

Universidad Autónoma de Baja California.

Facultad de ingeniería Mexicali.

Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería (MYDCI)



**Biosurfactantes de microorganismos extremófilos inhibidores del crecimiento de cepas de  
*Escherichia coli* multidrogo-resistentes**

**Ricardo Delgadillo Valles**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS.

Director de Tesis

Co-Director

Dra. Aseneth Herrera Martínez

Dr. Fernando Amílcar Solís Domínguez

# ÍNDICE

<b>Lista de figuras</b>	<b>5</b>
<b>Lista de tablas</b>	<b>6</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>7</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>8</b>
<b>Resumen</b>	<b>9</b>
<b>1 Introducción</b>	<b>10</b>
<b>2 Marco teórico</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Morfología y estructura bacteriana</b>	<b>13</b>
<b>2.2 Distinción macroscópica y microscópica de bacterias</b>	<b>13</b>
<b>2.3 Estructura de la pared bacteriana</b>	<b>15</b>
<b>2.4 Antibiograma</b>	<b>17</b>
<b>2.4.1 Pruebas de susceptibilidad</b>	<b>18</b>
<b>2.4.2 Difusión</b>	<b>18</b>
<b>2.4.3 Dilución</b>	<b>19</b>
<b>2.5 Resistencia microbiana</b>	<b>19</b>
<b>2.5.1 Inactivación enzimática</b>	<b>20</b>
<b>2.5.2 Impermeabilidad de membranas bacterianas</b>	<b>20</b>
<b>2.5.3 Modificación de sitio blanco</b>	<b>20</b>
<b>2.5.4 Bombas de eflujo</b>	<b>21</b>
<b>2.5.5 Alteración de rutas metabólicas</b>	<b>21</b>
<b>2.6 Microorganismos extremófilos</b>	<b>21</b>
<b>2.6.1 Adaptación de los extremófilos a nivel molecular</b>	<b>22</b>

2.6.2 Microorganismos extremófilos y su aplicación industrial.	22
2.6.3 Surfactantes derivados de extremófilos y su aplicación industrial y medica	23
3 Planteamiento del problema	26
4 Justificación	29
5 Objetivos general y específicos	30
5.1 Objetivo general	30
5.2 Objetivo específico	30
6 Hipótesis	31
7 Metodología general: Plan de trabajo	32
8 Materiales y métodos	32
8.1 métodos de identificación en bacterias extremófilas	33
8.1.1 Recolección de muestras de suelo en ambiente árido y cultivo	33
8.1.2 Aislamiento de microorganismos de muestras de suelo	33
8.1.3 Conductividad eléctrica y pH de las muestras de suelo	33
8.1.4 Reactivación y resiembra de bacterias extremófilas	34
8.1.5 Proceso de identificación de aislados microbianos	34
8.1.6 Morfología bacteriana	34
8.1.7 Identificación por método de fenotipificación	34
8.1.8 Caracterización de los aislados microbianos por espectrometría de masas con disrupción laser ionizante asistida por matriz (MALDI TOF)	35
8.1.9 Producción y extracción de biosurfactantes	35
8.1.10 Aislados bacterianos seleccionados para la producción de biosurfactantes.	35
8.1.11 Aislamiento y concentración de biosurfactantes	36

8.1.12 Concentración de biosurfactantes	36
8.1.13 Determinación del índice de emulsificación en 24 horas IE <sub>24</sub>	37
8.2 Métodos de identificación bacteriana y antibiograma de <i>Escherichia coli</i>	37
8.2.1 Recolección de muestras e identificación	37
8.2.2 Fenotipificación de resistencias con antibiograma de microdilución	37
8.3 Pruebas para determinar actividad biocida sobre <i>E.coli</i> multidrogo resistente (MDR)	38
8.3.1 Microplacas adicionadas con bacterias y biosurfactantes	38
8.3.2 Método de difusión modificado de Kirby-Bauer	38
8.4 Pruebas para determinar actividad biocida sobre <i>S.aureus</i> resistente a penicilina	39
9 Resultados	40
10 Discusiones y conclusiones	56
11 Referencias	61

## Lista de figuras

<b>Figura 1: Estructura bacteriana: Gram positivas y Gram negativas.</b>	14
<b>Figura 2: Estructura pared bacteriana Gram positivas.</b>	15
<b>Figura 3: Estructura pared bacteriana Gram negativas.</b>	16
<b>Figura 4: Plan de trabajo maestría.</b>	32
<b>Figura 5: Tinciones de Gram de aislados microbianos extremófilos.</b>	42
<b>Figura 6: Grafica de espectrometría de masas en <i>Bacillus cereus</i>.</b>	43
<b>Figura 7: Grafica de espectrometría de masas en <i>Bacillus subtilis</i>.</b>	44
<b>Figura 8: Imagen de incubadora con agitación.</b>	46
<b>Figura 9: Grafica de principales agentes etiológicos causantes de IVU.</b>	49
<b>Figura 10: Antibióticos de primera y segunda línea con porcentajes de susceptibilidad y resistencia.</b>	50
<b>Figura 11: Medios de cultivo con sensidiscos</b>	42
<b>Figura 12: IC<sub>50</sub> de Imipenem en los aislados MDR</b>	53
<b>Figura 13: IC<sub>50</sub> de Colistina en los aislados de <i>E.coli</i> MDR</b>	54
<b>Figura 14: Resultados del Aislado S2</b>	55
<b>Figura 15: Resultados del Aislado 2</b>	56
<b>Figura 16: Resultados del Aislado 3</b>	56
<b>Figura 17: Resultados del Aislado 9</b>	57

### Lista de tablas.

<b>Tabla 1: Aislados microbianos y las zonas de aislamiento</b>	39
<b>Tabla 2: Microorganismos con metabolismo halófilo</b>	39
<b>Tabla 3: Relación entre la morfología predominante y los aislados microbianos</b>	40
<b>Tabla 4: Identificación de cepas vía carbohidratos y MALDI TOF</b>	44
<b>Tabla 5: Tiempo de desarrollo de los aislados microbianos.</b>	45
<b>Tabla 6: índice de emulsificación en 24 horas en medio CST</b>	46
<b>Tabla 7: Comparación de IE<sub>24</sub> en medios CST y MSM + glucosa al 2% (%).</b>	47
<b>Tabla 8: Comparación de ambos medios de cultivo que permiten el desarrollo y producción de surfactantes.</b>	48
<b>Tabla 9: Perfil de resistencias de los aislados microbianos a experimentar</b>	50

## **Abreviaturas**

OMS Organización mundial de la salud

MDR Multi drogoresistente

XDR Extenso drogoresistente

PDR Pan drogoresistente

BGN Bacilos Gram negativos

GN Gram negativo

CDC Centro de control de enfermedades

ECDC Centro de control de enfermedades Europa

EUCAST Comité europeo en pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

CLSI Instituto de estándares clínicos y de laboratorios

GLASS: Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (Sistema mundial de vigilancia de la resistencia y el uso de los antimicrobianos)

LPS Lipopolisacárido

## **Agradecimientos:**

*A mi directora de tesis Dra. Aseneth Herrera Martínez y a mi codirector de tesis Dr. Fernando Amílcar Solís Domínguez por compartir todos sus conocimientos en un área tan amplia como lo es la microbiología, enlazando la microbiología clínica y ambiental, a mis docentes de la Facultad de Ingeniería Mexicali del programa MyDCI, que sin ellos no habría sido posible este logro.*

*A la UABC, en especial al Programa de Bioingeniería y al CONACYT por el apoyo brindado, en el uso de equipo, material, reactivos y la oportunidad de realizar y repetir cada uno de los experimentos aquí mostrados. Parte de este proyecto fue financiado con recursos de la 22ª convocatoria interna de apoyo a proyectos de Investigación de la UABC mediante el proyecto con clave 105/6/C/41/22.*

*A los laboratorios Dorado por permitirme utilizar parte del equipo y material para el manejo de muestras clínicas a cargo del Dr. Rafael Martínez y Laboratorio San Marcos, por permitirme laborar y obtener las muestras necesarias a cargo del Dr. Andrés Manríquez.*

*Al “3 veces” heroico Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina Mexicali de la UABC, a cada uno de los pasantes y ayudantes que hicieron más ameno el trabajo, Sindy, Angela, Mario, Bátiz y Andrés Montes por todo el apoyo brindado.*

*A mis padres Silvia y Ricardo, que son el motor de mi vida y a mis abuelos Isabel y Jesús, que espero y se encuentren orgullosos de mí.*

*A mis “hermanos” Dr. José Valle, Ing. Luis Mondaca y al M.C. Alexander Zermeño, por el apoyo mutuo durante los tiempos difíciles*

*Por último, pero no por eso menos importante, a mi maestro, mentor, “sensei” y amigo, la persona que ha servido como fuente de inspiración desde la licenciatura y quien me introdujo a este mundo sorprendente de la microbiología, al Dr. Donato Antonio Rechy Iruretagoyena.*

*Chester, Gordita y Spunky ...*

## Resumen

En 2011, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró “Combate la resistencia bacteriana: si no actuamos hoy, no habrá cura mañana” ya que se han cuadruplicado los casos de resistencia bacteriana. Hasta el 2016, las enfermedades infecciosas fueron la tercera causa de muerte a nivel mundial, con cerca de 6.5 millones de muertes, las cuales aproximadamente 1 millón se asoció a microorganismos multidrogo resistente (MDR). Se han lanzado campañas para investigar moléculas con capacidades biocidas sobre los microorganismos MDR, en especial *Escherichia coli* MDR. Estas moléculas se han detectado biosurfactantes derivados de microorganismos extremófilos.

El objetivo principal de esta investigación es la búsqueda de nuevas moléculas con la capacidad biocida sobre *E. coli*, así como también identificar los perfiles de resistencia que se encuentran en la comunidad y obtener los biosurfactantes de nuestras cepas de bacterias extremófilas, al menos detectar un aislado productor de biosurfactantes biocidas.

Para la producción de los biosurfactantes, se trabajaron microorganismos extremófilos en medios caldo específicos en condiciones controladas, una vez obtenido el caldo sin células bacterianas, se procede a la separación y concentración de biosurfactantes, para probarse sobre las bacterias obtenidas en pacientes desde mayo 2020-2021. Se detectaron 50 aislados bacterianos que cumplen la característica de MDR con perfiles de resistencia variables, sin detectar inhibición en cepas de *E. coli* MDR, pero si en *Staphylococcus aureus*. Pese a que el objetivo principal de nuestro estudio era buscar sustancias biocidas contra *E. coli* MDR, detectamos que los biosurfactantes actúan mejor sobre cepas de *S. aureus*

## Introducción

Desde el siglo pasado, el descubrimiento de agentes quimioterapéuticos que revertían las infecciones mejoró y extendió la calidad de vida del ser humano, siendo indispensables en el día a día de la práctica médica, haciéndonos recordar que la principal causa de consulta a nivel mundial y a nivel nacional son las enfermedades infecciosas, posicionándose en los primeros lugares y en orden descendente las infecciones respiratorias, gastrointestinales y de las vías urinarias. (Soto-Estrada et al., 2016) , utilizados como profilácticos en procedimientos invasivos y cirugías contaminadas, erradicando a la microbiota patógena hasta en un 100%; existen de diversas clases, dependiendo de su actividad, como bactericidas o bacteriostáticos, naturales y sintéticos, cuyos efectos antimicrobianos se logran en relación al peso del paciente, a la dosis mínima para inhibición del desarrollo bacteriano, tolerancia entre otros factores importantes que juegan un papel necesario antes de su selección y aplicación (Roca, 2004). Sin embargo, por mucho tiempo fueron utilizados de manera indiscriminada, generando un efecto colateral grave: Bacterias resistentes a los antibióticos. Desde el 2004, la Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la resistencia como la respuesta en contra de estos fármacos, posicionando a las bacterias como las principales generadoras de mecanismos bien descritos que reducen la efectividad o inactivación de fármacos (Veterinarians, 2012).

