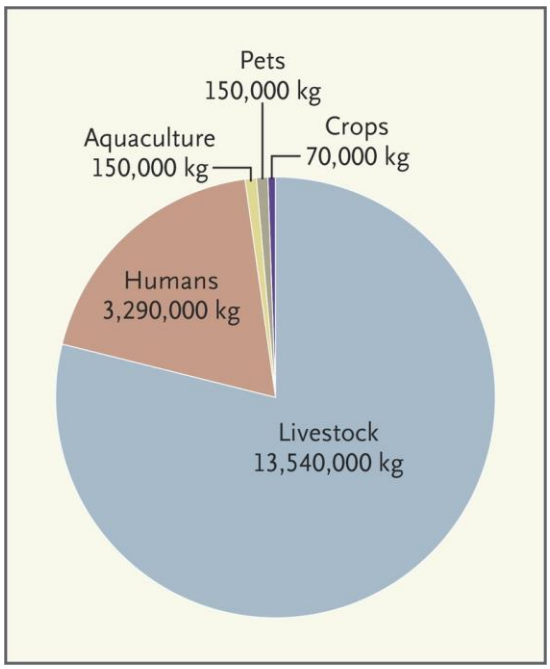


Figura 2. Uso anual de antibióticos estimado en los Estados Unidos. Recuperado de Aidan Hollis, *et al.* 2013

1.5.2 Los antibióticos en la profilaxis y promoción del crecimiento

Es importante destacar el uso de los antibióticos en la crianza de animales por ser una de las principales vías de generación de resistencia a los antibióticos [53]. Desde 1950 los antibióticos han sido administrados a animales de producción alimentaria en dosis subterapéuticas (por debajo de la concentración mínima inhibitoria), con el objetivo de establecer un tratamiento profiláctico prolongado y favorecer el crecimiento de los animales [54, 55, 56, 57]. Suelen suministrarse durante la gestación (desde la fertilización hasta la implantación) de las hembras, ayudando al desarrollo embrionario en el periodo crucial de dos a tres semanas, en el cual existe un mayor compromiso en la viabilidad del producto por infecciones subclínicas [58]. El efecto positivo de los antibióticos en la fertilidad se puede ver reflejado en el aumento de las tasas de concepción, peso y número de la camada [59]. En el mismo principio "protector", la administración de los antibióticos continúa en la concepción de los animales (estableciendo una mejor adaptación del cambio de alimentación, de leche materna a alimento sólido, rico en carbohidratos y proteínas distintas a las de la leche), ya que en esta etapa las crías aún cuentan con un sistema inmunológico débil y aún en desarrollo, vulnerándolos a adquirir infecciones bacterianas y diezmando su desarrollo [60]. Se cuenta con evidencia que indica que los mejores efectos promotores del crecimiento de los antibióticos se obtienen en las etapas juveniles del desarrollo y decrecen en la adultez, no obstante, es frecuente encontrar que se administran hasta la finalización (sacrificio) del animal, dado que el rendimiento productivo de los animales (en todas las etapas de su vida) es mayor respecto a un animal sin antibióticos. En concreto, las mejoras productivas se obtienen en la eficiencia alimentaria (mejor aprovechamiento de los nutrientes) y ganancia de peso diaria, también se busca disminuir las tasas de mortalidad y aumentar la supervivencia de los animales [61].

Los mecanismos por los cuales los antibióticos ejercen su efecto promotor de crecimiento no se han precisado, se han propuesto cuatro posibles hipótesis que pueden explicar la promoción del crecimiento. (1) Eludir las infecciones subclínicas, (2) menor interacción con metabolitos bacterianos que afecten el desarrollo, (3) menor utilización bacteriana de los nutrientes y (4) adelgazamiento de la pared intestinal que facilita y brinda mayor absorción de nutrientes [62,63, 64] En general, las cuatro propuestas apoyan la idea de que las actividades metabólicas y de infección de la microbiota natural y patógena del tracto gastrointestinal demandan un consumo energético que en presencia de antibióticos se encuentra disponible para el hospedero [65, 66]. De acuerdo con estudios, los ahorros energéticos se pueden asociar a nivel nutricional, fisiológico y metabólico. Por ejemplo, aumentando la disponibilidad de glucosa, vitaminas, calcio y ácidos grasos, o mejorando la absorción de grasas al eliminar a las bacterias que promueven la desconjugación de los ácidos biliares (esenciales para permitir la absorción de las grasas y mitigar el crecimiento bacteriano), mediante hidrolasas y la oxidación de grupos hidroxilo. También hay interacción con el sistema inmune, sin bacterias que activen las respuestas inmunológicas (la inmunidad innata, propia de la detección inmediata de antígenos, y la inmunidad adquirida, encargada de reconocer a los patógenos que antes han infectado al organismo) la energía no es destinada a proteger al hospedero [67].

- Es importante conocer los beneficios y dilucidar los mecanismos de los antibióticos en la promoción del crecimiento para encontrar alternativas igual o mayormente redituables económicamente, que no representen un potencial riesgo de salud pública y brinden un efecto equiparable al de los antibióticos.

  A medida que los países han regulado el uso de los antibióticos en la producción animal, se han encontrado alternativas loables que pueden remplazar con éxito a los antibióticos, con el valor agregado de evitar la generación de bacterias resistentes y con percepciones económicas equiparables a las percibidas con antibióticos [68]. Algunas de estas alternativas son; la disminución de la cantidad de proteínas en la dieta, ya que un exceso en el consumo de proteínas provoca diarrea, y a su vez, una mala absorción de los nutrientes. Cambiar la dieta utilizando como ingrediente principal granos de cereal integral, como la avena y cebada, en lugar del maíz o trigo. Los granos proporcionan mejores beneficios cuando son previamente cocinados o tratados térmicamente, su utilidad les es atribuida al aumento en la eficiencia alimentaria. Mejorar las condiciones sanitarias, así como mantener instalaciones ventiladas ofrecen un ambiente salubre que establece las condiciones necesarias que reducen la tasa de infección bacteriana; como ejemplo están los estudios del efecto de los antibióticos en la promoción del crecimiento en condiciones estándar de laboratorio, en las cuales no se observan diferencias significativas entre la suplementación con antibióticos y los grupos control. Sin embargo, cuando esto se evalúa en condiciones de granja típicas es posible notar un cambio positivo en el desarrollo de los animales cuando se les administran antibióticos [69].

También existe la posibilidad de generar inmunidad pasiva en los animales si se añade a la dieta huevo, ya que la inmunidad generada por las gallinas por la exposición con patógenos puede transmitirse mediante el consumo de huevo, siendo de mayor utilidad en animales jóvenes.

En síntesis, en producción animal la aplicación promotora de crecimiento de los antibióticos no es una práctica indispensable, tanto económicamente como eficientemente, ya que las alternativas actuales ofrecen resultados a la par de los antibióticos, sin la generación de bacterias resistentes a los antibióticos [69].

1.6 Defunciones por bacterias resistentes a los antibióticos

De acuerdo con estimaciones realizadas en 2014, 700,000 personas morían al año en el mundo por infecciones producidas por microorganismos resistentes a antibióticos; sin un cambio que infiera de manera significativa sobre el manejo adecuado de los antibióticos, se proyecta que para el año 2050 el número de muertes anuales por infecciones bacterianas resistentes a los AB alcanzará los 10 millones.

No obstante, un estudio del año 2019 (publicado en 2022) muestra un análisis sistemático de 204 países, cuyos modelos estadísticos estiman 1,27 millones de muertes por bacterias resistentes a los antibióticos (Figura 3). Lo que indica que cada vez estamos aproximándonos a convertir a las infecciones bacterianas en una situación sin tratamiento, un panorama planteado en una perspectiva similar a la época previa al descubrimiento de los antibióticos [70, 71].

1.6.1 La industria farmacéutica en el desarrollo de los antibióticos

Otra de las brechas que atañen al problema de la resistencia a los AB es el desarrollo de nuevos antibióticos, ya que la industria farmacéutica ha disminuido considerablemente su producción en los últimos 20 años, lo que representa una disminución del 75% en el número de antibióticos aprobados (Figura 4). Por ejemplo, sólo tres nuevas clases de antibacterianos han sido autorizados desde 1970 (mupirocina en 1985, linezolid en el 2000 y daptomicina en 2003) [54]. Actualmente el enfoque de las industrias farmacéuticas apunta por los medicamentos para tratar enfermedades crónicas como el cáncer, diabetes o asma; en vista de representar una mejor inversión económica para estas industrias. En este sentido, variables como el tiempo que toma el proceso de llevar al mercado nuevos antibióticos, las fuentes convencionales de obtención de los AB que han sido bastante explotadas y la corta vida útil del antibiótico por la rapidez con la que se genera resistencia a él, han diezmado el interés de producir nuevos AB.

Es por las razones antes mencionadas que el problema de la resistencia a los antibióticos exhibe un panorama que exige una urgente demanda de contar con nuevos antibióticos que sean capaces de actuar frente a bacterias resistentes a los ya existentes. Una manera de abordar el problema es identificar fuentes alternativas con potencial de albergar nuevos antibióticos, y así contar con un reservorio efectivo para atender la emergencia de cepas resistentes a los AB actuales [54].

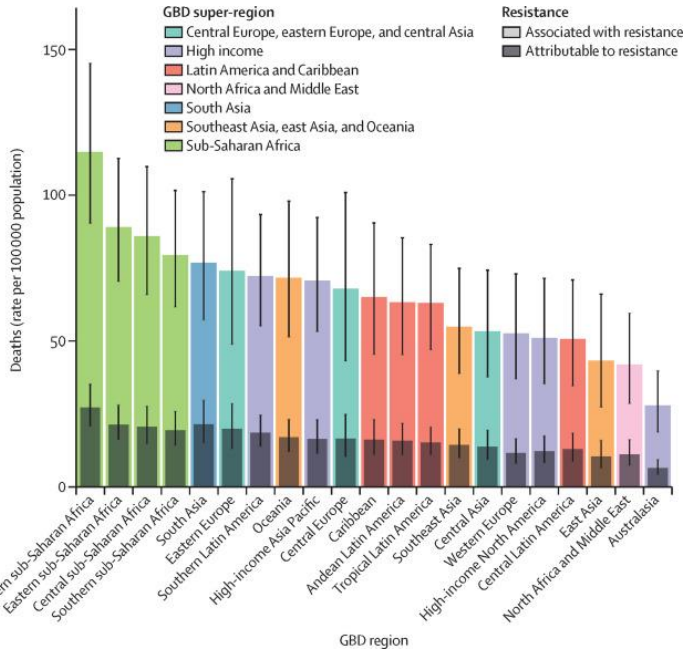


Figura 3. Tasa de muertes atribuibles y asociadas con las bacterias resistentes a los antibióticos del 2019. Recuperado de Murray *et. al*, 2022.

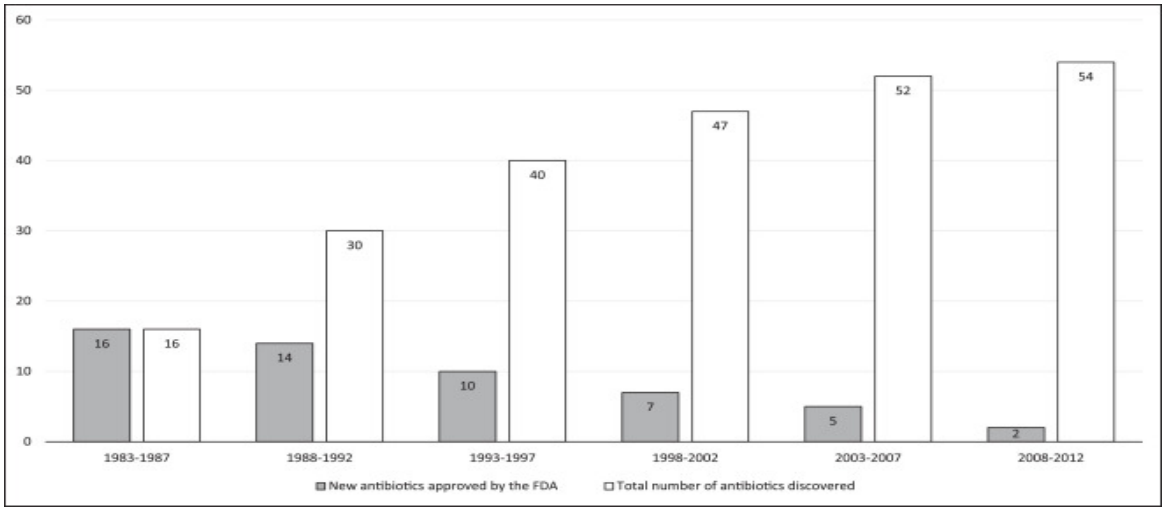


Figura 4. Evolución de la cantidad de antibióticos aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) en comparación con la cantidad total acumulada de antibióticos disponibles. Recuperado de Duran *et. al*, 2019.

1.7 Fuentes usuales de los antibióticos

La mayoría de los antimicrobianos se han descubierto a partir de microorganismos; en concreto el 70% de los fármacos disponibles en el mercado se han obtenido de bacterias aisladas del suelo [72]. Específicamente, los actinomicetos han sido la fuente más importante de antibióticos (estreptomicina, la gentamicina, vancomicina, clindamicina, eritromicina, anfotericina, rifampicina, tetraciclina, etc.). La adaptación de estos microorganismos al hábitat terrestre es muy antigua; en el suelo son los seres más abundantes, con una media de 64% de la biomasa [73].

1.7.1 Nuevas fuentes de antibióticos

En cuanto a los antimicrobianos que han sido descubiertos a partir de organismos eucariotes, estos derivan principalmente de plantas (terrestres y acuáticas) y en segundo lugar de hongos. También se han encontrado en fuentes inusuales a los nichos antes mencionados, como productos vegetales y frutas, miel, insectos, gusanos, cangrejos y vertebrados [74].

Anteriormente se había ignorado al resto de la diversidad de organismos (animales y bacterias) que prosperan en ambientes sometidos a toda clase de estrés ambiental, como fuente alternativa de nuevos AB, dada la practicidad y abundancia que el suelo ofrecía. Pero en el panorama actual, la alternativa diferencial es requerida, los nichos ecológicos con características específicas pueden representar un diverso reservorio de compuestos con actividad antibacteriana. Algunas de las singulares condiciones de los nichos ecológicos que han seleccionado a los organismos son la coexistencia y desarrollo entre distintas especies de gérmenes que compiten entre sí. También las particulares fuentes de alimento, como aquellos que se alimentan de materia en descomposición (refiriéndose a organismos superiores en este último ejemplo) [75]. Considerando a las bacterias como fuente de nuevos AB, los distintos medios en los que se desarrollan albergan una variabilidad de condiciones peculiares por ejemplo, una alta concentración de sal, presión atmosférica elevada (encontrada en aguas profundas), poca o nula concentración de oxígeno, temperaturas oscilantes en ambos extremos, distintas condiciones de pH, entre otras. En principio, estos organismos sufrieron adaptaciones que les permitieron su proliferación en tales condiciones. Por mencionar algunos, la producción de péptidos sintetizados por especies bacterianas ha demostrado actividades antibacterianas contra una amplia gama de patógenos, como cecropin, moricin, defensin, drosomycin, apidaecin, drosocin, lebocin, attacin y gloverin [76].

A pesar de que los microorganismos mantienen una constante competencia, coexisten en relaciones biológicas biestables que dependen de las circunstancias específicas para mantener un equilibrio. Por ejemplo, la relación puede tornarse antagónica ante la escasez de recursos (espacio y alimento), si la tasa de crecimiento de una población se reduce, la competencia es promovida, incitando a los microorganismos a desarrollar mecanismos que les permitan inhibir a la especie competidora, entre ellos, la producción de metabolitos secundarios que son tóxicos para las otras especies [77]. Esto deriva en el desplazamiento de los microbios susceptibles a estas toxinas, proclamándose así una especie dominante. Un claro ejemplo de este tipo de competencia, con base en la producción de moléculas extracelulares, son las que degradan los componentes adhesivos en la matriz de biopelículas (agregados celulares, de proteínas y exopolisacáridos), un mecanismo eficaz utilizado en la competencia biológica entre bacterias filogenéticamente diferentes [78, 79]. A una mayor escala, organismos más complejos, como las plantas

y hongos (organismos de vida sésil), también han adaptado la expresión metabolitos secundarios que los protegen contra microorganismos patógenos u organismos superiores [80].