Existen dos grupos de bacterias resistentes a fármacos; las bacterias multidrogo-resistentes (MDR), que resisten 3 o más grupos de antibacterianos y las extensivamente drogo resistentes (XDR) que son bacterias susceptibles a 1 o 2 grupos de antibióticos. Recientemente se han descrito bacterias pandrogo resistentes (PDR), las cuales presentan resistencia a las 27 familias de antibióticos existentes (Magiorakos et al., 2012). En el 2011 la OMS declaró “Combate la resistencia bacteriana: si no actuamos hoy, no habrá cura mañana”(Sharma, 2011) ya que se han cuadruplicado los casos de resistencia bacteriana.

Hasta el 2016, la OMS posicionó a las enfermedades infecciosas como la tercera causa de muerte a nivel mundial, con cerca de 6.5 millones de muertes (World Health Organization, 2014), de las cuales aproximadamente 1 millón se asocia a microorganismos MDR; el programa de vigilancia global de resistencia antimicrobiana (GLASS en inglés) recolectó datos de 45 países, donde las bacterias mayormente aisladas en orden de frecuencia fueron *Escherichia coli*, *Klebsiella*

*pneumoniae*, *Salmonella sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Shigella sp.*(WHO, 2017).

Actualmente solo en estados unidos, las infecciones representaron al menos en 2 millones de personas, como una de las causas principales de consulta, de las cuales 90.000 fueron muertes confirmadas por enfermedades infecciosas, donde el 70% eran resistentes al menos a 1 fármaco, el costo de las enfermedades infecciosas es mayor a los 1000 millones de dólares, que suele incrementar hasta 5 billones de dólares al año, por el uso de medicamentos cada vez más caros y por la estancia prolongada en los hospitales de gobierno y aquellos cubiertos por las sociedades y aseguradoras americanas (Infectious Diseases Society of America IDSA, 2004), cifra que se calcula aumentará en el año 2050 hasta los 100 mil millones de dólares, más del producto geográfico bruto que tenemos en la actualidad, debido a que el tiempo de recuperación y secuelas aumentarán por este tipo de infecciones.

Actualmente, la búsqueda de antibacterianos nuevos se ha visto limitada, tanto por el prolongado proceso de identificación y aprobación, que pueden durar hasta 10 años, el poco interés en la búsqueda de quimioterapéuticos y antibacterianos y a su vez el re-descubrimiento de sustancias previamente ya descritas, y que aún no se conoce como efectúan su acción biocida en patógenos de interés médico, posicionando a las bacterias superiores (actinobacterias) como una mina de oro para este tipo de investigaciones, ya que solo se ha estudiado el 1% de las bacterias en suelo y el resto aun sin explorar(Wohlleben et al., 2016), al mismo tiempo, el bajo incentivo que las compañías farmacéuticas consideran que la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos, no son atractivas desde el punto de vista económico(Nordberg et al., 2013)(So et al., 2011). La propuesta para poder frenar esta situación emergente se desvía en dos posibilidades: Educar al médico que solo en ciertas circunstancias que lo ameriten y, apoyado por información laboratorial se deben de utilizar los antibióticos y solo tomarlos en el tiempo recomendado por los profesionales de la salud (que esto ha sido un fracaso para los países en vías de desarrollo y del tercer mundo) o se fomenta el desarrollo de nuevos antibióticos (García, 2018). Pese a lo anterior, se ha iniciado una carrera en donde se buscan metabolitos con efectos bactericidas en microorganismos del medio ambiente. En años recientes, en la era del re descubrimiento se ha enfocado mucho en las profundidades del mar, donde se han aislado microorganismos

productores de los nuevos grupos de químicos llamados Abyssomicinas, que se encargan de la inhibición de folatos por la vía del ácido corismico (Sadaka et al., 2018; Tortorella et al., 2018).

Con lo anterior Sadaka et al., 2018 y Wohlleben et al., 2016 mencionan la importancia y el interés de las bacterias superiores en la producción de nuevos fármacos. Los actinomicetales han existido mucho tiempo en las zonas donde las bacterias comunes no se pueden desarrollar, conocidos como microorganismos extremófilos.

Estas zonas se consideran con concentraciones elevadas de sales minerales, pueden ser muy ácidos o alcalinos, pueden tener niveles elevados de radiación y presión, entre otros factores. Algunos de estos sitios generan ambientes especiales para el desarrollo de microorganismos como son los desiertos, profundidades oceánicas e inclusive las zonas del Antártico (Danilovich y cols., 2018; Tortorella y cols., 2018; Trenochnikova, 2018).

Dentro de los actinomicetales tenemos bacterias como *Streptomyces spp*, como uno de los microorganismos productores de aminoglucósidos y muchos de los antibióticos que utilizamos actualmente, y algunos de ellos como los *Bacillus s.p.* como *Bacillus subtilis* y *Bacillus polymyxa* que son productores de fungicidas y de las polimixinas (Reyes et al., 2015). Este último grupo de antibióticos es uno de los más importantes en el tratamiento de las infecciones causadas por microorganismos como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* entre otras bacterias del tipo bacilo Gram negativo (BGN) que sean XDR en conjunto de los Beta lactámicos (Lenhard et al., 2016). El efecto de las polimixinas, generan un efecto surfactante en la membrana externa de los BGN, y esto por medio de la unión de cargas positivas y negativas, desplazando iones bivalentes produciendo un efecto desestabilizante, envolviendo al lipopolisacárido (LPS), causando disrupción de la membrana y expulsando el contenido periplasmático y citoplasmático llevando eventualmente a la muerte (Grégoire et al., 2017; Kempf et al., 2016; Lopes e Inniss, 1969).

## **Marco teórico.**

### **Morfología y estructura bacteriana.**

Las bacterias son de los organismos más primitivos que existen en la actualidad, aparte de ser los seres más pequeños que pueden ser observados con la ayuda de un microscopio y con tinciones especiales para poder diferenciar cada una de las estructuras propias. Algunas de las bacterias más pequeñas pertenecientes al género *Chlamydia s.p.* y *Rickettsia s.p.* solo pueden llegar a 0.1-0.2 micrómetros de diámetro, las cuales requieren de métodos aún más avanzados para su observación como microscopía electrónica. Algunas diferencias entre las células eucariotas (células animal y vegetal) con las células procariotas (bacterias) abarca desde el tamaño, organelos y composición (las células eucariotas etimológicamente su nombre deriva del griego “núcleo verdadero”) y poseen pared celular (van Teeseling et al., 2017).

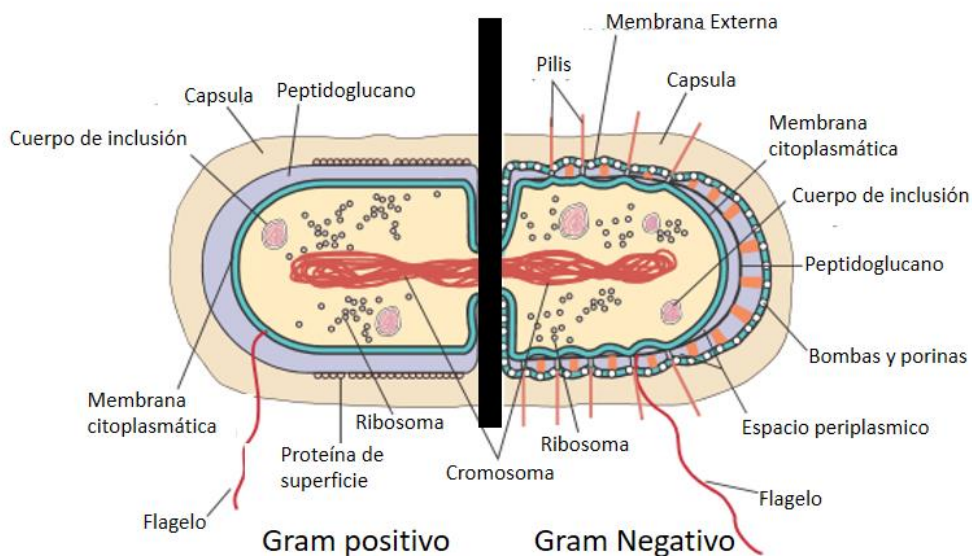
### **Distinción macroscópica y microscópica de las bacterias.**

El desarrollo bacteriano en medios de cultivo especializados o en el ambiente se puede apreciar macroscópicamente al formar colonias, recordando que las bacterias no pueden formar otras estructuras especializadas como tejidos u órganos. Las colonias adoptan diferentes formas según sea el estado nutricional en el que estas bacterias se encuentran, algunas de las características se pueden distinguir en el color, tamaño, forma, apariencia e inclusive aroma. El determinar si las bacterias pueden degradar eritrocitos, resistir al desarrollo de bacterias o adoptar diferentes formas dependerán directamente del tipo de nutrientes y del tipo de medio de cultivo que se esté utilizando. La apariencia microscópica se incluye el tamaño de la bacteria, la configuración (bacilos, cocos y espirales) la agrupación y su habilidad al retener los colorantes de la tinción de Gram (Gram positivos o Gram negativos) que es una de las primeras pruebas para la detección e identificación bacteriana, dado por la estructura química de la pared celular (Moyes et al., 2009). Las bacterias que posean una estructura esférica se les denominan “cocos”, el ejemplo más representativo es la bacteria del género *Staphylococcus s.p.* y, a las bacterias en forma de bastón se les denominan bacilos, de los cuales el ejemplo más representativo en la ciencia es *Escherichia coli*. Algunas otras bacterias que pertenecen al grupo de los cocos o de los bacilos poseen diferentes formas, algunas de ellas se asemejan mucho a los granos de café (*Neisseria s.p.*) o células en forma de triángulos isósceles (*Streptococcus s.p.*), y de los últimos tenemos

bacterias que tienden a estar ramificados como *Nocardia s.p.* o bacilos curvos como en el caso de *Vibrio cholerae* por mencionar un ejemplo. Para poder observar las bacterias en el microscopio es necesario que sean teñidas con los colorantes de la Tinción de Gram (Smith y Hussey, 2005).

La tinción de Gram es un método rápido y efectivo que ayuda a distinguir los dos diferentes tipos de bacterias, ayuda con el diagnóstico debido a que es una tinción diferencial e inclusive puede ayudar en el tratamiento empírico en contra de dichos microorganismos. Las bacterias cuya estructura de pared es alta en proteínas se les denominarán **Gram Positivo**, siempre y cuando sean capaces de fijar el cristal violeta y el iodo lugol, y aquellas bacterias cuya pared bacteriana sea más delgada y posea mayor cantidad de lípidos no podrán fijar bien los colorantes, por lo que será necesario agregar un colorante de contraste llamado safranina, y se denominarán como **Gram negativo**. Hay algunas bacterias que pese a su estructura celular poseen ceras y lípidos que impiden la unión de los colorantes, como lo es en el caso de las micobacterias o bacterias que no poseen pared celular como en el caso de *Mycoplasma s.p.* (Bradbury et al., 1993)

A continuación, podemos apreciar un esquema en el que podemos diferenciar a grandes rasgos las diferencias entre Gram positivos y Gram negativos.