II. ANTECEDENTES

2.1 El ambiente marino como fuente de nuevos antibióticos

En el contexto que se menciona anteriormente, el ambiente marino aloja bacterias que se han adaptado a distintas condiciones de estrés ambiental. Esto representa un reservorio de biodiversidad potencial, capaz de albergar una amplia gama de compuestos bioactivos, tan solo en los últimos 50 años se han encontrado más de 30,000 productos naturales de origen marino [81, 82]. Una de las estrategias de supervivencia desarrolladas por las bacterias marinas está representada por la producción de metabolitos con actividad anti-biopelícula, como fue observado con la bacteria marina antártica *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 que actúa sobre el patógeno humano *Staphylococcus epidermidis* [83, 84].

2.1.1 Las profundidades marinas, un reservorio de moléculas antibacterianas

Las evidencias que se tienen sobre la diversidad microbiológica en ambientes marinos, aunadas a las características únicas de las bacterias que habitan en los ambientes extremos, dieron pauta a la exploración de las profundidades marinas con el objetivo de encontrar nuevos fármacos con potencial actividad antibacteriana. Diversos actinomicetos nativos de las profundidades marinas han sido poco estudiados y prometen un aumento en la perspectiva de descubrir nuevos e actividades biológicas [85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92]. El ambiente de aguas profundas es un hábitat único, los microorganismos que lo habitan deben sus adaptaciones a este ambiente extremo, como la capacidad de producir nuevos metabolitos secundarios con actividades que pueden tener un efecto sobre bacterias patógenas [93].

Gracias al reciente desarrollo de tecnología acústica y de vehículos de inmersión operados a distancia [94], es posible el acceso a material orgánico de aguas profundas, lo cual, combinado con la aplicación de métodos dependientes e independientes de cultivo de los entornos oceánicos, hicieron posible el estudio de la diversidad microbiológica, lo que reveló la presencia de biodiversidad microbiana inesperada [95, 96]. En el ambiente marino se han encontrado 30, 000 productos naturales, de los cuales aproximadamente el 2% de ellos se han aislado de organismos de aguas profundas. En particular, las bacterias marinas procedentes de sedimentos de aguas profundas han demostrado ser una fuente rica de metabolitos secundarios con nuevas estructuras químicas y excelentes actividades biológicas [97].

La evidencia nos ha mostrado que la capacidad adaptativa que los microorganismos desarrollaron para sobrevivir en el ambiente marino es única, puesto que hay condiciones específicas de este nicho ecológico que no son compartidas por otros lugares, principalmente la alta presión atmosférica [98]. La adaptación a los procesos bioquímicos y fisiológicos se refleja en modificaciones de la regulación de los genes y las vías metabólicas primarias y secundarias que dan como resultado la expresión de nuevos productos naturales [99].

Tabla 3
Compuestos antimicrobianos encontrados en el ambiente marino.

Compuestos Marinos						
Microorganismo	**Profundidad**	**Ubicación geográfica**	**Compuesto**	**Clase molecular**	**Actividad antimicrobiana contra**	**Autor**
Marinactinospora thermotolerans (SCSIO 00652)	3865 m	Mar del sur de China, República popular de China	**Marthiapeptide A**	Péptido cíclico	*M. luteus; S. aureus; B. sublitis; B. thuringiensis*	Zhou *et. al*, 2012
Streptomyces scopuliridis (SCSIO ZJ46)	3536 m	Mar del sur de China, República popular de China	**Desatamida B**	Péptido cíclico	*S. aureus; S. Pneumoniae; MRSE shhs-E1*	Song *et. al*, 2014
Streptomyces drozdowiczii (SCSIO 10141)	1396 m	Mar del sur de China, República popular de China	**Marfomicinas A, B, E**	Péptido cíclico	*M. luteus*	Zhou *et. al*, 2014
Streptomyces sp (SCSIO 01127)	1350 m	Mar del sur de China, República popular de China	**Loboforina F**	Poliquétidos de espirotetronato	*S. aureus; E. fecalis*	Niu *et. al*, 2014
Streptomyces sp (12A35)	2134 m	Mar del sur de China, República popular de China	**Lorboforina H**	Poliquétidos de espirotetronato	*B. subtilis*	Pan *et. al*, 2013
Verrucosispora sp (AB 18-032)	289 m	Mar japonés	**Abisomicina C**	Poliquétidos de espirotetronato	MRSA*; S. aureus resistente a la vancomicina*	Bister *et. al*, 2004
Streptomyces niveus (SCSIO 3406)	3536 m	Mar del sur de China, República popular de China	**Marfuraquino-cinas A, C, D**	Derivado de sesquiterpeno	*S. aureus;* MRSE *shhs-E1*	Song *et. al*, 2013
Streptomyces sp (NTK 937)	3814 m	Mar del sur de China, República popular de China	**Caboxamicina**	Alcaloide	*B. sublitis; S. lentus; S. epidermidis*	Hohmann *et. al*, 2009

Tabla 3. Compuestos marinos (continuación)

Esmericella sp (SCSIO 05240)	3258 m	Mar del sur de China, República popular de China	**Emerixanthon-es A, B, C, D**	Derivado de xantona	*E. coli; K. pneumoniae; S. aureus; E. fecalis; A. baumannii; A. hydrophila*	Fredimoses *et. al*, 2014
Enggyodontium (DFFSC021)	3739 m	Mar del sur de China, República popular de China	**Engyodotiumone H**	Derivado de xantona	*E. coli; B sublitis*	Yao *et. al*, 2014
Spiromastix sp	2869 m	Océano Atlántico Sur	**Espiromasxonas A, B, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, O**	Análogos de depsidona	*S. aureus; B. thuringiensis; B. Subtilis;* MRSA*;* MRSE*; E. fecalis; E. faecium*	Niu *et. al*, 2014
Penicilliem sp (F23-2)	5080 m	Mar del sur de China, República popular de China	**Peniciclones A, B, C, D, E, F**	Análogo del ácido ambuico	*S. aureus*	Guo *et. al*, 2015

Tabla 3. Resumen esquemático de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana aislados de microorganismos procedentes de aguas profundas.
Recuperado de Tortorella *et, al.* 2018.

Varios compuestos antimicrobianos han sido aislados de una profundidad del mar no mayor de 3,865 metros. Esta información deja la puerta abierta para la exploración a muchas más regiones que prometen albergar una mayor abundancia de diversidad biológica, pues es muy probable que se esté explorando la superficie de un reservorio más amplio que podría representar una alternativa viable que pueda ser utilizada en biotecnología, como la generación de nuevos antibióticos.

2.1.2 El Golfo de México, un hábitat único

Producto de las nuevas investigaciones, actualmente se puede considerar que los sedimentos marinos representan uno de los hábitats microbianos más complejos, con diferentes factores a considerar, como la participación de estas comunidades bacterianas en los ciclos biogeoquímicos del ecosistema

marino. Específicamente, el Golfo de México (GoM) tiene una concentración abundante de hidrocarburos en sus sedimentos (ya que es una prolífica zona de extracción de petróleo), lo que lo convierte en un nicho singular y distinto del resto de las profundidades marinas. El Golfo de México es una cuenca semicerrada, que abarca un área de 1, 602,000 km², presenta una carga de petróleo abundante que culminó en el cretácico temprano [100]. En consecuencia, los sedimentos marinos del GoM albergan una distribución general de hidrocarburos presente por dos fuentes principales: filtraciones de combustibles fósiles originados de manera natural [101] y la contaminación antropogénica debida a la perforación, transporte y uso de petróleo [102]; un factor relevante a considerar dada las propiedades fisicoquímicas del agua, condiciones de adaptación adicionales que las bacterias han sufrido para proliferar en dicha región.

El gobierno mexicano ha otorgado el acceso de la industria petrolera para el estudio del Golfo de México (swGom), ofreciendo varios bloques de exploración en aguas superficiales y profundas en el suroeste de esta área. De acuerdo con los datos recopilados por el Consorcio de Investigación del Golfo de México (CIGoM), se estableció un perfil de referencia bacteriano de 450 géneros de los sedimentos marinos en esta región [103].

Actualmente, la innovación de técnicas independientes de identificación de especies, como los métodos de perfiles taxonómicos del gen 16S rRNA, la secuenciación de alto rendimiento y los análisis metagenómicos, permiten el estudio eficiente de los microorganismos presentes en ambientes naturales. De acuerdo con análisis metagenómicos en el swGoM, llevados a cabo por el CIGoM, se demostró la presencia de géneros de bacterias patógenas nativas y ubicuas en el GoM; además, de manera alarmante, también se encontraron de especies patógenas no nativas que representan un problema de salud pública, entre estos géneros reportados se encuentran: *Salmonella, Acinetobacter, Pseudomonas*, *Campylobacter, Enterobacter*, *Haemophilus*, *Halomonas*, *Klebsiella*, *Proteus*, entre otros. Es importante destacar que los datos obtenidos hacen patente la colonización de estos microorganismos en hábitats diferentes a su nicho original, lo que implica la distribución de patógenos de interés en el lecho marino [104, 105, 106, 107, 108, 109, 110]

3.1 Bacterias patógenas

En nuestro estudio analizaremos las bacterias patógenas *Acinetobacter baumannii*, *Salmonella enterica* y *Pseudomonas aeruginosa*, las cuales se describen a continuación.

4.1 *Acinetobacter baumannii*

A. baumannii es un cocobacilo Gram negativo, generalmente se observa en pares. No es fermentador (glucosa), aerobio estricto, inmóvil, catalasa positivo y oxidasa negativo. Crece bien en todos los medios de cultivo de rutina, siendo su temperatura óptima de crecimiento de 33 a 35° C. Es una bacteria que pertenece al género *Acinetobacter*. La mayoría de las especies del género *Acinetobacter* son bacterias que se distribuyen en el ambiente de manera ubicua (agua, plantas, suelo), incluso en la microbiota natural de la piel humana [111]. Es una bacteria de carácter oportunista, lo que indica que infecta mayormente a paciente inmunocomprometidos, causando infección principalmente en pacientes hospitalizados.

A. baumannii, se encuentra en la categoría de prioridad 1 o crítica de la lista de patógenos prioritarios de la OMS, en la cual se encuentra las bacterias que requieren la principal atención para investigación e identificación de nuevos antibióticos.

En específico, la OMS alude dirigir el enfoque en las cepas de *A. baumannii* resistentes a los carbapenémicos. Estos antibióticos son betalactámicos bactericidas y tienen un espectro de actividad bastante amplio. La importancia en encontrar nuevos antibióticos que tengan efecto contra estas cepas en particular es porque los carbapenémicos son utilizados a menudo como último recurso para el tratamiento de bacterias Gram negativas multirresistentes. En específico, las que producen betalactamasas de espectro extendido, enzimas que destruyen a la mayoría de los betalactámicos (mediante la hidrólisis de anillo β-lactámico), excepto los carbapenémicos. Por otro lado, esta bacteria presenta una alta prevalencia en superficies abióticas por su capacidad de generar biopelículas, lo que facilita y contribuye a establecer la infección.

A. baumannii se convirtió en uno de los patógenos más prevalentes y mejor adaptados al ambiente nosocomial [112, 113]. Un estudio realizado en unidades de cuidado intensivo reveló que después del contacto físico entre personal de la salud y pacientes infectados con *A. baumannii* multidrogoresistente, 38,7 % de los guantes o batas del personal de la salud resultaron contaminados, y 4,5 % de ellos presentaron contaminación en sus manos después de la remoción de los guantes desechables [115]. En el periodo de 2006-2010, los brotes causados por *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos se han convertido en una preocupación importante a nivel mundial [116], y las infecciones causadas por dicho patógeno culminan con un aumento de la morbilidad y la mortalidad [117].

En el medio hospitalario, *A. baumannii* es protagonista de cuadros clínicos que incluyen principalmente neumonía asociada a ventilación mecánica que puede exacerbar a bacteriemia [118]. Otras manifestaciones se relacionan con infecciones postcirugía, infecciones de tracto urinario relacionadas con sondas vesicales, meningitis relacionadas con derivaciones ventriculares externas e infecciones en piel y tejidos blandos en pacientes quemados y heridas expuestas [119, 120].

El mecanismo biológico de resistencia a los antibióticos con mayor prevalencia en *A. baumannii*, según los aislamientos, es la expresión de β-lactamasas de clase D (CHDL. Estas enzimas hidrolizan débilmente los carbapenémicos y tienen actividad atenuada contra las cefalosporinas de tercera y cuarta generación (Tabla 4) [121, 122, 123]. *A. baumannii* también cuenta con distintas variantes de betalactamasas que le permite a la bacteria tener un espectro más amplio de acción (Tabla 4) [124].

A. baumannii ha adquirido en el curso evolutivo genes de resistencia a distintas familias de antibióticos diferentes a los carbapenémicos (tabla 5) [124].

Tabla 4

Mecanismos enzimáticos de resistencia a β-lactámicos en *A. baumannii*

Mecanismos enzimáticos de resistencia a β-lactámicos en *A. baumannii*		
β –lactamasa	**Variantes**	**Perfil de resistencia**
Clase A	Betalactamasas de amplio espectro: TEM-1, TEM-2,	Penicilinas
	CARB-5, VEB-1, PER-1, PER-2, TEM-92, TEM-116. SHV-5, SHV-12, CTX-M-2, CTX-M-43	Cefalosporinas de espectro extendido, aztreonam
	Carbapenemasas KPC	Carbapenémicos, penicilinas, cefalosporinas y aztreonam.
Clase B	Carbapenemasas IMP, VIM, SPM, SIM y NDM	Carbapenémicos, penicilinas, cefalosporinas, no hidrolizan el aztreonam
Clase D	Carbapenemasas: OXA-23, OXA-24, OXA-58, OXA-51	Carbapenémicos, penicilinas, cefalosporinas (débilmente cefalosporinas de tercera y cuarta generación)

Tabla 4. Mecanismos enzimáticos de resistencia a β-lactámicos en *A. baumannii*
Recuperado de: Vanegas *et. al*, 2014.

Tabla 5

Mecanismos de resistencia de *A. baumannii* a antibióticos diferentes de los β-lactámicos.

Mecanismos de resistencia de *A. baumannii* a antibióticos diferentes de los β-lactámicos			
Grupo de antibióticos	**Mecanismo de resistencia**	**Variantes**	**Perfil de resistencia**
Aminoglicósidos	Enzimas modificadoras de aminoglicósidos	AAC, ANT, APH	Variable
	Metilación 16S RNA	*arm*A	Todos los aminoglicósidos
	Bombas de expulsión	AdeABC	Todos los aminoglicósidos
Quinolonas	Mutación genética	AdeM	Gentamicina, kanamicina
	Bombas de expulsión	*gyrA*, parC	Variable
		AdeABC	Todas las quinolonas
		AdeM	Variable
Tetraciclinas, glicilciclinas	Bombas de expulsión		
		Tet (A)	Tetraciclina, pero no minociclina
		Tet (B)	Tetraciclina, minociclina
	Protección ribosomal	AdeABC	Tetracilinas, glicilciclinas
		tet(M)	Tetraciclinas
Polimixinas	Modificación lípido A	*pmr*A,*pmr*B	Colistina
	Modificación porinas	OmpW	Colistina
Trimetoprim,sulfonamidas, Cloranfenicol	Alteración del blanco	*sul*	Sulfonamidas
		dnfr	Trimetoprim
	Bombas de expulsión	CraA	Cloranfenicol
		AdeABC	Trimetoprim, cloranfenicol

Tabla 5. Mecanismos de resistencia de *A. baumannii* a antibióticos diferentes de los β-lactámicos Recuperado de: Vanegas *et. al*, 2014.

5.1 *Salmonella enterica*

S. enterica es un bacilo Gram negativo y anaerobio facultativo, pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. La temperatura óptima para su crecimiento es a 37°C (temperatura fisiológica) y presenta buen

crecimiento en los medios de cultivo de rutina. De acuerdo a la clasificación más reciente, basada en la secuenciación de DNA, el género *Salmonella* abarca dos especies diferentes, *S. enterica y S. bongori*, pero tiene la cualidad de serotipificarse en más de 2500 serovariedades; dentro de los serotipos de importancia clínica se encuentran el serotipo Typhi, causante de una enfermedad sistémica denominada fiebre tifoidea, y el serotipo Typhimurium, causante de infección intestinal aguda (Tabla 6) [125, 126]. *S. enterica* se encuentra principalmente en organismos de sangre caliente, aunque gracias a la formación de biopelícula también se le puede encontrar en alimentos crudos de origen vegetal y animal, con una prevalencia que varía de semanas a meses, según sean las condiciones. Esta bacteria es el agente patógeno relacionado con mayor frecuencia a infecciones con alimentos e infecciones gastrointestinales de origen zoonótico, la manera en que ingresa a sus hospederos es a través de la vía fecal-oral [127, 128, 129, 130]

S. enterica se encuentra en la categoría de prioridad 2 o elevada, de la lista de patógenos prioritarios de la OMS, la cual incluye a las bacterias que requieren urgente atención para investigación e identificación de nuevos antibióticos.

La OMS menciona que el enfoque debe ser dirigido a las cepas de *S. enterica* resistentes a las fluoroquinolonas. Las fluoroquinolonas son antibióticos bactericidas que tienen un amplio espectro contra bacterias Gram negativas y positivas. La importancia de encontrar nuevos antibióticos efectivos contra estas cepas en particular se debe a la relevancia médica de las fluoroquinolonas, ya que presentan un buen perfil farmacocinético y un efecto antibiótico prolongado.

Tabla 6

Clasificación serológica de Kauffman de *S. enterica.*

Clasificación clínica y serológica de especies patógenas de *Salmonella*			
Clínica	Serotipo	Nombre	Serogrupo
Tifoídica	Typhi	*S. enterica*, subsp. *enterica*, serotipo Typhi	D
	Paratyphi A	*S. enterica*, subsp. *enterica*, serotipo Paratyphi A	A
	Paratyphi B	*S. enterica*, subsp. *enterica*, serotipo Paratyphi B	B
	Paratyphi C	*S. enterica*, subsp. *enterica*, serotipo Paratyphi C	C
No tifoídica	Typhimurium	S. enterica, subsp. enterica, serotipo Typhimurium	*B*
	Enteritidis	S. enterica, subsp. enterica, serotipo Enteritidis	*D*
	Newport	S. enterica, subsp. enterica, serotipo Typhi	*C*

Tabla 6. Clasificación serológica de Kauffman de *S. enterica* Modificado de Davis *al*. 1973.

5.1 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa es un bacilo Gram negativo, recto o ligeramente curvado, aerobio facultativo, catalasa positivo y oxidasa positivo. Su morfología es caracterizada por la biosíntesis de dos pigmentos, piocianina (azul) y fluoresceína (amarillo), en menor medida puede producir pioverdina (fluorescente de color verde amarillento), piorrubina (de color rojo) y piomelanina (marrón) [131]. Es una bacteria patógena con requerimientos nutricionales mínimos, cuya distribución es ubicua y es tolerante a distintas condiciones de estrés ambiental. Puede aislarse de superficies abióticas y alimentos, incluso, puede formar parte de la microbiota natural de la epidermis. La temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, pero es capaz de proliferar a temperaturas que oscilan entre 20 y 50°C.

P. aeruginosa se encuentra en la categoría 1 o crítica de la lista de patógenos prioritarios de la OMS, la cual incluye a las bacterias cuya prioridad en investigación y desarrollo de nuevos antibióticos debe ser atendida con urgencia.

Este patógeno es de carácter oportunista, lo cual indica que su forma de transmisión es aprovechar los daños o defectos en las barreras de defensa de sus hospederos, principalmente pacientes inmunocomprometidos, que sufran de alguna lesión en tejidos epiteliales articulaciones (los tejidos epiteliales limitan las cavidades internas y la superficie externa del cuerpo y protegen al cuerpo de patógenos y polución). Puede infectar distintos órganos como la piel, ojos, oídos, el corazón, los pulmones, hígado, las vías urinarias, la sangre, los tejidos blandos, los huesos y articulaciones, generando una infección local de baja intensidad. Ocasiona infecciones sistémicas como neumonía, endocarditis bacteriana o infecciones de sistemas urinario, nervioso central, etc., las cuales, pueden evolucionar a la muerte del paciente [132].

La patogenicidad y virulencia particular de esta bacteria, la pigmentación, la alta prevalencia en distintos ambientes y su difícil erradicación, son algunas de las particularidades que ha incitado el estudio de este agente etiológico [133]. Numerosos estudios han revelado diferentes factores que contribuyen a la patogenia de *P. aeruginosa*, como factores asociados a la célula bacteriana (flagelo, pili tipo IV y proteínas de membrana), factores secretados (por ejemplo para la formación de biopelícula), sistemas de secreción (SST2, SST3 y SST5), algunos efectores de quorum sensing y pigmentos. Estos factores trabajan en conjunto y establecen que tan virulento es el patógeno, siendo este último objeto de análisis. En particular, se han dedicado años de investigación en los pigmentos, gracias a esto, se han resuelto preguntas acerca de su naturaleza, actividad y función. Esta bacteria ha conservado los pigmentos a lo largo del tiempo como factor de virulencia. En concreto, la piocianina, un pigmento azul, es una molécula tricíclica con propiedades redox, pertenece al grupo de las fenazinas (Figura 5) [134, 135, 136]. Sus propiedades moleculares hacen posible el fácil acceso a las membranas celulares, causando múltiples efectos adversos en células epiteliales, como la inhibición de la respiración celular, alteraciones en el crecimiento celular, de remodelación y la restauración de las células, senescencia (en infecciones crónicas) y apoptosis,

disminución en la producción del glutatión (lo que a su vez contribuye a generar especies reactivas de oxígeno) y la interrupción de la homeostasis del calcio, además de estar involucrada el alterar el equilibrio proteasa-antiproteasa [137, 138, 139, 140, 141]. También se ha observado que la piocianina suprime la respuesta inflamatoria aguda mediante la apoptosis de neutrófilos, sin inducir apoptosis de células epiteliales o macrófagos, favoreciendo la sobrevivencia de la bacteria en la célula hospedera [142]. La piocianina además de tener efectos fisiopatológicos propios como factor de virulencia, también, contribuye a la formación de las biopelículas, aumentando la adhesión superficial y la agregación celular [143, 144, 145, 146, 147]. La piocianina también mejora la respiración celular entre las matrices de la biopelícula, al aumentar la transferencia de electrones, manteniendo la homeostasis redox citoplasmática [148, 149].

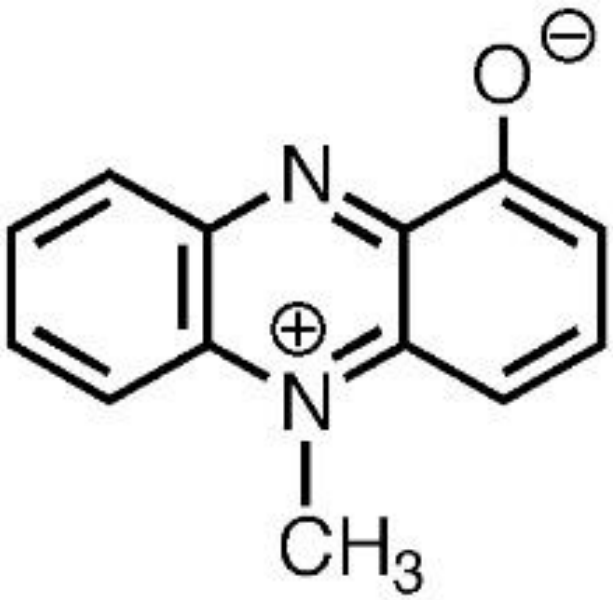


Figura 5. Estructura química de la piocianina. Fenazina relevante en la patogénesis de *P. aeruginosa.* Recuperado de Hall, S, *et. al,* 2016.

III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Hay bacterias en el Golfo de México que presentan actividad antibacteriana?

IV. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, el tratamiento de enfermedades infecciosas se ha complicado con la emergencia de bacterias patógenas resistentes a los antibióticos existentes. Así que es imperativo la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos o compuestos antibacterianos para el control de esta problemática. Una alternativa viable para esto es el estudio de microorganismos presentes en nichos prístinos o poco explorados, cuyas condiciones ambientales representen un hábitat particular que podría favorecer la producción de moléculas bioactivas. Una fuente potencial para la identificación de nuevos antibióticos o compuestos antibacterianos son las bacterias que habitan las profundidades del Golfo de México, un hábitat con características singulares.

V. HIPÓTESIS

Algunas cepas bacterianas aisladas de aguas profundas del Golfo de México presentarán actividad antibacteriana contra *A. baumannii* y *S. enterica* serovar Typhimurium (*S.* Typhimurium).

VI. OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar bacterias marinas que presenten actividad antibacteriana contra cepas de referencia de *A. baumannii* y *S.* Typhimurium.

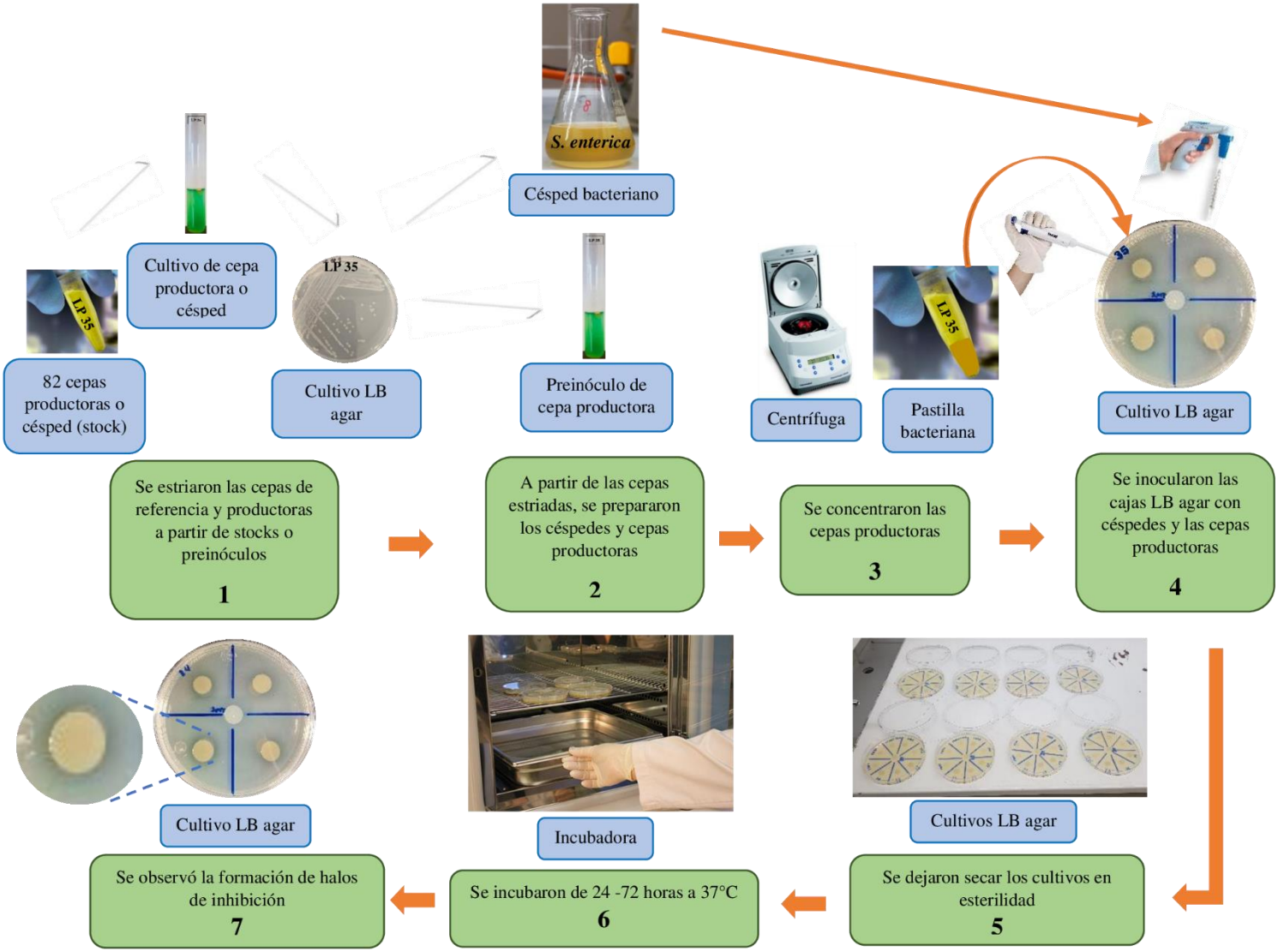
Objetivos particulares

1. Analizar la posible actividad, contra cepas de referencia de *A. baumannii* y *S.* Typhimurium de 82 cepas bacterianas marinas obtenidas del Golfo de México.

2. Identificar la especie de las cepas marinas que presenten actividad antibacteriana contra las cepas de *A. baumannii* y *S.* Typhimurium.

3. Analizar moléculas candidatas que podrían ser las responsables de la actividad antibacteriana en las cepas en estudio.

VIII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Obtención de cepas bacterianas y almacenamiento

Las bacterias marinas utilizadas en este proyecto fueron proporcionadas por la Doctora Liliana Pardo López, investigadora del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Recibimos un total de 82 cepas marinas parcialmente identificadas, procedentes del Golfo suroeste de México, aisladas de muestras de sedimentos superficiales (0-10 cm) y columnas de agua de profundidades de 30 a 1000 m.

Las cepas de referencia *A. baumannii* 17978 y *P. aeruginosa* ATCC 27853, así como los aislados clínicos de *P. aeruginosa* P1503 y P1483 que usamos fueron proporcionados por el Dr. Rafael Franco, del Instituto Nacional de Rehabilitación del área de quemados, ubicado en la Ciudad de México. La cepa *P. aeruginosa* PAO1 fue proporcionada por la Dra. Gloria Soberón, del Instituo de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. La cepa *S.* Typhimurium SL1344 es una cepa de colección de nuestro laboratorio.

Las cepas bacterianas se almacenaron a -70°C, en tubos eppendorf que contenían 250 µl de glicerol al 100%; y 250 µl del cultivo de las cepas crecido en medio "Lysogeny Broth" (LB), con incubación durante toda la noche (16 horas).

7.2 Evaluación de la actividad antibacteriana

7.2.1 Preparación de los inóculos

Se recuperaron las cepas almacenadas a -70°C en cajas de LB agar. A partir de las bacterias crecidas máximo 2 semanas antes, se prepararon pre-inóculos en 5 ml de LB, incubando durante toda la noche (16 horas) a 37°C con agitación, tanto para las cepas marinas (cepas productoras) como para las cepas de referencia de *A. baumannii* y *S.* Typhimurium (cepas césped).

7.2.2 Actividad antibacteriana

Se prepararon cajas de LB agar, vertiendo 20 ml de LB agar fundido en cajas petri de 90 × 15 mm, para obtener una capa de agar de 5 mm de espesor; las cajas se dejaron enfriar por 10 minutos. Para hacer el césped bacteriano se hicieron cultivos de las cepas de *A. baumannii* 17978 y *S.* Typhimurium SL1344, inoculando 1 ml de preinóculo crecido toda la noche en 50 ml de LB (o 2 ml de preinóculo en 100 ml de LB). Los cultivos se crecieron a 37ºC, con agitación, hasta una D.O. $_{600nm}$ (~1X10^{9} bacterias / ml). Se agregaron 5 ml de los cultivos a cajas de LB agar, esparciendo el cultivo uniformemente por toda la superficie de la caja. Las cajas con la suspensión bacteriana se dejaron abiertas en la campana de flujo laminar durante 10 minutos, para permitir que las bacterias césped se adhieran al agar. Pasado este tiempo, se retiró el exceso de la suspensión bacteriana con una pipeta estéril y se dejaron secando las cajas de LB agar abiertas en la campana de flujo laminar, durante 20 minutos.

La preparación de las cepas productoras se efectuó concentrando preinóculos crecidos durante toda la noche. Se agregó 1.5 ml del preinóculo a un tubo eppendorf estéril, se centrifugó el tubo por 3 min a 13,000 rpm / 15,900 RFC, en una centrifuga eppendorf, modelo 5424. Se retiró el sobrenadante, y el proceso anterior se repitió una vez más, utilizando el mismo tubo eppendorf para acumular mayor densidad bacteriana. La pastilla de bacterias, obtenida de 3 ml del preinóculo, se resuspendió con 50 µl de medio LB líquido.

Se inocularon 10 µl de la suspensión concentrada de bacterias productoras en cajas LB agar ya con las bacterias césped. Se inocularon cuatro cepas productoras por caja de LB agar (Figura 1). Las cajas ya

inoculadas con la cepa césped y las cepas productoras se dejaron abiertas, durante 5 min, para que se secaran las muestras inoculadas. Finalmente, las cajas se incubaron a 37°C durante 24-72 horas. Después de este tiempo, se observó la formación de halos de inhibición de crecimiento de la cepa césped alrededor de la colonia de la cepa productora (Modificado de Bauer *al,* 1959) [150].