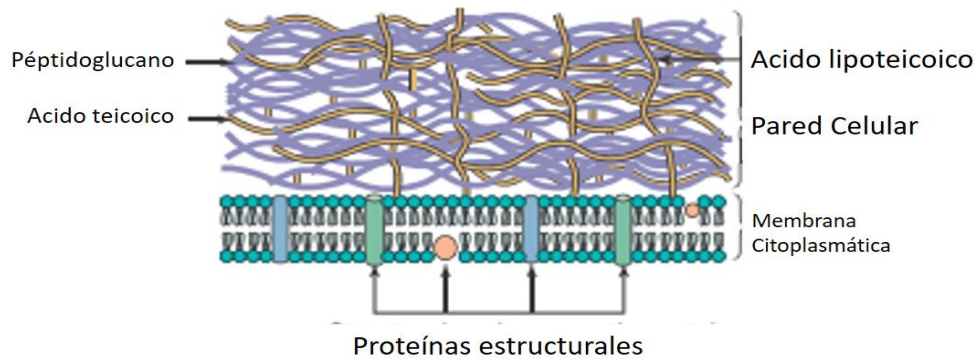


*Figura 1: Estructura bacteriana: Gram positivas y Gram negativas. Modificado de Jawetz Microbiología Clínica edición #25. McGrawHill*

### **Estructura de la pared bacteriana.**

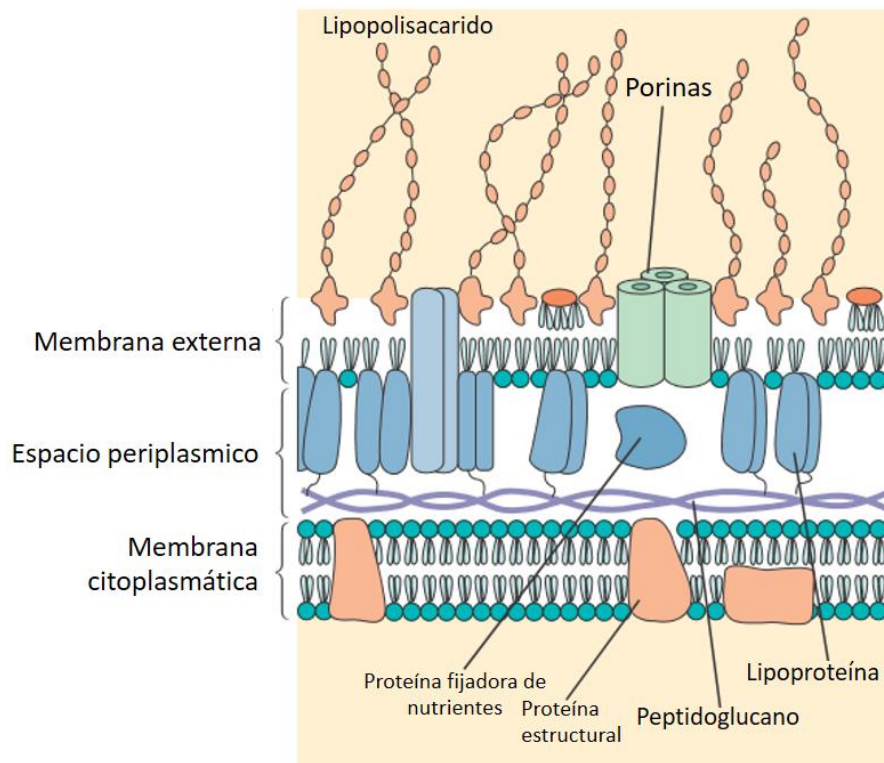
Como se mencionó anteriormente, la estructura celular bacteriana posee diferencias muy puntuales con respecto a la afinidad tintorial en la preparación de Gram, altamente relacionado con la estructura de pared.

La pared de los Gram positivos es gruesa y con múltiples capas de peptidoglucano (enlaces de 4 péptidos unidos a dos carbohidratos dispuestos en una configuración 3D que se unen por medio de puentes estructurales cada una de las capas) y que rodea por completo a la membrana citoplasmática. Las capas de peptidoglucano confieren un grosor de pared de aproximadamente de 150 a 500 Armstrong de grosor, esencial para la replicación y supervivencia en el medio hostil en el que se desarrollan las bacterias. Sin la pared bacteriana, tanto en Gram positivos como en los Gram negativos, las bacterias sucumben a una gran diferencia de presión osmótica, ya que el interior de las células bacterianas es mucho más denso que en el medio extracelular, por lo que gran cantidad de agua cruzaría de manera pasiva pero rápida a través de la membrana y causaría la lisis de la célula (Young, 2007). Otras de las estructuras de las bacterias Gram positivas que se encuentran en la pared celular son los ácidos lipoteicoico y teicoico, que funcionan como antígenos débiles a la respuesta inmunológica y a su vez, funcionan de estabilidad en la pared celular (Rohde, 2019). El ácido lipoteicoico juega un papel muy importante en respuesta inmunológica, actuando de manera muy similar al lipopolisacarido y a su endotoxina de los Gram negativos, objeto de investigación que se describirá a continuación. En el siguiente esquema podemos observar cómo se encuentra configurada la estructura de los Gram positivos.



*Figura 2: Estructura de pared de las bacterias Gram positivas. Modificado de Jawetz Microbiología Clínica edición #25. McGrawHill*

La pared celular de los Gram negativos es por mucho más compleja que en la de los Gram positivos. A diferencia de estos, los Gram negativos poseen una doble bicapa lipídica, la primera que rodea al citoplasma y la segunda que rodea la pared celular, compuesta por fosfolípidos y de lipopolisacáridos en su cara al medio extracelular. Entre los espacios de la membrana externa y de la membrana citoplasmática se encuentra la pared celular de peptidoglucano con una cantidad muy escasa de capas de péptido glucano, se encuentran espacios vacíos conocidos como espacio periplásmico, en el que se encuentran nutrientes y iones importantes para el metabolismo bacteriano, exotoxinas y entre otras sustancias. Uno de los componentes más importantes en la membrana externa es el lipopolisacárido que muchas veces es llamado endotoxina, ya que es un potente estimulador de la respuesta inmunológica, este se libera en el medio extracelular y en el hospedero. Cuando el LPS activa la respuesta inmunológica, múltiples mediadores que inducen al hospedero a generar fiebre y en casos más severos, choque y coagulación intravascular diseminada, con un alto índice de mortalidad del hospedero (Beveridge, 1999).



*Figura 3: Estructura de pared de las bacterias Gram negativas. Modificado de Jawetz Microbiología Clínica edición #25. McGrawHill*

## Antibiograma

El objetivo del antibiograma es evaluar en el laboratorio la respuesta del microorganismo a uno o más antimicrobianos y traducir, en una primera aproximación, su resultado en un factor predictivo de eficacia clínica (Baez, 2015.). Las primeras pruebas de susceptibilidad se realizaron en la década de 1920 del siglo pasado, relacionadas con el descubrimiento de los antimicrobianos. Tal como se conocen hoy en día, basados en cálculos de difusión o de concentración mínima inhibitoria, no se generalizaron hasta mucho antes de la década de 1960 (Aminov, 2010). Posteriormente, se identificaron las múltiples variables que influían en los resultados y se empezaron a establecer los estándares durante las décadas de los 70 y 80, esto con ayuda de diversas instituciones internacionales, las condiciones en las que debían realizarse los antibiogramas para asegurar su reproducibilidad (Larrosa et al., 2020). Asimismo, durante estos años se debaten los criterios que deben regir la interpretación de los resultados. Éstos hacen esencialmente referencia al análisis de las poblaciones microbianas en función de los valores de

la CMI de los antimicrobianos, su relación con los mecanismos de resistencia, la farmacocinética del antimicrobiano, en particular en el compartimento sérico, y la correlación entre el valor de la CMI y el posible éxito o fracaso terapéutico (Abushaheen et al., 2020).

Con estos objetivos se crean diferentes comités nacionales y otros con vocación internacional cuya misión principal es establecer los denominados puntos de corte con que se diferencian las categorías clínicas de tratamiento (sensible, intermedio y resistente)(Köck et al., 2021) Se denomina cepa sensible cuando un aislado bacteriano es inhibido in vitro por una concentración de un antimicrobiano que se asocia a una alta probabilidad con el éxito terapéutico, intermedio cuando un aislado bacteriano es inhibido in vitro por una concentración de un antimicrobiano que se asocia a un efecto terapéutico incierto y resistente cuando un aislado bacteriano es inhibido in vitro por una concentración de un antimicrobiano que se asocia a una alta probabilidad con el fracaso terapéutico (Read & Woods, 2014).

A pesar de utilizar los distintos comités criterios y datos de sensibilidad muy similares, los puntos de corte definidos eran muy dispares y se constata la necesidad de llegar a consensos que unifiquen estos valores(Larrosa et al., 2020). Aunque se han realizado progresos importantes, particularmente en Europa, estas diferencias persisten hasta nuestros días.

Los puntos de corte, bien en valores de halos de inhibición o de CMI, se utilizan para separar estas categorías. Tanto el CLSI como el grupo EUCAST establecen en los Estados Unidos y en Europa, respectivamente, estos puntos de corte y ambos comités tienen vocación internacional. En el primer caso se publican anualmente, mientras que en el segundo están permanentemente disponibles en su página web (Rodan, 2010).

### **Pruebas disponibles para sensibilidad antimicrobianos**

En la actualidad existen dos formas diferentes para poder realizar el antibiograma, los métodos de difusión y de dilución.

#### **Difusión**

El antibiograma disco-placa basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores (Bauer y cols., 1966) es uno de los métodos que el CLSI recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. La prueba consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de Petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. La concentración de antibiótico en la interfase entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida por métodos de dilución. Sin embargo, los métodos disco-placa no permiten una lectura directa del valor de la CMI (Esser y Elefson, 1970).

## **Dilución**

La cuantificación de la actividad in vitro de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante alguna de las variantes de los métodos de dilución. Estos métodos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar). Las primeras determinaciones se realizaron empleando baterías de tubos con caldo de cultivo con un rango determinado de antimicrobiano (macrodilución). Esta metodología es muy costosa, por la cantidad de material y de manipulaciones necesarias para su realización. La aparición de un sistema de inoculación múltiple para placas de agar popularizó el método de dilución en agar, en el que cada placa, con una cierta concentración de antimicrobiano, permite inocular simultáneamente un gran número de microorganismos, sin embargo, el uso de múltiples cajas de Petri en un solo antibiótico y en algunos casos con la necesidad de revisar hasta 20 antibióticos diferentes, este método se dejó solo en casos de investigación. La utilización de micropipetas y de placas de microtitulación facilitó la utilización del método de microdilución con caldo; en la actualidad se han popularizado los métodos automatizados comerciales de microdilución en caldo, fácilmente integrables en sistemas semiautomáticos de lectura e interpretación de

resultados. Estos últimos métodos a diferencia de los de difusión manejan valores más exactos (Maurer et al., 2017).

### **Resistencia microbiana**

La resistencia hacia los antimicrobianos es definida como la habilidad que poseen los microorganismos para sobrevivir y mantenerse aun viables bajo la influencia de agentes microbianos. Los jabones, antibióticos, conservadores de alimentos, soluciones de limpieza y desinfectantes que reducen considerablemente la capacidad de desarrollo, inhibir su multiplicación o incluso con efectos biocidas (Abushaheen et al., 2020).