7.2.3 Determinación de la producción de piocianina

Para iniciar con el proceso de extracción, se crecieron cultivos en LB líquido de las cepas de *Pseudomonas* y productoras crecidos toda la noche (figura 5). Estos cultivos se centrifugaron a 14,000 rpm / 20,913 RFC por 10 minutos en una centrifuga eppendorf modelo 5804R. Se recuperó el sobrenadante y se filtró a 0.22 nm. A estos sobrenadantes se adicionaron 450 µl de $CHCl_3$ para permitir que se separen en dos fases, una fase orgánica azul (esta fase indica la presencia de piocianina) y otra soluble, se mezclaron circularmente tres veces por 30 segundos en un lapso de 15 minutos. Posteriormente se dejaron las muestras en reposo durante 30 minutos, para que las fases se dividan en su totalidad. Se capturó la piocianina y se colocó en un tubo limpio (Figura 6).

Para determinar la cantidad de piocianina, se agregó 1 ml de HCl 0.2 N a la fase orgánica y se mezcló suavemente con un vórtex hasta obtener una coloración rosa-roja (Figura 7). Después se hicieron las lecturas de la absorbancia de la piocianina a una D.O. $_{520nm}$, utilizando el HCl 0.2N como blanco. Por último, se cuantificó la concentración de piocianina en µg/ml multiplicando los datos de la absorbancia por el coeficiente de extinción molar 17.072 (Tabla 3) (El-Fouly, M.Z. *et. al,* 2015) [151].

IX. RESULTADOS

9.1 Determinación de la actividad antibacteriana

Se analizó la actividad antibacteriana de las 82 cepas marinas contra las cepas de referencia *A. baumannii* 17978 y *S.* Typhimurium SL1344. Nuestros resultados indican que 8 cepas marinas muestran actividad contra *A. baumannii* y *S.* Typhimurium (Figura 6, Tabla 7 y datos no mostrados). Estas cepas son: LP 16, LP 17, LP 18, LP 21, LP 34, LP 35, LP 36 y LP 89. Los halos de inhibición de crecimiento que generaron estas cepas marinas fueron de tamaño similar para *A. baumannii* y *S.* Typhimurium; no hubo ninguna cepa marina que afectara sólo a una de las cepas césped evaluadas. Las cepas marinas LP 34, LP 35 y LP 36 mostraron halos de inhibición más evidentes que el de las otras cepas (Figura 1 y datos no mostrados); por lo tanto, seleccionamos estas cepas para los análisis posteriores.

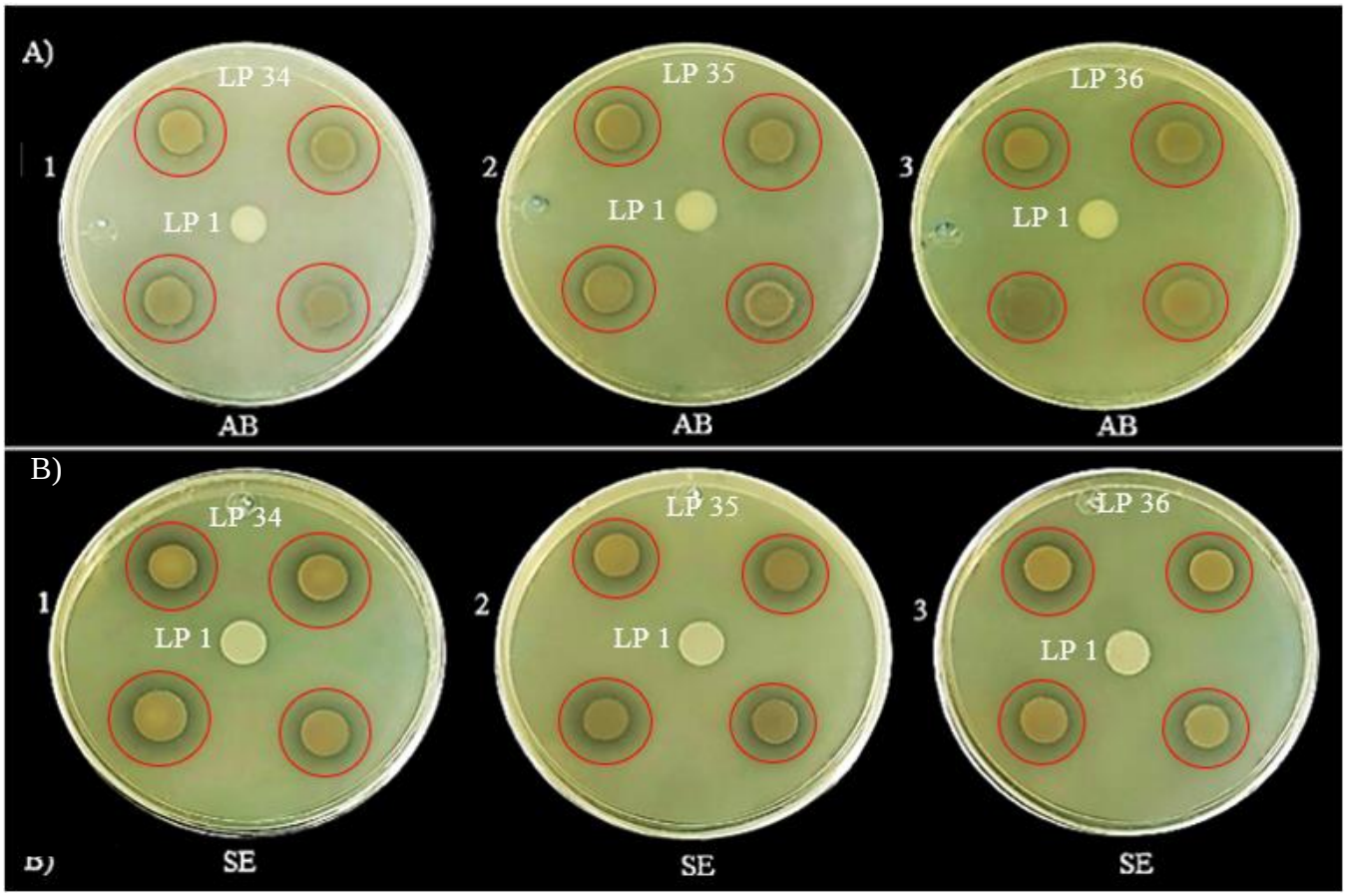


Figura 6. Efecto antibacteriano de cepas marinas. Las imágenes muestran el efecto antibacteriano (formación de halo de inhibición de crecimiento) de las cepas marinas LP 34, LP 35 y LP 36 (por cuadruplicado) contra *A. baumannii* (AB; panel A) y *S.* Typhimurium (SE; panel B). Los halos de inhibición de crecimiento de las cepas césped se muestran con un círculo rojo. Como control negativo se usó la cepa marina LP 1 (al centro de las cajas), la cual no formó halo de inhibición de crecimiento en las

cepas césped. Las imágenes son representativas de cinco diferentes experimentos realizados en diferentes días.

Tabla 7

Efecto antibacteriano de las cepas marinas LP 34, LP 35 y LP 36.

	Halos de inhibición de crecimiento en LB agar	
Cepas marinas	***A. baumannii***	***S.* Typhimurium**
LP 34	Positivo	Positivo
LP 35	Positivo	Positivo
LP 36	Positivo	Positivo
LP 1	Negativo	Negativo

Tabla 7. Efecto antibacteriano de las cepas marinas LP 34, LP 35 y LP 36. Se observó la formación de halos de inhibición. Los datos mostrados representan el resultado de cinco diferentes experimentos realizados en diferentes días.

9.2 El efecto antibacteriano de las cepas marinas LP 34, LP 35 y LP 36 probablemente se debe a la producción de piocianina.

Los cultivos de las cepas LP 34, LP 35 y LP 36 mostraron una pigmentación verde azulada (Figura 7). Este color es característico de las cepas de *P. aeruginosa* debido a la producción de piocianina, pigmento que tiene actividad antibacteriana [137]. Esto nos llevó a pensar que las cepas LP 34, LP 35 y LP 36 son *P. aeruginosa* y que su actividad antibacteriana se debe a la producción de piocianina. Para determinar esto, se realizaron los análisis que se describen a continuación.

En un proyecto paralelo realizado por el M.C. Luis Emanuel Romero González, estudiante de Doctorado de nuestro grupo, se identificaron estas 3 cepas marinas como *P. aeruginosa*, mediante la secuenciación del gen ribosomal 16S. Con base en esto, en nuestro estudio comparamos la actividad antibacteriana y la producción de piocianina entre las cepas marinas LP 34, LP 35 y LP 36, y cepas de referencia y asilados clínicos de *P. aeruginosa*. Interesantemente, las cepas marinas LP 34, LP 35 y LP 36, así como la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1 y el aislado clínico *P. aeruginosa* P1165, mostraron halos de inhibición de crecimiento tanto en *A. baumannii* como en *S.* Typhimurium (Figura 8, Tabla 8). En contraste, la cepa de referencia *P. aeruginosa* ATCC27853 y los asilados clínicos *P. aeruginosa* P1483 y P1503 no mostraron halos de inhibición de crecimiento en *A. baumannii* y *S.* Typhimurium (Figura 8, Tabla 8). Estos resultados revelaron que no todas las cepas de *P. aeruginosa* que se evaluaron presentan actividad antibacteriana

Los resultados anteriores nos llevaron a analizar si hay una relación entre la actividad antibacteriana y la producción de piocianina en las cepas de *P. aeruginosa* en estudio.

Figura 7. Cultivos de las cepas marinas LP 34, LP 35, LP 36 y LP 1. Las cepas se crecieron en medio LB, con agitación durante toda la noche (16 horas) a 37°C. Los cultivos de las cepas LP 34, LP 35 y LP 36 mostraron un color verde azulado, no así el de la cepa LP 1.

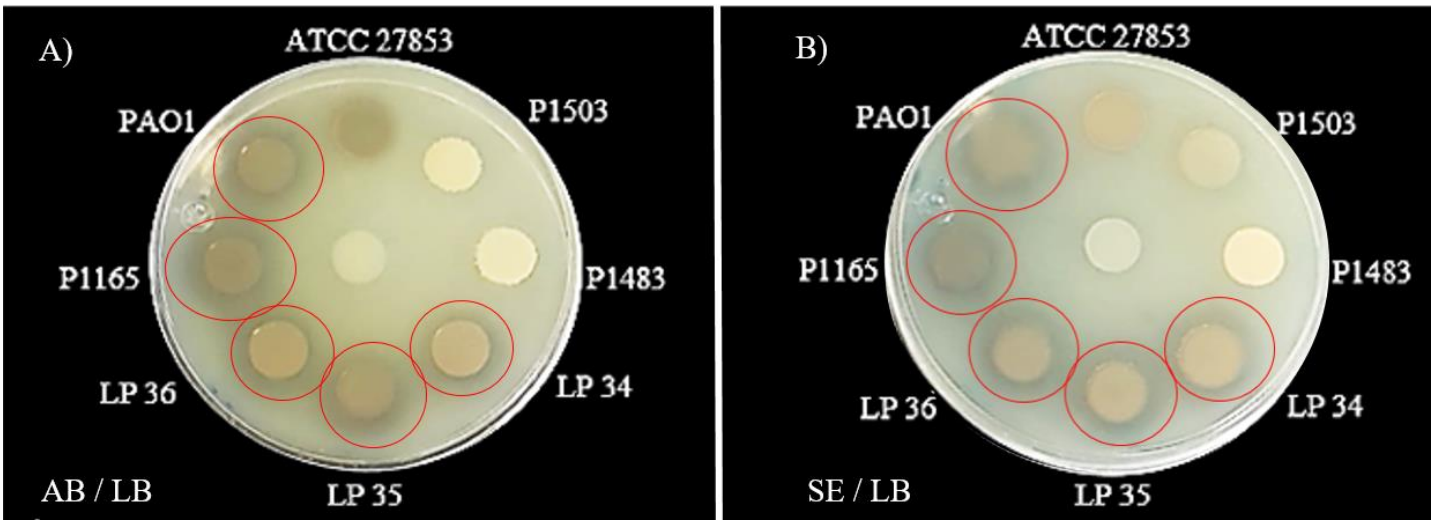


Figura 8. Efecto antibacteriano de diferentes cepas de *P. aeruginosa*. Se cocultivaron las cepas de *P. aeruginosa* con *A. baumannii* (AB; panel A) y *S. enterica* serovar Typhimurium (SE; panel B) durante 72 horas en cajas de LB agar. El halo de inhibición formado se muestra con un círculo rojo. Se analizaron las cepas marinas de *P. aeruginosa* LP 34, LP 35 y LP 36, las cepas de referencia de *P. aeruginosa* ATCC 27853 y PAO1, así como los aislados clínicos de *P. aeruginosa* P1165, P1483 y P1503. Como control negativo se usó la cepa marina LP 1 (al centro de las cajas), la cual no formó halo de inhibición de crecimiento en las cepas césped. Las imágenes son representativas de cinco diferentes experimentos realizados en diferentes días.

Tabla 8.

Efecto antibacteriano de las cepas de *P. aeruginosa*.

Halos de inhibición de crecimiento en LB agar		
Cepas	*A. baumannii*	*S.* Typhimurium
P1165	Positivo	Positivo
PAO1	Positivo	Positivo
ATCC 27853	Negativo	Negativo
P1503	Negativo	Negativo
P 1483	Negativo	Negativo
LP 34	Positivo	Positivo
LP 35	Positivo	Positivo
LP 36	Positivo	Positivo
LP 1	Negativo	Negativo

Tabla 8. Efecto antibacteriano de las cepas de *P. aeruginosa* en estudio. Se observó la formación de halos de inhibición. Los datos mostrados representan el resultado de cinco diferentes experimentos realizados en diferentes días.

Procedimos entonces a cuantificar la producción de piocianina en las cepas de *P. aeruginosa* en estudio. El método que se usa para esto nos permitió ir evaluando la producción de piocianina de manera cualitativa durante el procedimiento antes de la cuantificación final. Primeramente se crecieron cultivos en LB de todas las cepas de *P. aeruginosa*. Como se muestra en la figura 9, los cultivos de las cepas P1165, PAO1, LP 34, LP 35 y LP 36, pero no los de las cepas 27853, P1503, P1483 y LP 1 (control negativo), mostraron un color verde azulado, característico de la producción de piocianina. Posteriormente, se obtuvo el sobrenadante de los cultivos y se agregó a estos $CHCl_3$ para obtener la fase orgánica. El color azul de la fase orgánica indica la presencia de piocianina. La fase orgánica de las cepas P1165, PAO1, LP 34, LP 35 y LP 36, pero no la de las cepas 27853, P1503, P1483 y LP 1 (control negativo) mostraron un color azul. Después se agregó HCl a la fase orgánica; la aparición de una fase de color rosa-rojo indica la presencia de piocianina. Las cepas P1165, PAO1, LP 34, LP 35 y LP 36, pero no las cepas 27853, P1503, P1483 y LP 1 (control negativo) mostraron la fase color rosa-rojo. Finalmente, se determinó la absorbancia de la fase rosa-roja a una D.O. $_{520nm}$ y se cuantificó la piocianina (μg/ml) multiplicando el valor obtenido de D.O. $_{520nm}$ por el coeficiente de extinción molar 17.072. Como se muestra en la tabla 3, las cepas que mostraron mayor producción de piocianina fueron P1165, PAO1, LP 34, LP 35 y LP 36 (8.92 ± 1.19, 3.27 ± 1.53 ,4.34 ± 0.17, 3.90 ± 0.85 y 6.07 ± 1.02 nm, respectivamente); en contraste, las cepas 27853, P1503, P1483 y LP 1 mostraron un bajo nivel o no produjeron piocianina (1.53 ± 2.73, 0.61 ± 0.34, 1.36 ± 1.19 y 0 ± 0 nm respectivamente). Estos resultados confirman las mediciones cualitativas de producción de piocianina que observamos a lo largo del método de cuantificación (Figuras 10 y 11).

En conjunto, nuestros resultados muestran una correlación entre el efecto antibacteriano y la producción de piocianina en las cepas de *P. aeruginosa* evaluadas (Tabla 10).

.

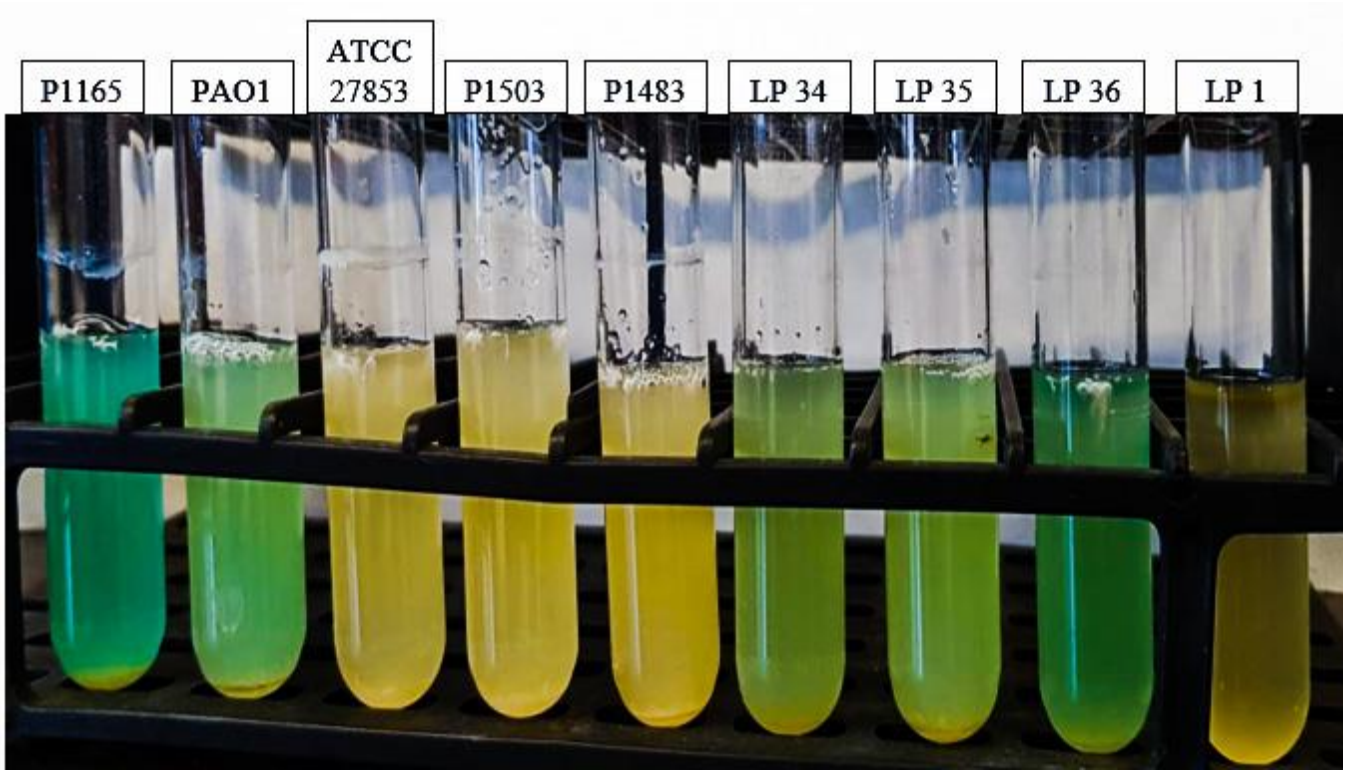


Figura 9. Cultivos de las cepas de *P. aeruginosa* en estudio. Las cepas se crecieron en LB, con agitación durante toda la noche (16 horas) a 37°C. Los cultivos de las cepas P1165, PAO1, LP 34, LP 35 y LP 36, pero no las cepas 27853, P1503, P1483 y LP 1 (control negativo) mostraron un color verde azulado. La imagen es representativa de cinco diferentes experimentos realizados en diferentes días.

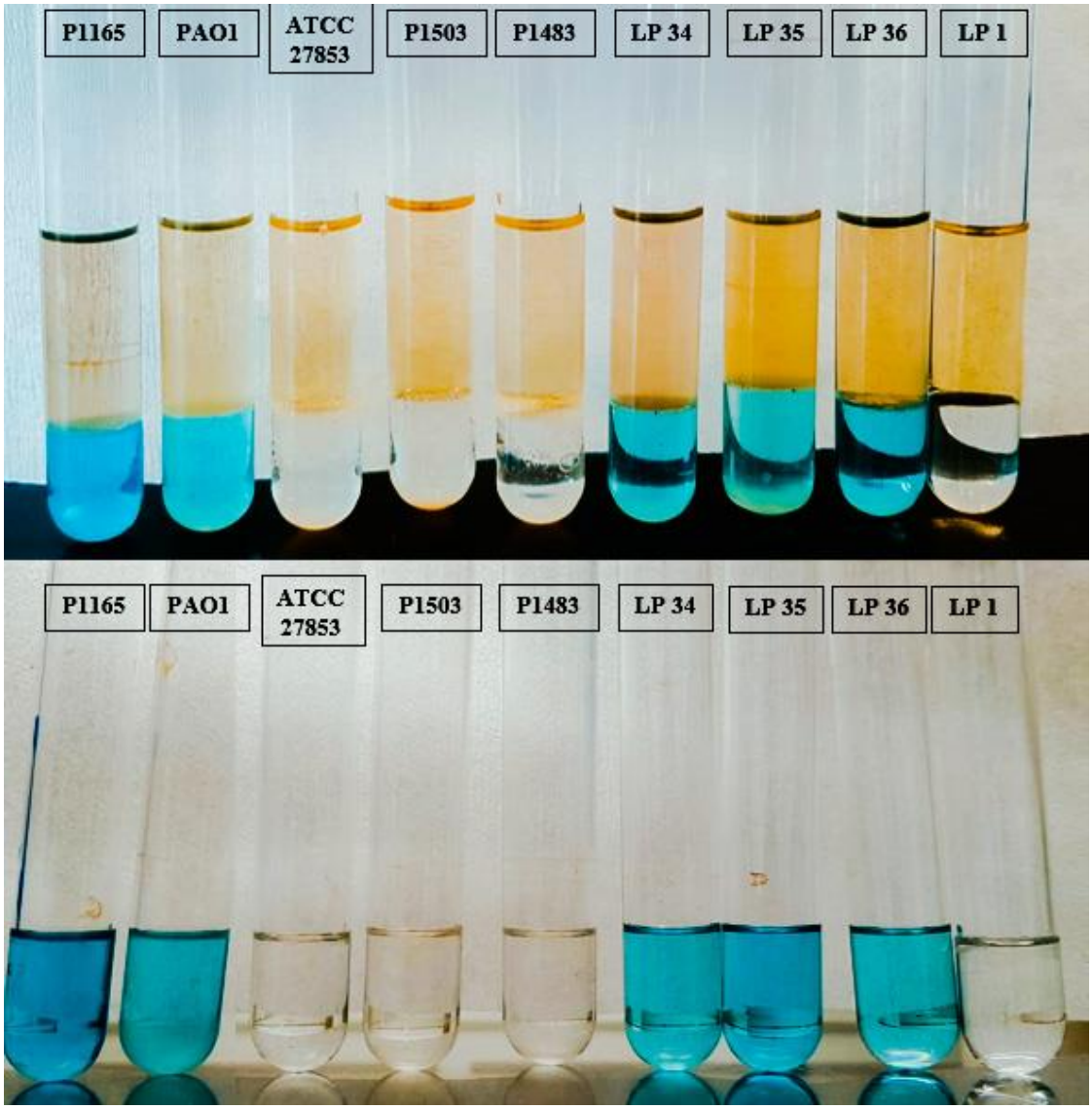


Figura 10. Presencia de piocianina en la fase orgánica de los sobrenadantes de cultivos de las cepas de *P. aeruginosa* en estudio. Las cepas se crecieron en LB con agitación durante toda la noche (16 horas) a 37°C. A los sobrenadantes de los cultivos (sin bacterias) se les agregó $CHCl_3$ para obtener la fase orgánica. El color azul de la fase orgánica indica la presencia de piocianina. El panel superior muestra la fase orgánica y la fase soluble. El panel inferior muestra sólo la fase orgánica. La fase orgánica de las cepas P1165, PAO1, LP 34, LP 35 y LP 36, pero no la de las cepas 27853, P1503, P1483 y LP 1 (control negativo) mostraron un color azul. Las imágenes son representativas de cinco diferentes experimentos realizados en diferentes días.

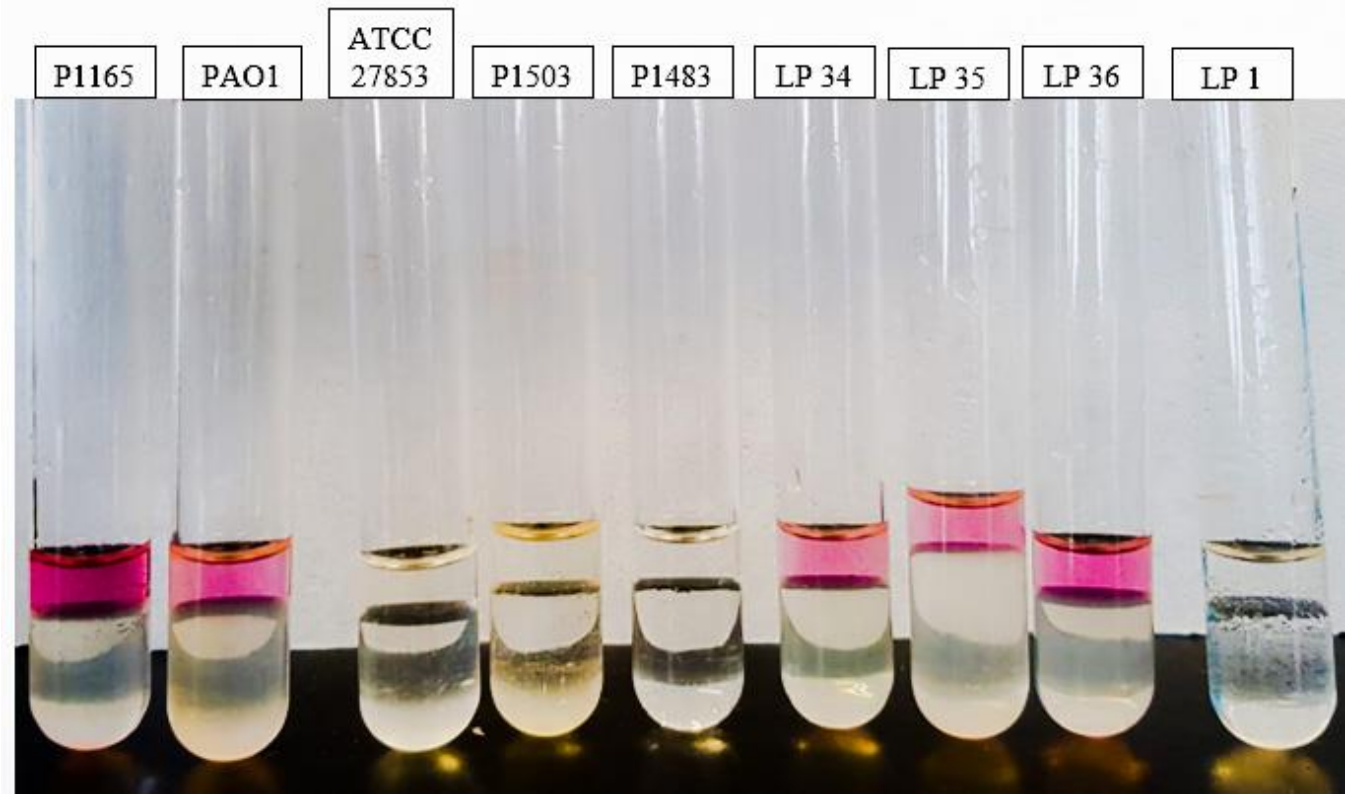


Figura 11. Piocianina revelada con ácido clorhídrico. Pigmentos extraídos con $CHCl_3$ a partir de cultivos en LB incubados toda la noche a 37°C con agitación, de las cepas de *P. aeruginosa* P1165, PAO1, ATCC 27853, P1503 y P1483, y las cepas productoras-marinas LP 34, LP 35, LP 36 y LP 1, respectivamente. Una vez que se extrajeron los pigmentos se añadió HCl 0.2 N (un color rosa-rojo indica la presencia de piocianina).

Tabla 9.

Cuantificación de piocianina producida por las cepas de *P. aeruginosa*

Cuantificación de piocianina producida por cepas de *P. aeruginosa*	
Cultivos en medio LB	
P 1165	8.92 ± 1.19
PAO1	3.27 ± 1.53
ATCC 27853	1.53 ± 2.73
P 1503	0.61 ± 0.34
P 1483	1.36 ± 1.19
LP 34	4.34 ± 0.17
LP 35	3.90 ± 0.85
LP36	6.07 ± 1.02
LP 1	0 ± 0

Tabla 9. Cuantificación de piocianina producida por las cepas de *P. aeruginosa* en estudio. La cuantificación de piocianina (µg/ml) se obtuvo multiplicando el valor de la D.O. $_{520nm}$ de la fase orgánica ácida de los sobrenadantes de cultivos por el coeficiente de extinción molar 17.072. Los datos mostrados representan el promedio y la desviación estándar de cinco diferentes experimentos realizados en diferentes días.

Tabla 10

Correlación entre la actividad antibacteriana y la producción de piocianina de las cepas de *P. aeruginosa*.

Cuantificación de piocianina - Actividad antibacteriana			
Cepas	Producción de piocianina LB (µg/ml)	*A. baumannii* HI	*S.* Typhimurium HI
P1165	8.92 ± 1.19	Positivo	Positivo
PAO1	3.27 ± 1.53	Positivo	Positivo
ATCC 27853	1.53 ± 2.73	Negativo	Negativo
P1503	0.61 ± 0.34	Negativo	Negativo

P 1483	1.36 ± 1.19	Negativo	Negativo
LP 34	4.34 ± 0.17	Positivo	Positivo
LP 35	3.90 ± 0.85	Positivo	Positivo
LP 36	6.07 ± 1.02	Positivo	Positivo
LP 1	0 ± 0	Negativo	Negativo

Tabla 10. Correlación entre la actividad antibacteriana y la producción de piocianina de las cepas de *P. aeruginosa* en estudio. Se muestra el halo de inhibición (HI) del crecimiento de *A. baumannii* o *S.* Typhimurium y la producción de piocianina por las cepas de *P.aeruginosa* en estudio.

X. DISCUSIÓN

La evidencia sobre la problemática ocasionada por bacterias patógenas son capaces de resistir el efecto de los antibióticos es bastante clara y cada vez se reporta con mayor frecuencia el aislamiento de estas bacterias; la perspectiva actual apunta a un futuro con patógenos letales que no podremos combatir [39]. El desarrollo y avances en la medicina gracias al uso de los antibióticos puede ser comprometido por las infecciones por bacterias resistentes a estos. La presión de selección que estamos generando nos ha mostrado que nuestro manejo y gestión de los antibióticos tiene injerencia directa en neutralizar su propio efecto. Una realidad documentada es que los enfoques principales de la industria farmacéutica se encuentran dirigidos en el desarrollo de productos más redituables, económicamente hablando. Es posible que exista una correlación con la incursión en el mercado de medicamentos para el tratamiento de enfermedades crónicas (diabetes, cardiopatías, asma, etc.), ya que las inversiones han incrementado notablemente por estos fármacos [152]. Conocemos las distintas contribuciones de algunos sectores que han coadyuvado a generar e incrementar este problema de salud pública, también, es de nuestro conocimiento la falta de educación acerca del uso correcto de los antibióticos [32]. Todas las variables mencionadas suman a la problemática, pero recién se ha comenzado a considerar como un peligro que se tiene que solucionar en los próximos años dada la magnitud exponencial del riesgo biológico; consecuencia de ello, distintos organismos han instado a los gobiernos a implementar estrategias para atender la situación emergente [34]. La demanda de nuevos antibióticos dirige las investigaciones hacia nichos prístinos o poco explorados que alberguen posibles compuestos con cualidades antibacterianas novedosas.

Las nuevas técnicas de aislamiento y tecnología de inmersión mejorada han permitido evaluar la diversidad microbiológica de las profundidades marinas, antes una posibilidad inaccesible. La explotación de este hábitat supone altas probabilidades en favor al descubrimiento de compuestos efectivos contra las bacterias patógenas que representan un problema de salud pública. El fundamento de este proyecto se basa

en el aprovechamiento de los metabolitos secundarios biosintetizados por bacterias nativas y ubicuas de profundidades marinas, cuyo desarrollo adaptativo en este nicho particular las ha acondicionado para darles características diferenciales respecto a sus pares terrestres. A partir de esta fuente, nos planteamos identificas bacterias con capacidad de inhibir elcrecimiento de los patógenos *A. baumannii* y *S.* Typhimurium.