Hay una serie de formas en que los microorganismos son resistentes a los agentes antimicrobianos. Estos incluyen: la bacteria produce enzimas que destruyen el agente antimicrobiano antes que este alcance su blanco o modifica el agente antimicrobiano de tal forma que ya no puede ser reconocido por su blanco; 2) la pared celular se vuelve impermeable al agente antimicrobiano; 3) el sitio de ataque es alterado por mutación de tal manera que ya no permite la unión del agente antimicrobiano; 4) la bacteria posee una bomba de eflujo que expulsa al agente antimicrobiano de la célula antes que este alcance su blanco; 5) rutas metabólicas específicas dentro de la bacteria son alteradas genéticamente para que el agente antimicrobiano no pueda provocar un efecto (Tenover, 2006).

### **Inactivación enzimática.**

Las beta-lactamasas son enzimas que hidrolizan los agentes antimicrobianos beta-lactámicos, dando como resultado que la célula sea resistente a la acción de los medicamentos beta-lactámicos. En las bacterias gram-negativas los medicamentos beta lactámicos entran en la célula a través de las porinas y encuentran a las beta-lactamasas en el espacio periplásmico. Las beta-lactamasas destruyen las moléculas beta-lactámicas antes de que éstas tengan la oportunidad de alcanzar sus PBPs blancos.

En las bacterias gram-positivas las beta-lactamasas son secretadas extracelularmente en el medio circundante y destruyen las moléculas beta-lactámicas antes que estas tengan oportunidad de entrar en la célula (Bush y Jacoby, 2010).

Las bacterias gram-negativas pueden producir enzimas adenilantes, fosforilantes o acetilantes que modifican un aminoglucósido para inactivarlo y la cloranfenicol acetiltransferasa. Las bacterias gram-negativas pueden producir un acetil transferasa que modifica al cloranfenicol para inactivarlo (Ramirez y Tolmasky, 2010).

### **Impermeabilidad membranas bacterianas.**

Las bacterias gram negativas pueden volverse resistentes a los antibióticos beta-lactámicos mediante el desarrollo de barreras de permeabilidad. Esto es usualmente provocado por porinas alteradas en la membrana externa que ya no permiten la entrada y el tránsito de las moléculas del antibiótico dentro de la célula. Cuando los beta-lactámicos no pueden alcanzar las PBPs, la célula es resistente (Delcour, 2009).

### **Modificación del sitio blanco.**

Las PBPs tanto en bacterias gram-positivas y gram-negativas pueden ser alteradas mediante mutación de manera que los beta-lactámicos no puedan unirse a ellas; por tanto, la célula es resistente a agentes antimicrobianos. En el caso de los ribosomas la metilación del ARN ribosómico confiere resistencia a los macrólidos y las ADN girasa y topoisomerasa con mutaciones en los genes cromosómicos de ADN girasa y topoisomerasa IV confieren resistencia a las quinolonas (Zapun et al., 2008).

### **Bombas de eflujo.**

Una amplia variedad de bombas de eflujo provee resistencia antimicrobiana tanto en bacterias gram-positivas como en gram-negativas. El eflujo activo de antibióticos es mediado por proteínas trans-membrana insertadas en la membrana citoplásmica y, en el caso de los organismos gram-negativos involucra también componentes en la membrana externa y periplasma. Estas proteínas forman canales que exportan activamente a un agente antimicrobiano fuera de la célula tan rápido como entra (Poole, 2005).

### **Alteración de Rutas Metabólicas.**

Algunos microorganismos desarrollan una ruta metabólica alterada que elude la reacción inhibida por el antimicrobiano. Mutaciones que inactivan la timidilato sintetasa bloquean la

conversión de deoxiuridilato a timidilato. Estos mutantes requieren timina o timidina exógena para la síntesis de ADN y por ende son resistentes a los antagonistas de la ruta del folato como las sulfonamidas y trimetoprima (Padayachee y Klugman, 1999).

### **Microorganismos extremófilos.**

Los microorganismos se encuentran ampliamente distribuidas en toda la superficie terrestre y las profundidades de los mares, inclusive en las zonas donde pensaríamos que no habría nada vivo en estas zonas. Las últimas décadas, los científicos se han intrigado con respecto a cierto grupo de microorganismos con una capacidad caprichosa de habitar ambientes extremos. Estos organismos conocidos como extremófilos, habitando los nichos más extremos que la gran mayoría de los organismos vivos no podrían sobrevivir, adaptándose a temperaturas muy altas y bajas, zonas de gran alcalinidad y acidez, en zonas donde las concentraciones de sal son altas, en condiciones de presiones atmosféricas altas y en presencia de metales pesados, solventes orgánicos y desperdicios altamente tóxicos. Su clasificación dependerá de las condiciones en las que se desarrollan: Alcalófilos y acidófilos (Tolerantes a medios alcalinos y ácidos respectivamente), termófilos y psicrófilos (temperatura alta y temperatura baja), barófilas (condiciones de presión atmosférica) y halófilos (organismos que requieren la presencia de sal para su desarrollo). Por último es importante mencionar que estos microorganismos se dividen en dos: Extremotolerantes que son aquellos que pueden desarrollarse en medios extremos y pueden tolerar dichas condiciones y los extremofílicos que son aquellos microorganismos que para su desarrollo requieren alguna de las condiciones previamente mencionadas para su desarrollo y que sin esto su desarrollo se puede ver comprometido (Rampelotto, 2013).

### **Adaptaciones de los extremófilos a niveles moleculares.**

Existen múltiples mecanismos que permiten a los extremófilos a sobrevivir en las condiciones más extremas. La producción de enzimas termoestables que pueden facilitar la estabilidad proteica, permaneciendo estables y sin malos plegamientos, lípidos y un ADN estables. Algunos ejemplos como los acidófilos poseen múltiples bombas de protones que permiten estabilizar su citoplasma a condiciones neutras o estables para el organismo para cumplir sus estados metabólicos y muchos de los halófilos acumulan una gran cantidad de solutos en su citoplasma para mantener la osmolaridad equilibrada. Algunas proteínas de las bacterias extremófilas son

estables a temperaturas altas, sobre todo aquellas que se encuentran en los geiseres o volcanes submarinos, impidiendo su desnaturalización y permaneciendo estables incluso a temperaturas mesófilas.

Las proteínas de estos organismos a nivel molecular poseen aminoácidos que, según su afinidad y estructura química permiten la estabilidad de la proteína en los medios más agresivos. Mencionando algunos ejemplos tenemos el caso de las proteínas de las bacterias halófilas, poseen más residuos ácidos en el exterior que permite proteger al núcleo proteico de la salinidad y ayudando a la interacción con el agua con escasos residuos hidrofóbicos y con la confianza de que las sales permitan el plegamiento de las proteínas y las proteínas de las bacterias psicrófilas que poseen mayores residuos de glicina, haciéndola más flexible y escasa interacción hidrofóbica. (Irwin, 2020).

### **Microorganismos extremófilos y su aplicación industrial.**

Dentro del repertorio de enzimas, proteínas y péptidos producidas por los microorganismos extremófilos hay algunas enzimas con las amilasas, celulasas, lipasas que son de origen bacteriano perteneciente a los grupos de las termófilas y psicrófilas, las cuales dependiendo de su aplicación, estas tendrán una función importante en las áreas industriales, ganaderas, agronómicas y en el área de la biorremediación (Gupta et al., 2014). La biorremediación ha sido uno de los temas más importantes y de la cual se ha estudiado los últimos años (Fan et al., 2020; Feng et al., 2018; Jiang et al., 2018; Lara-Severino et al., 2017) y se han estudiado diversos microorganismos que fomentan la producción de enzimas que degraden las sustancias o faciliten la absorción de componentes tóxicos o derivados sintéticos. Algunas de las sustancias importantes para la biorremediación son los surfactantes y ramnolipidos derivados de algunos microorganismos ambientales y extremófilos.

### **Surfactantes derivados de extremófilos y su aplicación industrial y médica.**

Los biosurfactantes son compuestos anfifílicos que se componen de un extremo hidrofílico y otro hidrofóbico en el que posee la capacidad de organizarse en fases diferentes, reduciendo la tensión superficial y en algunos casos formando agregados como las micelas. Los surfactantes microbianos son un diverso grupo de compuestos que consisten en dos dominios importantes: un dominio hidrófilico y un dominio hidrofóbico (particularmente lipofílico). Esta descripción nos

la define Liu y cols (Liu et al., 2019). La mayoría son péptidos o proteínas con una estructura  $\alpha$  hélice, las cuales favorecen a la separación de los aminoácidos hidrófilos e hidrofóbicos en dos caras diferentes. Pueden estar cargados positiva o negativamente (iónicos) o sin carga (no iónicos) creando interfaces y que en los recientes años ha incrementado su interés como substitutos de los surfactantes sintéticos, sobre todo en la aplicación ambiental (George Georgiou, Sung-Chyr Lin, 1992). Desde 1949 se describió el primer biosurfactante con efectos bactericidas y antitoxigenicos en contra de Gram negativos, el cual se le denominó polimixina E (posteriormente llamado colistina), este se aisló en la bacteria *Bacillus polymyxa*, de los cuales se detectaron 4 grupos diferentes de la A a la D, según su configuración y presencia de aminoácidos, la cual Colistina tiene una fuerte relación con la polimixina B. (Hoeprich, 1970)

Múltiples bacterias se han utilizado y estudiado para el desarrollo de estas sustancias tensoactivas y en algunos casos, han sido sujeto de experimentación e ingeniería genética para la producción de estas sustancias, empleándose principal en la solubilización y estabilización de los compuestos aceitosos en el agua. Las bacterias del género *Bacillus s.p.* han estado en la lista de bacterias productoras de surfactante debido a que se encuentran ampliamente distribuidas en el mundo y en diversos climas y hábitats, realizándose experimentos con fermentación simple de carbohidratos y el uso de agentes estresantes como hidrocarburos para la formación de surfactantes (Cooper y Goldenberg, 1987) e incluso se ha buscado la producción de nuevos materiales y polímeros derivados de estas bacterias (Abouelkheir et al., 2020). Actualmente en el área de biotecnología y remediación se ha buscado utilizar estas bacterias para la remediación de aguas y tierra contaminadas con petróleo. De las bacterias más importantes en esta área encontramos a *Bacillus subtilis*, una especie importante para la producción de surfactantes con capacidad de remediación y comprobándose una reducción 50% de contaminación de petróleo en 5 días (Viesser et al., 2020) y cepas de *Bacillus licheniformis* capaces de producir polisacáridos a partir de hidrocarburos de petróleo y sustancias de desecho agroindustrial (Fan et al., 2020).

Dentro de las especies que se han estudiado ampliamente para la producción de surfactantes esta *Bacillus subtilis*, que juega un rol muy importante en la modelación de los ecosistemas en tierras y la rizosfera en conjunto con otros grupos bacterianos (Rosenberg et al., 2016). Con este antecedente importante, la búsqueda de nuevos agentes biosurfactantes se realizaron en microorganismos del medio ambiente, y en microorganismos en tierra, descrito primera vez por

Arima y cols en 1968., Esta bacteria produce 3 surfactantes, de las cuales 2 son los más representativos: la micosubtilina y el más importante la surfactina, cuyo actividad surfactante es bastante eficaz, cuya experimentación se trató de elongar el tiempo de formación de los coágulos sanguíneos (Arima et al., 1968), posterior se describió su efecto anti fúngico contra fitopatógenos en el 2015, con preparados de otras bacterias que se conocen que generan biosurfactantes (Reyes Tena et al., 2015) y como estos activan el sistema inmunológico de plantas y la formación de biopelícula protectora en raises de plantas de interés económico (Sánchez Pila, 2016), se ha tratado de estudiar y experimentar para la producción facilitada con ingeniería genética o presión con polietilenos (Duitman et al., 2007). Esto no solo con fines de biorremediación, sino también para el control de plagas y otros patógenos como hongos y crustáceos parásitos (Yun et al., 2018)(Bartolini et al., 2019) y recientemente se ha detectado la producción de un lipopetido con capacidades antifungicas en cepas encontradas en las profundidades del mar denominado Iturina W (Zhou et al., 2020), en tiempos recientes entrando en el 2019 se detectado que surfactin logra inhibir la formación de biopelícula de *Staphylococcus aureus* en superficies de metal, poliestireno y vidrio, que suelen ser lugares frecuentes de colonización en procesos invasivos para los pacientes graves(Liu et al., 2019).