De 82 cepas bacterianas marinas que analizamos en nuestro proyecto, encontramos que 8 presentaron actividad inhibitoria contra *A. baumannii* y *S.* Typhimurium, de las cuales 7 han sido identificadas como *P. aeruginosa* por medio de la secuenciación de su gen ribosomal 16S, así como por cualidades fenotípicas características de *P. aeruginosa*, como la producción del pigmento azul-verdoso denominado piocianina (este estudio; Tesis Doctoral del M.C. Luis Romero). Interesantemente, la secuenciación y análisis bioinformático del genoma reveló que una de estas 8 cepas con actividad antibacteriana representa una nueva especie de *Pseudomonas* (Tesis Doctoral del M.C. Luis Romero).

En nuestro proyecto seleccionamos 3 de las 8 cepas con actividad antibacteriana para mayor caracterización, las cuales generaron un halo de inhibición de crecimiento más evidente contra *A. baumannii* y *S.* Typhimurium. Comparamos las propiedades antibacterianas de estas 3 cepas marinas (LP 34, LP 35 y LP 36), 3 aislados clínicos (P1165, P1483 y P1503) y 2 cepas de referencia (PAO1 y ATCC 27853) de *P. aeruginosa*. Nuestros resultados muestran una correlación entre la actividad antibacteriana y la producción de piocianina de las cepas analizadas. Las cepas LP 34, LP 35, LP 36, P1165 y PAO1 mostraron actividad antibacteriana contra *A. baumannii* y *S.* Typhimurium y la más alta producción de piocianina, mientras las cepas P1483, P1503 y ATCC 27853 no mostraron actividad antibacteriana y produjeron bajos niveles de piocianina (Tabla 10). La piocianina es un compuesto que pertenece al grupo de las fenazinas, la cual da una coloración azul-verdosa singular de los cultivos de *P. aeruginosa* [153]. La piocianina es un importante factor de virulencia, pero no el único, de *P. aeruginosa*; además, diferentes estudios han mostrado que este pigmento tiene actividad antibacteriana [154, 155]. Específicamente, se ha reportado el efecto antagonista de la piocianina contra *Micrococcus luteus*, *Proteus vulgaris*, *Acinetobacter sp*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhi, *proteus vulgaris*, etc. [156, 157]. También contra bacterias resistentes a los antibióticos como *S. aureus* (MDR), *E. coli* (ESBL) y *Klebsiella pneumoniae* (ESBL) [158]. La piocianina debe su efecto antibacteriano a la capacidad de generar estrés oxidativo al interactuar con el oxígeno molecular, interrumpiendo el flujo de electrones en la cadena respiratoria y por la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), principalmente O^{2-} y H_2O_2; este mecanismo ocasiona un efecto bacteriostático en las células susceptibles [159, 160, 161, 162]. La generación de ROS induce daños a los organelos celulares, agotamiento de NAD(P)H y daño al ADN [163, 164].

Nuestros resultados apoyan a que el efecto antibacteriano que encontramos en las 7 cepas marinas de *P. aeruginosa* está asociado en gran medida a la producción de piocianina; sin embargo, no podemos descartar la producción de algún otro compuesto o mecanismo antibacteriano por estas cepas, incluso, se sabe que *P. aeruginosa* produce distintas fenazinas con actividad redox propia [165, 166]. Una opción para definir el efecto antibacteriano requeriría de generar una cepa mutante de los dos operones para la biosíntesis de piocianina en las cepas marinas y clínicas de *P. aeruginosa*, para determinar si éstas producen un compuesto antibacteriano adicional a la piocianina. Interesantemente, la otra cepa marina (LP 18) que presenta actividad antibacteriana y que se ha identificado como una nueva especie de

Pseudomonas, no produce piocianina; por lo tanto, esta cepa marina tiene el potencial de producir un nuevo compuesto antibacteriano (Tesis Doctoral del M.C. Luis Romero).

Llama la atención de que las 3 cepas marinas de *P. aeruginosa* que caracterizamos en este estudio presentan niveles de producción de piocianina por arriba de los de la cepa PAO1 (Tabla 10), la cual es la cepa que se usa como referencia para la mayoría de los estudios de *P. aeruginosa*. Además, las otras 4 cepas marinas de *P. aeruginosa* también presentan altos niveles de producción de piocianina (Tesis Doctoral del M.C. Luis Romero). Nuestros resultados sugieren que la piocianina es relevante para la prevalencia de *P. aeruginosa* en el ambiente marino, posiblemente como un eficiente inhibidor de bacterias competidoras.

XI. CONCLUSIONES

- Nuestro análisis de la actividad antibacteriana nos permitió identificar 8 cepas marinas que presentan actividad antibacteriana contra *A. baumannii* y *S.* Typhimurium; 7 de estas cepas han sido identificadas como *P. aeruginosa*.

- Nuestros resultados sugieren que la actividad antibacteriana mostrada por las 3 cepas marinas de *P. aeruginosa* caracterizadas en este estudio se debe a la producción de piocianina.

XII. PERSPECTIVAS

Determinar si además de la piocianina, las cepas marinas de *P. aeruginosa* identificadas en estudio producen otros compuestos con actividad antibacteriana. Para esto se deben generar mutantes que carezcan de los dos operones biosintéticos de piocianina: *phzA1-G1* (*phz1*) y *phzA2*-G2 (*phz2*).

XIII. REFERENCIAS

1. Madigan, MT; Martinko, JM; Dunlap, PV; Clark, DP. (2009). Brook. Biología de los microorganismos. España: Pearson Education. Capítulo 1. pp 8-9.

2. Beltrán B, Carlos. (2004). Farmacocinética y farmacodinamia de antimicrobianos: Utilidad práctica. Revista chilena de infectología, 21 (Supl. 1), 39-44. https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182004021100008

3. Quintana A. Bases Microbiológicas del uso de antimicrobianos. Folleto Unan-León. (2001). http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2028.pdf

4. López, J.M.; Terapéutica.; Universidad Nacional Autónoma de México. Departamento de Microbiología y Parasitología. (2015). http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/terapeutica.html

5. Vinuesa, F., P.; Universidad Nacional Autónoma de México. Un peligroso experimento a escala global, selección de bacterias multirresistentes a antibióticos. Biotecnología en movimiento (2018). https://biotecmov.files.wordpress.com/2018/11/orig-electrc3b3nicos-bm15.pdf

6. Campo-Moreno R., Alarcon-Cavero T., D'Auria G., Delgado-Palacio S., Ferrer-Martinez M. (2018). Microbiota and Human Health: characterization techniques and transferenceEnferm. Infecc. Microbiol Clin. 36 241–245. 10.1016 / j.eimc.2017.02.007

7. Serra, J. (2016). Intestinal microbiota. Atención Primaria, 48 (6), 345-346.doi: 10.1016 / j.aprim.2016.04.003

8. Gómez A. (2019). Biomedica: revista del Instituto Nacional de Salud, 39 (4), 617–621.

9. Guarner, F. (2011). The intestinal microbiota and inflammatory bowel disease. Gastroenterología Y Hepatología, 34 (3), 147-154. doi: 10.1016 / j.gastrohep.2010.11.009.

10. Aslam, B., Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M. H.Baloch, Z. (2018). Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. Infection and drug resistance, 11, 1645–1658. doi:10.2147/IDR.S173867.

11. Noriega, E., et al. (2014). La evolución de la resistencia bacteriana en México, 1973-2013. Biomédica, 34 (1):181-190. doi.org/10.7705/biomédica. v34i0.2142.

12. T.Kieser, Mj Bibb, Mj Buttner, KF Chater, DA Hopwood. (2000). Practical *Streptomyces* genetics, Norwich, UK: John Innes Foundation

13. Raoult D. Alice's living croquet theory. Int J Antimicrob Agents (2016). 47:249. doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.01.013.

14. Davies J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. Science, 264. (1994), págs. 375 – 382.

15. D'CostaVM, Sampling the Antibiotic Resistome. Science, 311 (2006). Págs. 374 - 377, 10.1126 / science.1120800.

16. Elena Kashuba, Alexey A. Dmitriev, Shady Mansour Kamal, Ojar Melefors, Gennady Griva, Ute Römling, Ingemar Ernberg, Vladimir Kashuba & Anatoli Brouchkov. (2017). Ancient permafrost *staphylococci* carry antibiotic resistance genes, Microbial Ecology in Health and Disease, 28, DOI: 10.1080/16512235.2017.1345574.

17. Brown, W. J. National Committee for Clinical Laboratory Standards Agar dilution susceptibility testing of anaerobic gram-negative bacteria. (1988). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *32*(3), 385–390. doi:10.1128/aac.32.3.385.

18. Peterson, J., Garges, S., Giovanni, M., McInnes, P., Wang, L., Schloss, J. A. Guyer, M. (2009). The NIH human microbiome project. Genome Research, 19(12), 2317–2323. doi:10.1101/gr.096651.109

19. Lynch SV, Pedersen O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. N Engl J Med. 2016 Dec 15;375(24):2369-2379. doi: 10.1056/NEJMra1600266. PMID: 27974040.

20. Merino J, Borja V, Lopez O, Ochoa J, Clark E, Petersen L, Caballero S. Ivermectin and the odds of hospitalization due to COVID-19: evidence from a quasi-experimental analysis based on a public intervention in Mexico City. (2022). Doi: 10.31235/osf.io/r93g4

21. Palacio-Mejía, L.S. *et al.* (2022) 'Leading causes of excess mortality in Mexico during the COVID-19 pandemic 2020–2021: A death certificates study in a middle-income country', *The Lancet Regional Health - Americas*, 13, p. 100303. doi:10.1016/j.lana.2022.100303.

22. Clinical Management of Covid-19. Interim Guidance WHO. May 2020.

23. Sieswerda E, de Boer MGJ, Bonten MMJ, et al. Recommendations for antibacterial therapy in adults with COVID-19 - an evidence based guideline [published online ahead of print, 2020 Oct 1]. Clin Microbiol Infect. 2020; S1198-743X(20)30594-2. doi:10.1016/j.cmi.2020.09.041.

24. Di Líbero, Eugenia; Ezcurra, Cecilia; Mozún Tamborenea, Fernando; Rodríguez, Claudia; Clara, Liliana. Consideraciones Para el Uso Responsable de ATB en COVID-19. Comisión de Uso Adecuado de Recursos. Sociedad Argentina de Infectología.

25. Bengoechea JA, Bamford CG. SARS-CoV-2, bacterial co-infections, and AMR: the deadly trio in COVID-19?. EMBO Mol Med. 2020;12(7):e12560. doi:10.15252/emmm.202012560.

26. COVID-19 rapid guideline: antibiotics for pneumonia in adults in hospital. NICE guideline. May 2020.

27. Mirzaei R, Goodarzi P, Asadi M, et al. Bacterial co-infections with SARS-CoV-2 [published online ahead of print, 2020 Aug 8]. IUBMB Life. 2020;10.1002/iub.2356. doi:10.1002/iub.2356.

28. Lai CC, Wang CY, Hsueh PR. Co-infections among patients with COVID-19: The need for combination therapy with non-anti-SARS-CoV-2 agents?. J Microbiol Immunol Infect. 2020; 53(4):505-512. doi:10.1016/j.jmii.2020.05.013.

29. Moreno M, Claudia, González E, Rubén, & Beltrán, Constanza. (2009). Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello, 69(2), 185-192. https://dx.doi.org/10.4067/S0718-48162009000200014.

30. López, B., Rendón, F. (2006). Transferencia de material genético entre bacterias en ambiente acuáticos ¿un problema de salud pública?. Revista digital universitaria, 7 (11), http://www.revista.unam.mx/vol.7/num11/art89/nov_art89.pdf.

31. Jung Cook, Helgi (2010). Uso racional de antibióticos en México. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 41 (2), 5-6. ISSN: 1870-0195. Disponible en: https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57914151001.

32. Velasco, J., Córdova, J. Valdespino, J. y Ponce de León, S. (2010). México para el mundo: la reciente pandemia de influenza, Science Direct, 12 (49), 2.

33. Resistencia a los Antibióticos. Abril 2019, de Organización Mundial de la Salud. (2018). Sitio web: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos

34. [Lista OMS de patógenos prioritarios para la I+D de nuevos antibióticos]. (2017, 27 febrero). Recuperado de https://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed.

35. Meek R.W., Vyas H., & Piddock L.J. (2015). Nonmedical uses of antibiotics: time to restrict their use?, PLOS Biology, 13(10). doi: 10.1371/journal. pbio.1002266.

36. 24 Report of the Joint Committee of the use of antibiotics in animal husbandry and veterinary medicine. Swann Committee Report. London: HMSO, (1969).

37. Torres C, Zarazaga M. Repercusiones en el hombre del consumo de antibióticos por animales. Revista Española de Quimioterapia. (1998); 11:29-35.

38. Torres, C. y Zarazaga, M. (2002). Antibióticos como promotores del crecimiento en animales. ¿Vamos por el buen camino?. Gaceta Sanitaria, 16 (2), 109-112. doi: 10.1016 / s0213-9111 (02) 71640-3.

39. Hollis A., and Ahmed, Z. (2013), Preserving antibiotics, rationally. The New England Journal of Medicine, 369:2474- 2476.

40. Ewers, C., Grobbel, M., Stamm, I., Kopp, P., Diehl, I. y Semmler, T. *et al.* (2010). Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* among companion animals. Journal Of Antimicrobial Chemotherapy, *65* (4), 651-660. doi: 10.1093 / jac / dkq004.

41. Ewers, C., Grobbel, M., Stamm, I., Kopp, P., Diehl, I. y Semmler, T. et al. (2010). Aparición de la pandemia humana O25: *Escherichia coli* productora de β-lactamasa de espectro extendido H4-ST131 CTX-M-15 entre los animales de compañía. Journal Of Antimicrobial Chemotherapy, *65* (4), 651-660. doi: 10.1093 / jac / dkq004.

42. Ewers, C., Grobbel, M., Stamm, I., Kopp, P., Diehl, I., & Semmler, T. et al. (2010). Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum-β-lactamase-producing Escherichia coli among companion animals. Journal Of Antimicrobial Chemotherapy, 65(4), 651-660. doi: 10.1093/jac/dkq004.

43. Ewers, C., Grobbel, M., Stamm, I., Kopp, P., Diehl, I. y Semmler, T. et al. (2010). Aparición de la pandemia humana O25: *Escherichia coli* productora de β-lactamasa de espectro extendido H4-ST131 CTX-M-15 entre los animales de compañía. Revista de quimioterapia antimicrobiana, 65 (4), 651-660. doi: 10.1093 / jac / dkq004.

44. Categorisation of antibiotics in the European Union. European Medicines Agency, Science Medicines Health. (12 December 2019). https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/categorisation-antibiotics-european-union-answer-request-european-commission-updating-scientific_en.pdf.

45. Cabrera, Cristina Eugenia, et al. "La resistencia de bacterias a antibioticos, antisepticos y desinfectantes una manifestacion de los mecanismos de supervivencia y adaptacion.".(2020). Colombia Medica, vol. 37, no. 2, 2007, p. 149+. Accessed 18 Apr.

46. McMurry LM, Oethinger M, Levy SB. Triclosan targets lipid synthesis. Nature. (1998); 394 (6693): 531-2. pmid: 9707111.

47. Mirada WH, Zhang L, Abdouslam NA, Hawkey PM, Calvo-Bado L, Royle J, et al. (2011); Impactos de la actividad antropogénica en la ecología de integrones de clase 1 y genes asociados a integrones en el medio ambiente. ISME J. 5 (8): 1253–61. pmid: 21368907.

48. Larsson DG, de Pedro C, Paxeus N. (2007). El efluente de los fabricantes de medicamentos contiene niveles extremadamente altos de productos farmacéuticos. J Hazard Mater. 148 (3): 751-5. pmid: 17706342.

49. Castro-Pastrana L.I., Baños-Medina M.I., López-Luna M.A. y Torres-García B.L. (2015). Ecofarmacovigilancia en México: perspectivas para su implementación. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas 46 (3), 16-19.

50. Szabo J, Minamyer S. (2014). Descontaminación de agentes biológicos de la infraestructura de agua potable: una revisión de la literatura y un resumen. Environ Int.; 72: 124–8. pmid: 24548733.

51. O'Neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. The Review on Microbial Resistance. https://amr-review.org/ Publications.html.

52. Davies SC, Fowler T, Watson J, Livermore DM, Walker D. (2013). Annual Report of the Chief Medical Officer: infection and the rise of antimicrobial resistance. Lancet; 381: 1606– 1609.

53. Hollis, A. y Ahmed, Z. (2013). Preserving antibiotics, rationally. Revista de medicina de Nueva Inglaterra, 369 (26), 2474-2476. doi: 10.1056/nejmp1311479.

54. Jukes, TH y WL Williams. (1953). Nutritional effects of antibiotics. Farmacol. Rev. 5: 381-

55. Ewing, W. N., and D. J. A. Cole. (1994). The living gut. An introduction to microorganisms in nutrition. Context, Dungannon, Ireland.

56. Dahiya, J., Wilkie, D., Van Kessel, A. y Drew, M. (2006). Potential strategies for controlling necrotic enteritis in broiler chickens in post-antibiotic era. *Anim. Feed Sci. Technol*, 129 (1-2), 60-88. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2005.12.003.

57. Castañón, J. (2007). History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poult. Sci*, 86 (11), 2466-2471. doi: 10.3382/ps.2007-00249.

58. Wierup, M. (2001). The experience of reducing antibiotics used in animal production in the Nordic countries. International Journal Of Antimicrobial Agents, 18(3), 287-290. doi: 10.1016/s0924-8579(01)00380-6.

59. Stein, H., & Kil, D. (2006). Reduced use of antibiotic growth promoters in diets fed to weanling Pigs: Dietary Tools, Part 2. Animal Biotechnology, 17(2), 217-231. doi: 10.1080/10495390600957191.

60. Cromwell, G. L. (1991). Antimicrobial agents in swine nutrition. Edited by: Miller, E. R., Ullrey, D. E. and Lewis, A. J. 297–314. Boston, MA: Butterworth-Heinemann.

61. Cromwell, G. (2002). Why and how antibiotics are used in swine production. Animal Biotechnology, 13(1), 7-27. doi: 10.1081/abio-120005767.

62. Jones, P. y Tarrant, M. (1982). El efecto de varios factores sobre la eficacia de la tilosina como promotor del crecimiento en cerdos clínicamente sanos. Ciencia Animal, 34 (2), 115-121. doi: 10.1017/S0003356100000581.

63. Roth, F., & Kirchgessner, M. (1993). Influence of Avilamycin and Tylosin on retention and excretion of nitrogen in finishing pigs. Journal Of Animal Physiology And Animal Nutrition, 69(1-5), 245-250. doi: 10.1111/j.1439-0396.1993.tb00811.x.

64. Francois AC. Mode of action of antibiotics on growth. World Review of Nutrition and Dietetics. 1961; 3:21-64. PMID: 13959179.

65. Vervaeke, I., Decuypere, J., Dierick, N. y Henderickx, H. (1979Quantitative in Vitro Evaluation of the Energy Metabolism Influenced by Virginiamycin and Spiramycin used as Growth Promoters in Pig Nutrition. Journal of Animal Science, 49 (3), 846-856. doi: 10.2527/jas1979.493846x.

66. Saunders, D. y Sillery, J. (1982). Saunders, D., & Sillery, J. (1982). Effect of lactate and H+ on structure and function of rat intestine. Digestive Diseases And Sciences, 27(1), 33-41. doi: 10.1007/bf01308119, 27 (1), 33-41. doi: 10.1007/bf01308119.

67. Tammar, A. (1986). Sterols and bile acids. New comprehensive biochemistry, volumen 12 (General editors: A. Neuberger y LLM van Deenen). FEBS Cartas, 204 (1), 158-158. doi: 10.1016/0014-5793(86)81412-0.

68. Castanon, J. (2007). History of the Use of Antibiotic as Growth Promoters in European Poultry Feeds. Poultry Science, 86(11), 2466-2471. doi: 10.3382/ps.2007-00249.

69. Pettigrew, J. (2006). Reduced Use of Antibiotic Growth Promoters in Diets Fed to Weanling Pigs: Dietary Tools, Part 1. Animal Biotechnology, 17(2), 207-215. doi: 10.1080/10495390600956946.

70. Murray, C., Ikuta, K., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., & Gray, A. et al. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. The Lancet, 399(10325), 629-655. doi: 10.1016/s0140-6736(21)02724-0.

71. Smith T. (2000). Antibiotics from soil bacteria. Nat Struct Biol. Mar; 7(3):189-90. doi: 10.1038/73283. PMID: 10700273

72. Battistuzzi & Hedges (2008). A Major Clade of Prokaryotes with Ancient Adaptations to Life on Land. Multiple Evidence Supporting Two Major Groups of Eubacteria. Mol Biol Evol. (2009). 26 (2): 335-343. doi: 10.1093/molbev/msn247.

73. Baltz, R. H. (2007). Antimicrobials from *actinomycetes*: back to the future. Microbe 2, 125–131.

74. Khan NA, Osman K, Goldsworthy GJ. (2008) Lysates of Locusta migratoria brain exhibit potent broad-spectrum antibacterial activity. J Antimicrob Chemother. 62(3):634-5. DOI: 10.1093/jac/dkn239. Epub 2008 Jun 13. PMID: 18552339.

75. Zhao, L. X., Huang, S. X., Tang, S. K., Jiang, C. L., Duan, Y., Beutler, J. A., et al. (2011). Actinopolysporins A–C and Tubercidin as a Pdcd4 stabilizer from the halophilic *actinomycete Actinopolyspora erythraea* YIM 90600. Nat. Prod. 74, 1990–1995. doi: 10.1021/np200603g.

76. Smith, T. Antibiotics from soil bacteria. Nat Struct Mol Biol (2000). 7: 189– 190.

77. Brook, I. (1999). Bacterial interference. Crit. Rev. Microbiol. 25, 155–172. DOI: 10.1080/10408419991299211.

78. Wang, C., Li, M., Dong, D., Wang, J., Ren, J., Otto, M., et al. (2007). Role of ClpP in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. Microbes. Infect. 9, 1376–1383. doi: 10.1016/j.micinf.2007.06.012.

79. Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. Phytochemistry; 64: 3– 19.

80. Stone, MJ, Williams, DH. (1992). On the evolution of functional secondary metabolites (natural products). Mol Microbiol; 6: 29– 34.

81. Debbab, A., Aly, A. H., Lin, W. H., and Proksch, P. (2010). Bioactive compounds from marine bacteria and fungi. Microb. Biotechnol. 3, 544–563. DOI: 10.1111/j.1751-7915.2010.00179.x.

82. Papaleo, M. C., Romoli, R., Bartolucci, G., Maida, I., Perrin, E., Fondi, M. *et. al*. (2013). Bioactive volatile organic compounds from Antarctic (sponges) bacteria. Natl. Biotechnol. 30, 824–838. DOI: 10.1016/j.nbt.2013.03.011.

83. Parrilli, E., Papa, R., Carillo, S., Tilotta, M., Casillo, A., Sannino, F., et al. (2015). Anti-biofilm activity of *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 against *Staphylococcus epidermidis* biofilm: evidence of a signal molecule involvement? Int. J. Immunopathol. Pharmacol. 28, 104–113. doi: 10.1177/0394632015572751.

84. Skropeta, D.; Wei, L. (2014). Recent advances in deep-sea natural products. Nat. Prod. Rep. 31, 999–1025.

85. Peraud, O., Biggs, J. S., Hughen, R. W., Light, A. R., Concepcion, G. P., Concepcion, G. P., et al. (2009). Microhabitats within venomous cone snails contain diverse *Actinobacteria*. Appl. Env. Microbiol. 75, 6820–6826. doi: 10.1128/AEM.01238-09.

86. Peraud, O., Biggs, J. S., Hughen, R. W., Light, A. R., Concepcion, G. P., Concepcion, G. P., et al. (2009). Microhabitats within venomous cone snails contain diverse *Actinobacteria*. Appl. Env. Microbiol. 75, 6820–6826. doi: 10.1128/AEM.01238-09.

87. Jose, P. A., Santhi, V. S., and Jebakumar, S. R. D. (2011). Phylogenetic−affiliation, antimicrobial potential and PKS gene sequence analysis of moderately halophilic Streptomyces sp. inhabiting an Indian saltpan. J. Basic Microbiol. 51, 348–356. doi: 10.1002/jobm.201000253.

88. Carr, G., Poulsen, M., Klassen, J. L., Hou, Y., Wyche, T. P., Bugni, T. S. *et. al*. (2012). Microtermolides A and B from Termite-sssociated *Streptomyces sp*. and structural revision of vinylamycin. Org. Lett. 14, 2822–2825. doi: 10.1021/ol301043p.

89. Subramani, R., and Aalbersberg, W. (2012). Marine *actinomycetes*: an ongoing source of novel bioactive metabolites. Microbiol. Res. 167, 571–580. doi: 10.1016/j.micres.2012.06.005.

90. Hamedi, J., Mohammadipanah, F., and Ventosa, A. (2013). Systematic and biotechnological aspects of halophilic and halotolerant actinomycetes. Extremophiles 17, 1–13. doi: 10.1007/s00792-012-0493-5.

91. Jose, P. A., Sivakala, K. K., and Jebakumar, S. R. D. (2013). Formulation and statistical optimization of culture medium for improved production of antimicrobial compound by *Streptomyces sp.* JAJ06. Int. J. Microbiol. 2013:526260. doi: 10.1155/2013/526260.

92. Yuan, M., Yu, Y., Li, H.-R., Dong, N., and Zhang, X.-H. (2014). Phylogenetic diversity and biological activity of actinobacteria isolated from the chukchi shelf marine sediments in the Arctic Ocean. Mar. Drugs 12, 1281–1297. doi: 10.3390/md12031281.

93. Tortorella, E.; Tedesco, P.; Palma Esposito, F.; January, G.G.; Fani, R.; Jaspars, M.; De Pascale, D. (2018). Antibiotics from Deep-Sea Microorganisms: Current Discoveries and Perspectives. Mar. Drugs, 16, 355.

94. Danovaro, R.; Carugati, L.; Berzano, M.; Cahill, A.E.; Carvalho, S.; Chenuil, A. (2016). Implementing and Innovating Marine Monitoring Approaches for Assessing Marine Environmental Status. Front. Mar. Sci, 3.

95. Schrenk, M.O.; Kelley, D.S.; Delaney, J.R.; Baross, J.A. (2003). Incidence and diversity of microorganisms within the walls of an active deep-sea sulfide chimney. Appl. Environ. Microbiol. 69, 3580–3592.

96. Skropeta, D. (2008). Deep-sea natural products. Nat. Prod. Rep. 25, 1131.

97. Thaler, A.D.; Van Dover, C.L.; Vilgalys, R. (2012). *Ascomycete* phylotypes recovered from a Gulf of Mexico methane seep are identical to an uncultured deep-sea fungal clade from the Pacific. Fungal Ecol.

98. Abdel-Mageed, W.M.; Milne, B.F.; Wagner, M.; Schumacher, M.; Sandor, P.; Pathom-aree, W.; Goodfellow, M.; Bull, A.T.; Horikoshi, K.; Ebel, R. (2010). Dermacozines, a new phenazine family from deep-sea dermacocci isolated from a Mariana Trench sediment. Org. Biomol. Chem. 8, 2352–2362.

99. Huang, H.; Yang, T.; Ren, X.; Liu, J.; Song, Y.; Sun, A.; Ma, J.; Wang, B.; Zhang, Y.; Huang, C. (2012); et al. Cytotoxic angucycline class glycosides from the deep sea actinomycete *Streptomyces lusitanus* SCSIO LR32. J. Nat. Prod. 75, 202–208.

100. Li, S.; Tian, X.; Niu, S.; Zhang, W.; Chen, Y.; Zhang, H.; Yang, X.; Zhang, W.; Li, W.; Ju, J.; et al. (2011) *Pseudonocardians* A-C, new diazaanthraquinone derivatives from a deap-sea *actinomycete Pseudonocardia sp*. SCSIO 01299. Mar. Drugs. 9, 1428–1439.

101. Wendy Escobedo-Hinojosa, Liliana Pardo-López. (2017). Analysis of bacterial metagenomes from the Southwestern Gulf of Mexico for pathogens detection, Pathogens and Disease, Volume 75, Issue 5, ftx058, https://doi.org/10.1093/femspd/ftx058.

102. Sato, S.; Iwata, F.; Yamada, S.; Kawahara, H.; Katayama, M. Usabamycins A-C: New anthramycin-type analogues from a marine-derived *actinomycete*. Bioorganic Med. Chem. Lett. 2011, *21*, 7099–7101.

103. Zhang, W.; Liu, Z.; Li, S.; Yang, T.; Zhang, Q.; Ma, L.; Tian, X.; Zhang, H.; Huang, C.; Zhang, S.; et al. (2012). *Spiroindimicins* A-D: New bisindole alkaloids from a deep-sea-derived *actinomycete*. Org. Lett. 14, 3364–3367.

104. Thistle, D. The deep-sea floor: An overview. In Ecosystems of the Deep Oceans; Tyler, A., Ed.; Elsevier Science: Amsterdam, The Netherlands, 2003; Volume 28, pp. 6–8.

105. Godoy-Lozano. E. E.; Escobar-Zepeda A.; Raggi L.; Merino E.; Gutiérrez-Ríos R. M.; Juarez K.; Segovia L.; Licea-Navarro A. F., Gracia A.; Sánchez-Flores A. y Pardo-López L. (2018). Bacterial Diversity and the Geochemical Landscape in the Southwestern Gulf of Mexico. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. doi: 10.3389/fmicb.2018.02528. PMID: 30405581; PMCID: PMC6200919.

106. Guzman-Vega, M. A., and Mello, M. R. (1999). Origin of oil in the sureste basin, Mexico. AAPG Bull. 83, 1068–1094. doi: 10.1306/e4fd2e79-1732-11d7-8645000102c1865d

107. MacDonald, I. R., Garcia-Pineda, O., Beet, A., Daneshgar Asl, S., Feng, L., Graettinger, G., et al. (2015). Natural and unnatural oil slicks in the Gulf of Mexico. J. Geophys. Res. C Oceans120, 8364–8380. doi: 10.1002/2015JC011062

108. Daneshgar Asl, S., Asl, S. D., Amos, J., Woods, P., Garcia-Pineda, O., and MacDonald, I. R. (2016). Chronic, anthropogenic hydrocarbon discharges in the Gulf of Mexico. Deep Sea Res. Part 2 Top. Stud. Oceanogr. 129, 187–195. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.11.228

109. Diario Oficial de la Federación: Estrategia Nacional Contra la Resistencia a los antimicrobianos http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5525043&fecha=05/06/2018.

110. Olarte J, Galindo E. *Salmonella typhi* resistant to chloramphenicol, ampicillin, and other antimicrobial agents: Strains isolated during an extensive typhoid fever epidemic in Mexico. Antimicrob Agents Chemother. 1973; 4:597-601. http://dx.doi.org/10.1128/AAC.4.6.597.

111. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful patho-gen. Clin Microbiol Rev. 2008; 21(3):538-82.

112. Torres HA, Vázquez EG, Yagüe G, Gómez JG. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: clinical update and new highlights. Rev Esp Quimioter. 2010; 23(1):12-9.

113. Visca P, Seifert H, Towner KJ. *Acinetobacter* infection--an emerging threat to human health. IUBMB Life. 2011; 63: 1048-54.

114. Antunes LC, Visca P, Towner KJ. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. Pathog Dis. 2014; 71: 292-301.

115. Catalano M, Quelle LS, Jeric PE, Di Marti-no A, Maimone SM. Survival of *Acinetobacter baumannii* on bed rails during an outbreak and during sporadic cases. J Hosp Infect. 1999; 42(1):27-35.

116. Henig O, Weber G, Hoshen MB, et al. Risk factors for and impact of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* colonization and infection: matched case-control study. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015; 34: 2063-8.

117. Joly-Guillou ML. Clinical impact and patho-genicity of *Acinetobacter*. Clin Microbiol Infect. 2005; 11(11):868-73.

118. Sebeny PJ, Riddle MS, Petersen K. *Acinetobacter baumannii* skin and soft-tissue infection associated with war trauma. Clin Infect Dis. 2008; 47(4):444-9.

119. Barbut F, Yezli S, Mimoun M, Pham J, Chaouat M, Otter JA. Reducing the spread of *Acinetobacter baumannii* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on a burns unit through the intervention of an infection control bund-le. Burns. 2013 May; 39(3):395-403.

120. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54: 24-38.

121. Walther-Rasmussen J, Hoiby N. *OXA*-type carbapenemases. J Antimicrob Chemother. 2006; 57: 373-83.

122. Pagano M, Martins AF, Barth AL. Mobile genetic elements related to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Braz J Microbiol. 2016; 47: 785-92.