Otra bacteria que ha sido utilizada como blanco de experimentos para su producción de surfactantes ha sido *Bacillus cereus*, conocida por causar enfermedades en el ser humano por la producción de toxinas, se han descrito algunas cepas que pueden producir surfactantes de interés y biopelículas en zonas húmedas (Wijman et al., 2007) y que ha sido sometida a procesos donde se siembra la bacteria en medios poco nutritivos para la formación de esporas y surfactantes (Hsueh et al., 2007).

Otro de los *Bacillus s.p.* que se han estudiado en la producción de sustancias tensoactivas es *Bacillus amyloliquefaciens* productor de surfactina y bacillomicina D, ambos con actividad antifúngica contra hongos causantes de enfermedades en plantas (Qin Gu et al., 2017).

Como podemos observar, algunos ejemplos de aplicación de derivados bacterianos en la industria, ambiente y medicina. La aplicación de estas sustancias no solo se limita en el área de biotecnología e ingenierías, sino también en el área biomédica y medicina, desde la aplicación como promotores de la respuesta inmunológica, agentes quimioterapéuticos y producción de

antibióticos, pudiendo ser la respuesta a futuro de las problemáticas que se avecinan con la resistencia a los antibióticos (J. Chen et al., 2017).

### **Planteamiento del Problema**

En los últimos años, los fármacos más utilizados en la medicina clínica son los antibióticos, cuya función principal es la de favorecer la recuperación del paciente infectado hasta poderlo sanar. Sin embargo, en la actualidad uno de los principales problemas de salud se relaciona con la falla al tratamiento de infecciones bacterianas, esto aunado a la resistencia que estas generan a los antimicrobianos debido al uso indiscriminado de antibióticos, por lo tanto, es necesario encontrar nuevos fármacos que puedan eliminar a las bacterias multidrogo-resistentes.

Actualmente, se manejan varias definiciones para clasificar las resistencias a los antimicrobianos, entre ellas están las bacterias multidrogo resistentes, extensivo drogo resistente y pandrogo resistente, las bacterias multidrogo resistentes son aquellas a que por lo menos es resistente a 1 antibacteriano de al menos 3 o más familias de antibacterianos, extensivo drogo resistente aquellas a las que son sensibles a al menos 1 antibacterianos en dos familias o menos de antibacterianos y pandrogo resistentes las que son resistentes a las 27 familias de

antibacterianos (Magiorakos et al., 2012). El problema ha sido tan grande que inclusive en el día mundial de la salud de la OMS en 2011 el tema principal fue la resistencia bacteriana bajo el slogan de “no acciones ahora, no habrá cura mañana” (Sharma, 2011). Hasta el 2016, la OMS posicionó a las enfermedades infecciosas como la tercera causa de muerte a nivel mundial, con cerca de 6.5 millones de muertes (World Health Organization, 2014).

De las bacterias previamente mencionadas, trataremos sobre las enterobacterias, debido al alto riesgo y facilidad que poseen de generar epidemias a nivel mundial y de aumentar los niveles de resistencia (Spellberg et al., 2008), en los últimos años en Estados Unidos, la resistencia a varios grupos de antibióticos como quinolonas, anfenicoles, macrólidos, cefalosporinas y otros betalactámicos han incrementado la resistencia por encima del 50% (Control, 2015), los reportes recientes en Europa han mostrado mayores índices de resistencia, que incluso en la población ya se han detectado estas bacterias como parte de la microbiota en residentes de hospitales de Holanda (Dulm et al., 2019) en América del Sur y en países en vías de desarrollo, las infecciones por bacterias MDR son más altas a diferencia de países desarrollados. En Brasil entre 2014 y 2017 hubo un reporte de 10,210 casos de bacterias MDR, de los que 9,261 fueron colonizaciones y 949 causaron infección (Mouta et al., 2019) en dicho país, se detectaron las primeras cepas resistentes de *Klebsiella pneumoniae* resistente a colistina (Longo et al., 2019), en Sudáfrica las admisiones por infecciones por enterobacterias MDR incrementó del 0.34 en 1000 habitantes hasta 1.4 por cada 1000 pacientes en terapia intensiva, siendo el agente etiológico predominante *Klebsiella pneumoniae* con alto grado de resistencia a colistina (Ballot et al., 2019).

El especial interés sobre este antibacteriano se debe a que es de los pocos que pueden destruir casi a cualquier cepa de enterobacterias MDR o bien, bacterias Gram negativas en especial a los bacilos debido a su efecto detergente en la membrana externa que estas poseen (Bassetti et al., 2019) aunque en la actualidad se han determinado bacterias resistentes a estos antibióticos. El problema es tan grande que se han postulado nuevos adelantos en identificación bacteriana y fenotípica como el uso de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-TR) y el uso de antibiograma con el sistema MicroScan de microdilución (Lutgring et al., 2019) y experimentalmente la reducción de resazurina que detecta la inactivación de la colistina (Lescat et al., 2019).

El tratamiento y manejo de enfermedades infecciosas es difícil ya que en muchos casos las secuelas pueden ser permanentes, sin embargo, otro aspecto que se debe de revisar es desde el punto de vista económico. En un estudio realizado en Estados Unidos y Tailandia (Shrestha et al., 2018) se calculó el costo de tratamiento en enfermedades tratadas con antibióticos.

Se ha observado que al menos cinco géneros de bacterias que se aíslan frecuentemente en cultivos causan infecciones y que presentan altos números de resistencia, de los cuales, las más representativas son *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, generando costos en tratamiento de manera directa a los proveedores de antibióticos de 14.7 millones a 35.2 millones de dólares. El costo hospitalario y las pérdidas indirectas por pérdida de productividad y al exceso de muertes a las enfermedades infecciosas con microorganismos MDR fueron de 360 a 847.2 millones de dólares, sin contar el costo unitario por el propio tratamiento con antibióticos. La media del costo en el tratamiento de otras infecciones causadas por microorganismos MDR se considera en 16,078 dólares hablando de costos en promedio en una estancia de 14 días en hospital (McGlone et al., 2012).

Como hemos visto, a nivel mundial, la resistencia bacteriana a los antibióticos se ha incrementado de manera alarmante, y este mismo patrón se está presentando a nivel nacional, regional y local. Entre las bacterias que conforman una amenaza a la salud pública se destacan los bacilos Gram negativos, no sólo por sus múltiples mecanismos de resistencia a los distintos grupos de fármacos antimicrobianos utilizados en la práctica clínica, sino también por el nulo desarrollo de nuevos antibióticos.

A nivel nacional, los datos que se han recolectado no han arrojado aun una conclusión clara de los porcentajes en MDR, sin embargo, en un estudio publicado recientemente se extrajo información de 47 laboratorios, detectándose del total de 22,943 cepas, el 19% fueron *E. coli* MDR (Garza-González et al., 2019), como se mencionó previamente, los gastos en Estados Unidos por cada infección nosocomial llegaban a los 160,000 dólares, en México el costo promedio fue cercano a los 100,000 dólares por paciente infectado, dando un total global del tratamiento de pacientes de 9.3 millones de pesos, representando casi el 13% presupuestado solo para una unidad de seguro social (Navarrete-Navarro y Armengol-Sánchez, 1999) en la ciudad de Mexicali. Las principales enfermedades causadas por bacterias multidrogo-resistentes son de vías urinarias bajas (vejiga, próstata y aparato reproductor masculino) y altas (riñón y uréteres),

infecciones asociadas a catéteres intravenosos, septicemia intrahospitalaria y heridas quirúrgicas impetiginizadas (la mayoría generadas por *E. coli*); estas patologías llevan a un aumento considerable de la morbilidad y en el caso de la septicemia, a la mortalidad asociada a los microorganismos multidrogoresistentes, orillando a utilizar como último recurso la colistina, en contados casos ineficiente. Por lo que todo lo anterior lleva a una pregunta de investigación:

*¿Cuáles de los productos biosurfactantes de microorganismos extremófilos pudieran generar efectos biocidas en el crecimiento de cepas de E. coli multidrogo-resistentes?*

## **Justificación**

Debido al uso indiscriminado de antibióticos, actualmente se tiene el problema de resistencia a la mayoría de los antibióticos en bacterias, por lo tanto, es necesario encontrar nuevos fármacos que puedan eliminar a las bacterias multidrogo-resistentes. Actualmente, en los laboratorios de Bioingeniería en la Facultad de Ingeniería Mexicali de la UABC, se han estado estudiando derivados bacterianos como los biosurfactantes para la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados. Se sabe que bacterias del género *Bacillus* s.p. aislados de la región desértica del Municipio de Mexicali producen biosurfactantes al igual que algunos hongos aislados de cuevas y minas . Algunos de los biosurfactantes logran reducir la tensión superficial del medio en el que se producen entre 45 y 30 mN, lo cual es muy prometedor para el área biotecnológica.

Sin embargo, no se han hecho experimentos aun con estas sustancias desde el punto de vista antimicrobiano. Haciendo referencia a lo mencionado en la introducción de esta propuesta de investigación, la colistina es un biosurfactante bactericida, proveniente de *Bacillus polymixa* que reduce la tensión superficial de soluciones acuosas hasta 35 mN.

Ante la situación mundial hasta el 2050, donde ya no habrá punto sin retorno en el uso de antimicrobianos debido a la resistencia bacteriana, es de interés primordial y que a su vez a tenido un futuro incierto por los intereses en farmacéuticas en determinar y continuar estudiando si alguno de los biosurfactantes aislados tiene efecto biocida similar o diferente al de colistina, también es altamente prioritario el poder desarrollar nuevos antibióticos aunque los mecanismos difieran al del antibiótico previamente mencionado, como respuesta ante la grave amenaza que es la resistencia bacteriana, causante de múltiples secuelas y elevación de las tasas de mortalidad lo que reflejaría en un oscuro panorama para el estilo de vida moderno del ser humano.

La finalidad y objetivo principal de esta investigación, es determinar la capacidad biocida de los biosurfactantes producidas por bacterias extremófilas contra *E.coli MDR*, formalizar una línea de investigación para la búsqueda y desarrollo de estas moléculas y ofrecer una extensión antes de llegar a la era postantibiótica, que como se ha ido mencionando a lo largo de este escrito, cada vez nos acercamos más a un punto sin retorno y se sufrirá de severas consecuencias de salud y económicas.

## **Objetivo general**

Determinar la actividad biocida de biosurfactantes aislados a partir de microorganismos extremófilos en cepas de *Escherichia coli* multidrogo resistentes.