123. Wright MS, Mountain S, Beeri K, Adams MD. Assessment of insertion sequence mobilization as an adaptive response to oxidative stress in *Acinetobacter baumannii* using IS-seq. J Bacteriol. 2017; 199(9). pii: e00833-16.

124. Múrena, J., & Roncancio-Villamil, G., & Jiménez-Qinceno, J. (2014). *Acinetobacter baumannii*: Vanegas importancia clínica, mecanismos de resistencia y diagnóstico. CES Medicina, 28 (2), 233-246.

125. Jajere S. M. (2019). A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. Veterinary world, 12(4), 504–521. https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.504-521.

126. Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R., & Swaminathan, B. (2000). *Salmonella* nomenclature. Journal of clinical microbiology, 38(7), 2465–2467. https://doi.org/10.1128/JCM.38.7.2465-2467.2000.

127. Universidad Nacional Autónoma de México. Departamento de Microbiología y parasitología. Recursos en Bacteriología. Salmonelosis (2015). http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/salmonelosis.html.

128. Santos JI, De la Maza L, Tanaka J. Antimicrobial susceptibility of selected bacterial enteropathogens in Latin America and worldwide. Scand J Gastroenterol Suppl. 1989; 169:28-33.

129. Organización Mundial de la Salud: *Salmonella* no tifoidea (2018). https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal).

130. Majowicz, S., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F., Kirk, M. y O'Brien, S. et al. (2010). La carga global de gastroenteritis por *Salmonella* no tifoidea. Enfermedades Infecciosas Clínicas, 50 (6), 882-889. doi: 10.1086 / 650733.

131. Gonçalves, T. y Vasconcelos, U. (2021). Color Me Blue: La historia y el potencial biotecnológico de la piocianina. Moléculas (Basilea, Suiza), 26 (4), 927. https://doi.org/10.3390/molecules26040927.

132. Gellatly, S. y Hancock, R. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: nuevos conocimientos sobre la patogénesis y las defensas del huésped. Patógenos y enfermedades, 67 (3), 159-173. doi: 10.1111 / 2049-632x.12033.

133. Jebbar, M.; Franzetti, B.; Girard, E.; Oger, P. Microbial diversity and adaptation to high hydrostatic pressure in deep-sea hydrothermal vents prokaryotes. Extremophiles 2015, 19, 721–740.

134. Paz-Zarza, Victor Manuel, Mangwani-Mordani, Simran, Martínez-Maldonado, Alejandra, Álvarez-Hernández, Diego, Solano-Gálvez, Sandra Georgina, & Vázquez-López, Rosalino. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: Pathogenicity and antimicrobial resistance in urinary tract infection. Revista chilena de infectología, 36(2), 180-189.

135. Denning, G. M., S. S. Iyer, K. J. Reszka, Y. O'Malley, G. T. Rasmussen, B. E. Britigan. 2003. Phenazine-1-carboxylic acid, a secondary metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*, alters expression of immunomodulatory proteins by human airway epithelial cells. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 28: 4L584.

136. Ruffin, M. y Brochiero, E. (2019). Deterioro del proceso de reparación por *Pseudomonas aeruginosa* en tejidos epiteliales: características principales y posibles vías terapéuticas. Fronteras en microbiología celular e infección, 9, 182. https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00182.

137. Lau, G. W., Hassett, D. J., Ran, H., & Kong, F. (2004). The role of pyocyanin *in Pseudomonas aeruginosa* infection. Trends in Molecular Medicine, 10(12), 599–606. doi:10.1016/j.molmed.2004.10.002.

138. Sorensen, R.U. and Klinger, J.D. (1987) Biological effects of *Pseudomonas aeruginosa* phenazine pigments. Antibiot. Chemother. 39, 113–124.

139. Kamath JM, Britigan BE, Cox CD, Shasby DM. Pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa* inhibits prostacyclin release from endothelial cells. *Infect Immun*. 1995; 63(12):4921-4923.

140. Denning GM, Railsback MA, Rasmussen GT, Cox CD, Britigan BE. *Pseudomonas* pyocyanine alters calcium signaling in human airway epithelial cells. Am J Physiol. 1998;274(6):L893-L900. doi:10.1152/ajplung.1998.274.6.L893

141. Britigan BE, Railsback MA, Cox CD. The *Pseudomonas aeruginosa* secretory product pyocyanin inactivates alpha1 protease inhibitor: implications for the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Infect Immun*. 1999;67(3):1207-1212.

142. Lucy Allen, David H. Dockrell, Theresa Pattery, Daniel G. Lee, Pierre Cornelis, Paul G. Hellewell, Moira K. B. Whyte (2005). Pyocyanin Production by *Pseudomonas aeruginosa* Induces Neutrophil Apoptosis and Impairs Neutrophil-Mediated Host Defenses In Vivo.

143. Pyocyanin Production by *Pseudomonas aeruginosa* Induces Neutrophil Apoptosis and Impairs Neutrophil-Mediated Host Defenses In Vivo. 2005. Inglés. Lucy Allen, David H. Dockrell, Theresa Pattery, Daniel G. Lee, Pierre Cornelis, Paul G. Hellewell, Moira K. B. Whyte.

144. Lau GW, Hassett DJ, Ran H., Kong F. El papel de la piocianina en la infección por *Pseudomonas aeruginosa* .Trends Mol. Medicina. 2004; 10: 599-606. doi: 10.1016 / j.molmed.2004.10.002.

145. Das, T., Kutty, S., Tavallaie, R. *et al.* Phenazine virulence factor binding to extracellular DNA is important for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Sci Rep* 5, 8398 (2015). https://doi.org/10.1038/srep08398.

146. Das, T., Sharma, P. K., Busscher, H. J., van der Mei, H. C. & Krom, (2010). B. P. Role of extracellular DNA in initial bacterial adhesion and surface aggregation. Appl. Environ. Microbiol. 76, 3405–3408.

147. Swartjes, J. J. T. M. et al. A functional DNase I coating to prevent adhesion of bacteria and the formation of biofilm. Adv. Funct. Mat. 22, 2843–2849 (2012).

148. Das, T., Krom, B. P., van der Mei, H. C., Busscher, H. J. & Sharma, P. K. DNA-mediated bacterial aggregation is dictated by acid-base interactions. Soft Matters 7, 2927–2935 (2011).

149. Pricewhelan, A., Dietrich, L. E. P. & Newman, D. K. Rethinking secondary metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. Nat. Chem. Biol. 2, 71–78 (2006).

150. BAUER, A.W. (1959) 'Single-disk antibiotic-sensitivity testing of Staphylococci', A.M.A. Archives of Internal Medicine, 104(2), p. 208. doi:10.1001/archinte.1959.00270080034004.

151. El-Fouly, M.Z. et al. (2015) 'Biosynthesis of pyocyanin pigment by pseudomonas aeruginosa', Journal of Radiation Research and Applied Sciences, 8(1), pp. 36–48. doi:10.1016/j.jrras.2014.10.007.

152. Spellberg, B., Powers, J., Brass, E., Miller, L. y Edwards, J. (2004). Tendencias en el desarrollo de fármacos antimicrobianos: implicaciones para el futuro. Enfermedades infecciosas clínicas , 38 (9), 1279-1286. doi: 10.1086 / 420937.

153. Soberón, G. (2022). Libros. Microbios, cap. 3 Consultado el 9 de enero de 2022 en http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap3/

154. Sismaet H.J., Webster T.A., Goluch E.D. Up-regulating pyocyanin production by amino acid addition for early electrochemical identification of *Pseudomonas aeruginosa*. *Analyst.* 2014; 139:4241–4246. doi: 10.1039/C4AN00756E.

155. Blankenfeldt, W., & Parsons, J. F. (2014). The structural biology of phenazine biosynthesis. Current opinion in structural biology, 29, 26–33. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.08.013

156. Strateva, T., Mitov, I. Contribución de un arsenal de factores de virulencia a la patogenia de las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*. Ann Microbiol 61, 717–732 (2011). https://doi.org/10.1007/s13213-011-0273-y

157. Hall, S., McDermott, C., Anoopkumar-Dukie, S., McFarland, A. J., Forbes, A., Perkins, A. V., Davey, A. K., Chess-Williams, R., Kiefel, M. J., Arora, D., & Grant, G. D. (2016). Cellular Effects of Pyocyanin, a Secreted Virulence Factor of *Pseudomonas aeruginosa*. Toxins, 8(8), 236. https://doi.org/10.3390/toxins8080236

158. Baron SS, Rowe JJ. Antibiotic action of pyocyanin. Antimicrob Agents Chemother. (1981) Dec; 20(6):814-20. doi: 10.1128/AAC.20.6.814. PMID: 6798928; PMCID: PMC181804

159. El-Shouny, W. A., Al-Baidani, A. R. H., & Hamza, W. T. (2011). Antimicrobial activity of pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from surgical wound-infections. Int. J. Pharm. Med. Sci, 1(1), 1-7.

160. Raji El Feghali, P. A., & Nawas, T. (2018). Pyocyanin: A powerful inhibitor of bacterial growth and biofilm formation. Madridge J Case Rep Stud, 2(2), 101-107.

161. Hall, S., McDermott, C., Anoopkumar-Dukie, S., McFarland, A. J., Forbes, A., Perkins, A. V., Davey, A. K., Chess-Williams, R., Kiefel, M. J., Arora, D., & Grant, G. D. (2016). Cellular

Effects of Pyocyanin, a Secreted Virulence Factor of *Pseudomonas aeruginosa*. Toxins, 8(8), 236. https://doi.org/10.3390/toxins8080236

162. Rada, B., & Leto, T. (2013). Pyocyanin effects on respiratory epithelium: relevance in Pseudomonas aeruginosa airway infections. *Trends In Microbiology*, *21*(2), 73-81. doi: 10.1016/j.tim.2012.10.004.

163. Mavrodi DV, Bonsall RF, Delaney SM, Soule MJ, Phillips G, Thomashow LS. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. J Bacteriol. (2001) Nov; 183(21):6454-65. doi: 10.1128/JB.183.21.6454-6465.2001. PMID: 11591691; PMCID: PMC100142.

164. Hassan HM, Fridovich I. Mechanism of the antibiotic action pyocyanine. J Bacteriol. (1980) Jan; 141(1):156-63. doi: 10.1128/jb.141.1.156-163.1980. PMID: 6243619; PMCID: PMC293551.

165. Hall S, McDermott C, Anoopkumar-Dukie S, McFarland AJ, Forbes A, Perkins AV, Davey AK, Chess-Williams R, Kiefel MJ, Arora D, Grant GD. Cellular Effects of Pyocyanin, a Secreted Virulence Factor of *Pseudomonas aeruginosa*. Toxins (Basel). (2016). Aug 9;8 (8):236. doi: 10.3390/toxins8080236. PMID: 27517959; PMCID: PMC4999852.

166. Muller M. Premature cellular senescence induced by pyocyanin, a redox-active *Pseudomonas aeruginosa* toxin. Free Radic Biol Med. (2006). Dec 1;41 (11):1670-7. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.09.004. Epub 2006 Sep 8. PMID: 17145555.

Cuernavaca, Morelos a 2 de mayo de 2023

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **FERNANDO ANTONIO LÉVARO DOMÍNGUEZ,** con el título del trabajo: **ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTI-BACTERIANA DE BACTERIAS AISLADAS DEL GOLFO DE MÉXICO.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación por Tesis como lo marca el artículo 6° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

A T E N T A M E N T E
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR	**FIRMA**
PRESIDENTE: DR. ALEJANDRO GARCÍA FLORES	
SECRETARIO: M. EN B. LUIS ENRIQUE CRUZ TRUJILLO	
VOCAL: DR. VÍCTOR HUMBERTO BUSTAMANTE SANTILLÁN	
SUPLENTE: DRA. VERÓNICA OBREGÓN BARBOSA	
SUPLENTE: DR. ALEXIS JOAVANY RODRÍGUEZ SOLÍS	

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ALEXIS JOAVANY RODRIGUEZ SOLIS | Fecha:2023-05-03 06:20:22 | Firmante

nkgpH1RN3MbZOBrD/lCwZZrWjJR9pZQYnVYbVYLlQd+7H6Rmq4bPgWu3GTt1qermVw/B14jzIsoJyojQXMgOAjmmCq9K/ttrdUVSDzCbnUKXIH/lZ4wifPuJz34nJ05vucFApSbZf2fs535ZJ2wGSIHe+I9CgHHeNhlIjgB84cIo/RgxQo/AQlnfTvGA+fHAwY/vD2DTCmLQJbWubwGw+7Zgai6GAaEn1ehz0tEZOt+bec5FrHsWAlDRNiQlwkM/0xsD/x/fX7DfvsXgl5/w3O/vFsuzHLv590sZBXlRxdm6roRS5BhzZr1sJQ++SZpghH0U8rxR7LLS6S9nEvpKfg==

LUIS ENRIQUE CRUZ TRUJILLO | Fecha:2023-05-03 09:12:57 | Firmante

Iz/8KdWLgA8RM3lUo1OuGUWoo6MUFE8ytXFpOXoZJVv/8C0v/lNQAohOu8uIWVGu4d1shpOSfCipns63gQVpySU9FZPtCXYUsJzYdZtaFUC7n6tdbAvEPraZQDK4VE3GOQchAN05ulz+QmF66VXbJyFOzPRyOjegHNnQhYhU4O3l6JvyuxUC0iCLx56q15LUP5M1pngqErhnOP6yj5dAhqpbHW3nHxJ9hucHFp5ts0FYsy8Jx/h9QU9FpTcst7E9VO99LOfQ+9vXeSg6SpS2h2vF3kj97CdUGEB4pagqX8kyH5Z8fblSmSyyQ8Jhd9f7k7aZiesofefzp7NOJ3VJZA==

ALEJANDRO GARCIA FLORES | Fecha:2023-05-03 11:56:10 | Firmante

iHy7lisHOctkq4VzPnlqnqtWMAqyKQQ27pmP0hlw05E4heXD4J4j5/1WXWi0MMqffhNqQPdDj6S4gtyk2385sTxOYWX+V22GD/pgl8eo9qsWlTOw/pHY5jAOUAcPVytTM3lHzwGk4KzFc6GhM0dzWvcNCiwJ+ZtyzSmPywnKqbiIQxsCk/QlM1okLXzLTmmoo9nwfN25PKOTB1rKzo0EV2FhA4mD2sgpQBEjfCnwBdi6xXwJf+7Gmbib2ZZ/bC4tOy1olHZHrVgyF1WxOO/eXig1Jibls/zyOFyuBrGCADxH0gIzZ+KPJpEY0vWmgNrGk2Egwj0yanv3XgKhkXDfUA==

VICTOR HUMBERTO BUSTAMANTE SANTILLAN | Fecha:2023-05-03 12:51:56 | Firmante

h4a38QBGKfTqy7CF594UT1UTyp5/OMAGpnfJ4up7qmnH7qivZVBONPtRXBo7l5jIGx4Ex1Jsx3vq7e8tffslDqVb5lH2cPeRi6m9GwFszG+8eMdWqIM6m4KwB3KuYerNRbKT/gKSHIH7u9YDe4KMmYaDNZWSn5Dy0EJ+Yrh/Vy/RArv3YKM1bACxUg7fK0WZiOVlOA+8fBn3dSeqZq4ATxYQiZpkzWXbcWBsu0/SCo23NyEqPNvgxdoeoHYsjxwblTmJm9yfHOrf4sDpytUcNT0lccOOdHFSMWAoO8i3AoN+1dwp8EjX9JZSN8X5fg4ukpXrT/hKzC60RQYJrE0gbg==

VERONICA OBREGON BARBOZA | Fecha:2023-05-12 10:12:44 | Firmante

fIbFaNazx1dqfLo9V6f+FPWEAUz2x5wIR4bd8v3Mh1czp695l6k+TXEq7P0yLlnSBoZqljLZob4nCKKxeNHnhhoptOHH8aSsRtfSHpA5ZXRcsOgkh70G+Il2u8QMxjDOct9L5Fr2rVvA3xDPNdZnDlOt7bVATntODpnBX7lWocKSnfc76RuaBYvpbazyUv1vQ3kCb9CsPDYyiIStbk05VEHiPWQFsBt0dX6cGCmF7aFli6CdvGLcxu4et5z/AFg3qpW4VwE0ocL+mzGJgootKxb/vmhZ3Iy1Fu3wxiJ1NJWQEC60BQWGQhLQlQ6a2KPp2VFzgLxtL+9HFD+lmFRBhQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

XA3L2deWg

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/SJDKAcyYD58nSH4yvj6jjGUPkymQ7Rbn