## **Objetivos específicos**

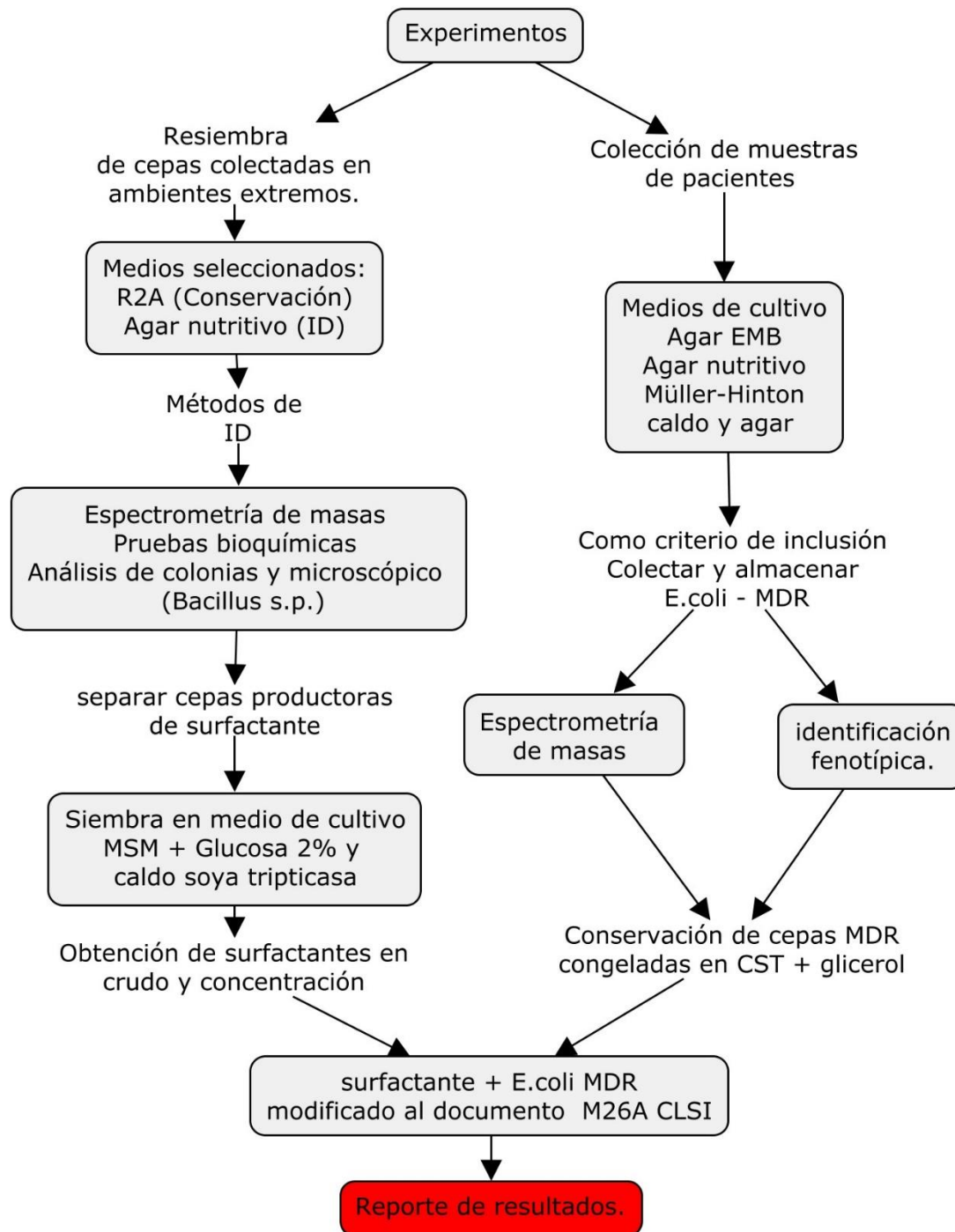
- Identificar fenotipo de antimicrobiograma cepas de *E.coli*.
- Obtener biosurfactantes microbianos extremófilos a partir de cultivos líquidos.
- Identificar bacterias multidrogo-resistentes a partir de muestras de pacientes infectados.
- Evaluar la capacidad biocida de los biosurfactantes sobre cepas patógenas de *E. coli*.

## **Hipótesis**

Nuestra principal hipótesis en esta investigación es al menos uno de los aislado microbianos extremófilos puede producir biosurfactantes que inhiban el crecimiento de al menos una cepa de *E. coli* multidrogo resistente.

**Materiales y métodos:**

**Plan de trabajo maestría:**



**Métodos de identificación de bacterias extremófilas:**

**Recolección de muestras de suelo en un ambiente árido y cultivo.**

Las muestras de suelo fueron recolectadas en los márgenes y cercanas a la zona central del área de “La laguna salada” de la ciudad de Mexicali Baja California en 6 zonas distintas. El método de recolección se efectuó en condiciones de esterilidad y en áreas de escaso a nulo tránsito, colectando un aproximado de 500 g para los análisis microbiológicos y 1000 g para los análisis físicos correspondientes de conductibilidad y pH del suelo.

### **Aislamiento de microorganismos de muestras de suelo.**

Las muestras recolectadas para análisis microbiológico se diluyeron en proporción 1:10 p/v como se describe a continuación: se pesó 10 gramos de suelo, en condiciones de esterilidad y se añadió a un frasco de boca ancha con 90 mL de agua destilada estéril, se agitó vigorosamente para su homogeneización y se transfirió 1 mL de la preparación a un tubo de ensaye con 9 mL de agua destilada estéril, repitiéndose este proceso hasta obtener una dilución de  $1 \times 10^{-7}$ . Posterior y de forma inmediata fueron inoculados 0.10 mL de las diluciones  $1 \times 10^{-5}$  a  $1 \times 10^{-7}$  en medio Reasoner's 2A (R2A), R2A con pH ajustado a 8.28 y R2A con pH ajustado y enriquecido con NaCl al 12%. Se prosiguió a realizar el extendió del inóculo sobre la superficie del agar con una varilla Drigalski (varilla de cristal) y se incubó durante 72 horas a 36.5°C. Las condiciones de preparación se adjuntan en los anexos.

### **Conductividad eléctrica y pH de las muestras de suelo.**

Para la medición de pH y conductividad eléctrica de las muestras de suelo, se vertió 50 mL de agua destilada en vasos de precipitado y 25 g de tierra a una razón de 2:1 y se agitó durante 30 minutos (CMAG HS 7, IKA Ident. No.: 0003581200), terminando esta agitación se procedió a realizar lecturas de pH en un equipo Hanna Instruments Hi 2210 PH Meter previamente calibrado y de conductividad eléctrica en un equipo Oakton Con 410 WD-35608-57.

### **Reactivación y resiembra de bacterias extremófilas.**

El resto de las bacterias con las que se trabajó para la extracción de surfactantes previamente fueron reactivadas de medios R2A almacenados del banco de microorganismos, conservados en glicerol y conservados por liofilización utilizados en estudios previos en el laboratorio de bioingeniería. Para la reactivación de cepas, aquellas que provenían de liofilizados en alginato se resuspendieron en microtubos estériles de 2mL con 1 mL de solución de bicarbonato de calcio al 4% en agitación constante por 30 minutos, pasado este tiempo se cultivaron en medios R2A según indicaciones del fabricante y adicionadas con 12% de NaCl. Las cepas que se encontraban en cultivos previos de R2A sencillo y adicionado con 12% de NaCl se recolectaron con asa calibrada 0.010 mL de colonias bacterianas respectivamente a una caja nueva de medio R2A sencillo y adicionado con NaCl. La conservación de dichos aislados microbianos se llevó a cabo en caldo soya tripticasa (CST) y en Agar nutritivo (AN) para estudios posteriores.

### **Proceso de identificación de aislados microbianos.**

#### **Morfología microbiana.**

Las bacterias fueron inoculadas en medio de cultivo agar nutritivo, obteniéndose crecimiento de las colonias bacterianas a las 24 horas. Se realizó tinción de Gram (AFB Stain BBL kit de Becton, Dickinson and company) para corroborar la morfología de estas bacterias para su posterior identificación fenotípica y por medio de espectrometría de masas con disrupción laser ionizante asistida por matriz – Tiempo de vuelo.

#### **Identificación por método de fenotipificación.**

Tras la selección identificación morfológica, se prosiguió a desarrollar en medios caldo rojo fenol e hidrólisis (Difco Phenol red broth base, Becton, Dickinson and company) con carbohidratos (Manitol, Glucosa, Lactosa, Maltosa, arabinosa y Almidón de grado bacteriológico de Difco, Becton, Dickinson and company) y cultivo a temperaturas de 50 y 60 grados centígrados. Los resultados fueron analizados según los manuales de microbiología clínica de la Sociedad Americana de Microbiología (ASM).

#### **Caracterización de los aislados microbianos por espectrometría de masas con disrupción laser ionizante asistida por matriz (MALDI TOF).**

Para la caracterización de los aislados microbianos. Se realizó el análisis de proteómica e impronta por medio de espectrometría de masas con dichos cultivos desarrollados a 24 horas en agar nutritivo. Se utilizó una colonia bacteriana, agregándose 0.001 mL de ácido fórmico al 70% dejándose secar a temperatura ambiente y se agregó 0.001 mL de matriz que acompaña al equipo de MALDI-TOF (MicroFLEX de Bruker UK) dejándose secar a temperatura ambiente y al final se colocó dentro de la cámara de vacío procediendo con la identificación bacteriana automatizada y obteniéndose las gráficas del espectro de proteínas, reconociendo por empalme en el programa de análisis MicroFLEX para su correcta identificación.

### **Producción y extracción de biosurfactantes.**

#### **Aislados bacterianos seleccionados para la producción de biosurfactantes.**

Se eligieron las bacterias que en estudios previos se demostró su capacidad de producción de biosurfactantes y se sembraron en medio de cultivo agar R2A y se incubaron por 24 horas, pasado este lapso, se prosiguió a sembrar en 50 mL del medio sales minerales (MSM) en matraces de vidrio de 125 mL previamente esterilizados, que consiste en dos soluciones compuestas por 1000 mL: 2.5 g de  $\text{NaNO}_3$ , 0.4 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.0 g de  $\text{NaCl}$ , 1.0 g de  $\text{KCl}$ , 0.05 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y 10 ml de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (pureza de 85.0%), ajustando el pH a 7.2 con  $\text{KOH}$  y 1 ml de una solución de elementos traza que contiene por 100 mL: 0.05 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.15 g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.15 g de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.03 g de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.015 g de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.015 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , y 0.010 g de  $\text{NaMo}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y como fuente única de carbono y energía glucosa al 2 % v/v.

A la par, fueron realizados cultivos con los aislados microbianos en matraces previamente esterilizados utilizando volumens de medio de cultivo CST de 50 mL, 250 mL y 500 mL.. Los medios en los matraces ya inoculados con los distintos aislados microbianos se incubaron a 36.5 °C con agitación oscilatoria de 100 rpm hasta la fase estacionaria de cada uno de los microorganismos (24, 48, 72 y 96 h).

### **Aislamiento y concentración de surfactantes.**

Una vez que cada cultivo bacteriano llegó a su respectiva fase estacionaria, el medio líquido se centrifugó a 2750 rpm por 30 minutos y posterior a esto se decanta el caldo obtenido en matraz o vaso de precipitado y se pasó al sistema de filtrado (VWR® Vacuum Filtration Systems, Standard Line) utilizando una membrana de tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore ME mebranes, Merck).

Al obtener el caldo de cultivo libre de células, se procedió a realizar la precipitación del biosurfactante con acetona (grado reactivo, JALMK) en relación 1:1, dejando refrigerar a 4°C por 24 horas y posteriormente se separó el biosurfactante con membrana de celulosa de tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$  (VWR® Vacuum Filtration Systems, Standard Line y Millipore ME mebranes) con bomba de presión negativa.

Una vez filtrado el líquido, se procedió a lavar la membrana con agua desionizada y recolectar el crudo filtrado de las membranas en un crisol o cápsula, posterior a esto se acidificó con HCl 1 N hasta tener pH de 2.0 que se pudo medir por medio del medidor de pH (Hanna Instruments Hi 2210 PH Meter).

Una vez acidificado, se procedió a realizar una extracción con acetato de etilo en relación 1:2 de las muestras acidificadas, recuperándose la fracción orgánica por medio de agitación de 10 minutos y eliminando la fracción líquida.

### **Concentración de biosurfactantes.**

Al obtenerse la fase orgánica del embudo de separación, se virtió el líquido a un matraz balón de fondo redondo para evaporar el acetato de etilo por medio de un evaporador rotatorio ajustado a una velocidad de 50 rpm y una temperatura de 87°C respectivamente, para la obtención del concentrado de surfactante hasta que el líquido en el fondo del matraz se haya reducido lo suficiente para extraerlo del interior y posteriormente, avolatilizar los residuos del solvente en un desecador conectado a una bomba de vacío.

Una vez obtenido el biosurfactante crudo y seco, éste se resuspendió con 0.3mL de agua desionizada y se almacenó en microtubos de 1.5 mL a 4°C para posteriores pruebas biocidas.

### **Determinación del índice de emulsificación (IE<sub>24</sub>) de los biosurfactantes.**

Se agregaron 3 mL de diesel y 2 mL de caldo libre de células en un tubo de ensaye de vidrio de 15 ml. Estas mezclas se agitaron en el Vortex durante 2 minutos y se dejaron reposar verticalmente a temperatura ambiente por 24 horas. Pasado este tiempo se prosiguió a medir la altura de la capa de emulsión generada para obtener el índice que se realiza por medio de la siguiente formula 1: (Cooper y Goldenberg 1987)

$$IE_{24} = \frac{\text{altura de la capa emulsificada}}{\text{altura total}} \times 100$$

Fórmula 1. Cálculo del índice de emulsificación.

### **Métodos de identificación bacteriana y antibiograma de *Escherichia coli*.**

#### **Recolección de muestras e identificación.**

Las muestras se recolectaron en condiciones limpias y estériles, principalmente de herida y orina de pacientes que acudían al laboratorio de microbiología y parasitología médica de la UABC y de muestras recolectadas en Laboratorio Dorado del área de microbiología clínica. Las muestras obtenidas fueron procesadas mediante técnica de centrifugación (Eppendorf 5702RH) y de estas se les recolectó el sedimento con pipetas Pasteur, inoculándose en cajas de Petri con los medios eosina azul de metileno y agar nutritivo por el método de estría con asa calibrada y se incubaron a 36°C por 24 horas. Al obtenerse desarrollo bacteriano, se prosiguió con la identificación con sistema MALDI-TOF previamente descrito y se separaron las bacterias de la especie *E. coli*, tomando esto como referencia para iniciar las pruebas de susceptibilidad antibiótica.

#### **Fenotipificación de resistencias con antibiograma de microdilución.**

El antibiograma se realizó con el equipo Vitek 2 compact (BioMerieux) utilizando los cartuchos para detección de resistencia a los antibióticos (AST cards *Enterobacteriaceae*) siguiendo las indicaciones del manual de trabajo. En un tubo de polipropileno tamaño 13 mm de diámetro X 100 de largo (Modelo G1002 marca Globe) se agregaron 3 mL de agua desionizada y se recolectaron colonias bacterianas con aplicadores de madera estériles, hasta obtener 0.5 Mc

Farland de turbidez. Este se colocó en la gradilla especial del equipo con la tarjeta de detección antibiótica y se pasó al área de vacío y carga del aparato, donde se incubó y realizó lecturas cada 15 minutos hasta obtener resultados.

Los valores de referencia fueron tomados del documento M100 del CLSI, tomando como criterio de inclusión para nuestras pruebas aquellas bacterias que presentaran un perfil de resistencia compatible con la definición de MDR y descartándose las cepas bacterianas que no presentaran este tipo de resistencia.

### **Pruebas para determinar actividad biocida sobre *E. coli* MDR.**

#### **Microplacas adicionadas con bacterias y biosurfactantes.**

En placas de 96 cubetas para cultivo celular de fondo plano transparentes (Corning Costar 96 well-plates cell culture cluster.) modificado del documento M26A del CLSI, en orden se llenaron los pozos con .100 mL de caldo soya tripticasa .180 mL del sobrenadante obtenido de los medios MSM con presencia de biosurfactantes y .020 mL de solución acuosa adicionada con bacterias *E. coli* MDR salvajes, se realizó lectura en espectrofotómetro para placas (iMark Reader Microplate Serial number 17268 BIO RAD) a longitud de onda de 590 nm a las 0 horas, dejando reposar por 24 horas y llevando al lector por segunda ocasión para determinar la turbidez de los pozos de la placa. (se modificó según a curvas de crecimiento a 0, 12 y 24 horas).

A la par se realizó un experimento con 0.010 mL de caldo Muller-Hinton y 0.010 del extracto concentrado de surfactantes, con diluciones de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 y 1:512, se realizaron lecturas de cada uno de los extractos a las 0, 12 y 24 horas. En ambas corridas se aplicó un experimento con extractos obtenidos de colistina e imipenem para comparar los efectos biocidas de antibióticos de última línea. Ambos experimentos se realizaron por triplicado.

#### **Método de difusión modificada al método de Kirby-Bauer.**

Para el método de difusión modificada de Kirby-Bauer, en medio agar nutritivo fueron sembradas las cepas MDR a trabajar y se incubaron a 36° C durante 24 horas en incubadora estacionaria. Tomando en cuenta la información de los documentos del CLSI, se realizó una modificación a la prueba original, se añadieron los caldos que contenían los biosurfactantes a los

discos en blanco para la prueba de difusión (Hardy Diagnostics Blank disks, 0.25 inch diameter paper disk for Antimicrobial Susceptibility Test Catalog Number Z7121) a volúmenes de 0.025 mL, 0.030 mL y 0.035 mL con cada uno de los discos.

A la par también se utilizaron discos en blanco con los biosurfactantes obtenidos por concentrado a un volumen de 0.035 mL.

Una vez que el disco absorbió el concentrado de biosurfactantes, las cajas de Petri con agar Müller-Hinton se inocularon con las cepas MDR, previamente añadidas a los 3 mL de solución salina al 0.9% estéril en tubos de fondo plano de 15 mm de diámetro X100 mm de ancho (marca Globe) a una turbidez de 0.5 MacFarland. Una vez realizada la siembra masiva en los medios Müller-Hinton, fueron añadidas en números de 6 los discos con caldo a cada una de las cajas y un disco con el extracto control negativo en el centro. Terminado este procedimiento, se procedió a la incubación en incubadora estacionaria a 36.5°C y se leyeron los resultados después de 20 horas. El experimento fue realizado por triplicado.

#### **Pruebas para determinar actividad biocida sobre *S. aureus* resistente a penicilinas.**

A la par de los experimentos principales y bajo las mismas condiciones con método de dilución y Kirby – Bauer modificado, fueron efectuados los experimentos en bacterias de la especie *S. aureus* obtenida en muestras de paciente. El experimento fue realizado por triplicado.

## Resultados:

### Reactivación de aislados microbianos y aislamiento de bacterias de muestras de suelo.

Los aislados bacterianos fueron recolectados en dos zonas diferentes en la Laguna Salada, Mexicali Baja California cumpliendo dos características: Zona central libre de plantas y de probable contaminación humana (colectadas en 12 puntos diferentes) con una conductividad eléctrica de 230  $\mu\text{S}/\text{cm}$  y pH de 8.3 en promedio y en suelo rizosférico a los márgenes de la laguna (Tabla 1), asignando una clave dentro del departamento para su diferenciación morfológica, esto tomado de ensayos previos realizados en laboratorio y caracterizaciones en estudios previos realizados dentro del laboratorio.

Tabla 1: Aislados microbianos y las zonas de aislamiento.	
Zona central (Suelo halomórfico).	Zona periférica (suelo rizosférico).
A, B, E, H, F, L, M, N, Q1, Q2, Q4, Q5, R3, R4, C, S1, S2, S3 y U1	I, II, III, IV, V, VI, VII, IX, X, XI, XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII, XX, XXII, XXIII, XXV, XXVI, XXVIII, XXX, XXXI y XXXIV

Para la decisión del uso de los medios enriquecidos con NaCl se realizaron las mediciones de conductividad eléctrica y pH de las muestras de suelo de los sitios de muestreo, los pH se mantuvieron muy similares entre las muestras de suelo (incluir el intervalo de pH de las muestras). De los 44 aislados microbianos con los que se trabajó en este estudio, 23 aislados tuvieron un buen crecimiento en los medios con NaCl, mientras que de los 21 aislados restantes se desarrollaron de manera adecuado en el medio R2A sin sal (Tabla 2).

Tabla 2. Microorganismos con metabolismo halófilo

Aislados bacterianos cultivados en R2A adicionado con NaCl al 12%	Aislados bacterianos cultivados en medio R2A
E, H, Q2, Q4, Q5, C, S3, I, II, III, IV, VII, IX, X, XIII, XV, XVI, XVII, XX, XXII, XXV, XXVI, XXXI y XXXIV	A, B, F, L, M, N, Q1, R3, R4, S1, S2, U1, V, VI, XI, XIV, XVIII, XXIII, XXVIII y XXX

*Tabla 2: Aislados microbianos desarrollados en medios para metabolismo halófilo y en desarrollo en ausencia de NaCl. El desarrollo de los microorganismos está relacionado según a la cantidad de sales que poseen las áreas en las que se desarrollaron*

**Morfología microscópica de los aislados bacterianos.**

Para la caracterización microscópica de los aislados bacterianos se utilizaron cultivos bacterianos de 24 horas de crecimiento a los que se les realizó la tinción de Gram. La morfología microscópica predominante perteneció a los bacilos Gram positivos (95.5%), con la característica morfológica de producción de espora dispuesta en el centro de los bacilos (54.54%) y de manera subterminal (40.9%), con la excepción de dos aislados microbianos que son L y XXIII (4.54%), las cuales corresponden a bacilos Gram negativos sin agrupación y cocos Gram positivos en poli agrupación. (tabla 3).

<b>Tabla 3: Relación entre la morfología microscópica predominante y los aislados microbianos.</b>
<b>Morfología bacteriana.</b>
Bacilos Gram positivos esporulados (espora central).
H, Q1, Q2, Q4, Q5, S1, S2, U1, I, II, III, VI, VII, IX, X, XIII, XV, XVIII, XX, XXII, XXV, XXVI, XXVIII, XXX y XXXIV
<b>Morfología bacteriana.</b>
Bacilos Gram positivos esporulados (espora sub terminal).
A, B, C, E, F, M, N, R3, R4, S3, IV, V, XI, XVI, XVII y XXXI
<b>Morfología bacteriana.</b>
Cocos Gram positivos en poli agrupación
XXIII
Bacilos Gram negativos sin agrupación.
L

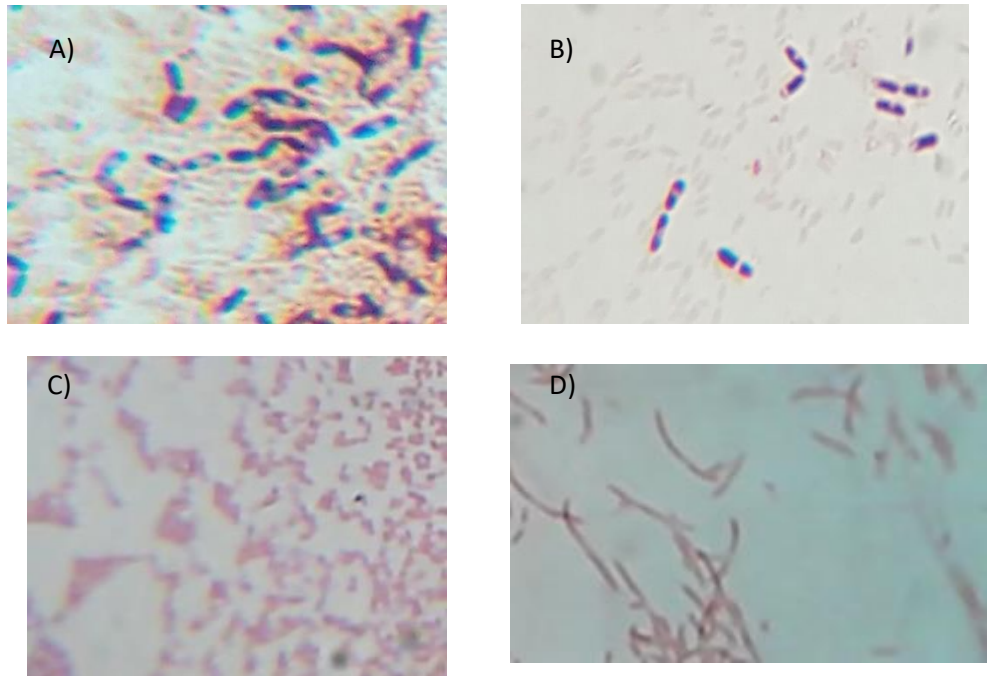


Figura 5: A) Morfología correspondiente a bacilos Gram positivos agrupados en cadena con espora central; B) bacilos Gram positivos agrupados en cadenas cortas y esporas libres y subterminales aun en el interior de los bacilos (zona incolora). Imagenes C) cocos Gram positivos en poliagrupación y D) Bacilos Gram negativo sin agrupar. Los preparados se observaron en microscopio de campo claro con aumento X100.

### Identificación de aislados microbianos extremófilos: Pruebas bioquímicas.

Por medio de dos técnicas se llevó a cabo la identificación del género y especie de los microorganismos, la primera técnica de identificación fenotípica por medio del metabolismo de carbohidratos y metabolitos con caldo rojo fenol y las pruebas bioquímicas como hidrólisis de almidón y crecimiento microbiano a los 50 y 60 °C. Después de 24 horas de crecimiento se procedió a la lectura e interpretación dispuesta en los manuales de microbiología de la ASM (Tabla4). La selección de los carbohidratos y de las pruebas bioquímicas se sustentaron con base en los resultados de la tinción de Gram. La segunda prueba consistió en el método de espectrometría de masas con disrupción laser ionizante asistida por matriz para confirmar la identificación por medio de la detección fenotípica, los aislados bacterianos se incubaron por 24 horas en medio agar nutritivo (AN). Los resultados mostraron que el 56% de los aislados corresponden al género *Bacillus subtilis*, mientras que el 36% corresponden al género y especie *Bacillus cereus*. El 8% restante correspondieron a géneros y especies separados de estos dos grupos.

Al tratar de realizar la identificación por medio de los medios de cultivo primarios por R2A sencillo y adicionado con NaCl, los resultados arrojados por el espectrómetro de masas no fueron concluyentes, por lo que es importante mencionar que para la replicación de este experimento es necesario que los aislados bacterianos se desarrollen en medios de cultivo como AN o en agar soya tripticaseína, debido a que el medio R2A es un medio para el desarrollo de microorganismos con escasa cantidad de nutrientes, por lo que supone un estrés para las bacterias y, que existe la probabilidad de que estos medios interfieran con la producción de proteínas.

### Identificación por espectrometría de masas con técnica MALDI-TOF

Como segundo experimento para corroborar nuestras identificaciones, se consideró la tecnología MALDI TOF para tener el espectro de proteínas. Todos los aislados bacterianos que lograron desarrollarse en medio de cultivo AN fueron sometidos a extracción de proteínas, teniendo en cuenta que este método es rápido comparado con los métodos previamente mencionados. No hubo variaciones o diferencias en la identificación de los microorganismos. En la tabla 4 se muestran cuáles fueron los resultados de cada uno de los aislados, sin omitir el hecho de que la identificación bacteriana con tecnología MALDI TOF identifica género y especie bacteriana, sin detectar las cepas a las cuales corresponden estas bacterias. En las siguientes figuras a continuación se muestran el patrón de las graficas obtenidas en el equipo y diferencias en la relación a la intensidad o presencia de las proteínas en el eje de Y, mientras que en el eje X se muestra la relación masa/carga para los aislados correspondientes a *B. subtilis* y *B. cereus*:

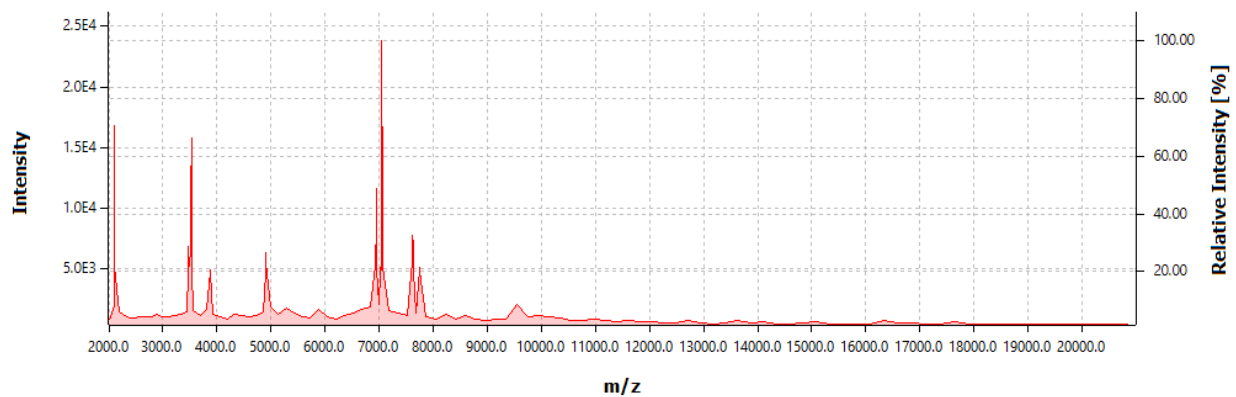


Figura 6: En la siguiente grafica se muestra el espectro mostrado por las cepas que corresponden al género y especie *Bacillus cereus*, del cual correspondió el 36% de los aislados microbianos.

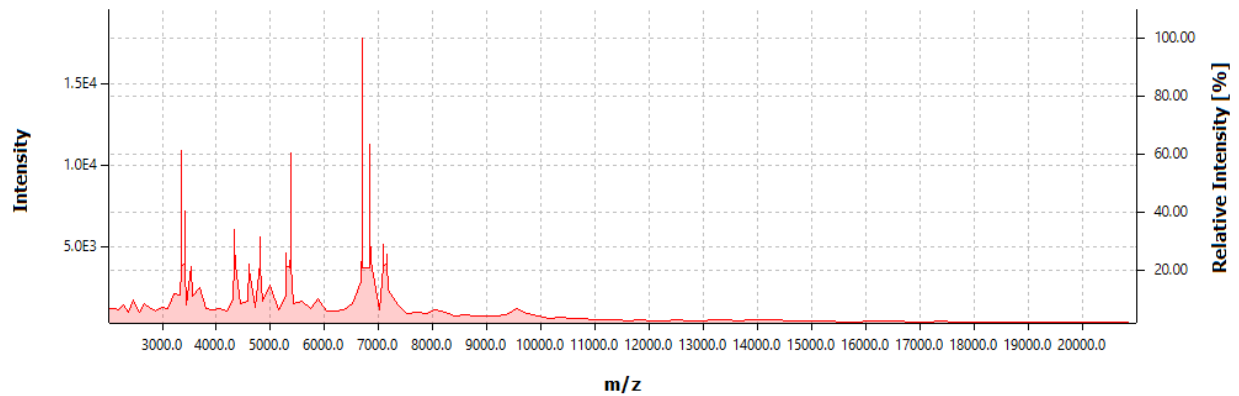


Figura 7: Los resultados mostraron que el 56% de los aislados corresponden al género *Bacillus subtilis*, mostrando el siguiente patrón entre los diversos aislados microbianos

Tabla 4: Identificación de aislados bacterianos vía carbohidratos y MALDI TOF		
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus cereus</i>	Cepas únicas.
H, Q1, Q2, Q4, Q5, S1, S2, U1, I, II, III, VI, VII, IX, X, XIII, XV, XVIII, XX, XXII, XXV, XXVI, XXVIII, XXX y XXXIV	A, B, C, E, F, M, N, R3, R4, S3, IV, V, XI, XVI, XVII y XXXI	L <i>Pantoea agglomerans</i> I <i>Bacillus firmus</i> IV <i>Bacillus muralis</i> XXIII <i>Enterococcus s.p.</i>

### Extracción de biosurfactantes: selección de aislados microbianos.

Los aislados bacterianos seleccionados se inocularon en matraces con medio MSM + glucosa 2% (v/v) y caldo soya tripticaseina (CST) y estos se dejaron incubar hasta la fase estacionaria de cada uno de los microorganismos, las cuales el 90% de los aislados alcanzaban esta fase a las 24 a 48 horas de incubación y agitación, el resto de las bacterias como I y XXIII alcanzaron la fase estacionaria en 96 y 72 horas. En la siguiente tabla se muestran los diferentes tiempos alcanzados de la fase estacionaria.

Tabla 5: Tiempo de crecimiento de los aislados microbianos.					
Aislado	Tiempo (horas)	Aislado	Tiempo (horas)	Aislado	Tiempo (horas)
A	24	S1	48	XIV	24
B	24	S2	48	XV	48
E	24	S3	24	XVI	48
C	24	U1	24	XVII	24
F	24	I	96	XVIII	48
H	48	II	48	XX	48
L	24	III	24	XXII	48
M	24	IV	48	XXIII	72
N	24	V	24	XXV	24
Q1	24	VI	48	XVI	24
Q2	48	VII	24	XVIII	48
Q4	48	IX	48	XXX	24
Q5	48	X	48	XXXI	48
R3	24	XI	24	XXXIV	48
R4	24	XIII	48	Control (-)	-



Figura 8: Incubadora con agitación cargada con matraces.

## Determinación de la producción de surfactantes.

### Determinación de IE<sub>24</sub>

De los aislados microbianos, pese a que pertenecen al mismo género y especie, hubo variaciones en los índices de emulsificación, esto debido a que pueden tratarse de cepas diferentes o subespecies perteneciendo a los mismos grupos de *Bacillus s.p.* En el caso de las bacterias pertenecientes al género *Bacillus subtilis* tuvieron variaciones en el resultado de los índices de emulsificación en comparación a las bacterias del género *Bacillus cereus*, que en su mayoría el porcentaje fue menor al 10%. En la tabla 6 se muestra los índices de emulsificación, criterio que se toma en cuenta para los aislados productores de biosurfactantes.

Tabla 6: índice de emulsificación en 24 horas en medio CST.					
<i>Bacillus cereus</i>		<i>Bacillus subtilis</i>			
Aislado	IE <sub>24</sub> (%)	Aislado	IE <sub>24</sub> (%)	Aislado	IE <sub>24</sub> (%)
A	0	H	7.32	XVIII	7.32
B	0	Q1	27.5	XX	0
E	0	Q2	0	XXII	28.57
C	0	Q4	14.2	XXV	11.42
F	0	Q5	48.7	XXVI	28.9
M	0	S1	28.62	XXVIII	0
N	0	S2	28.62	XXX	25

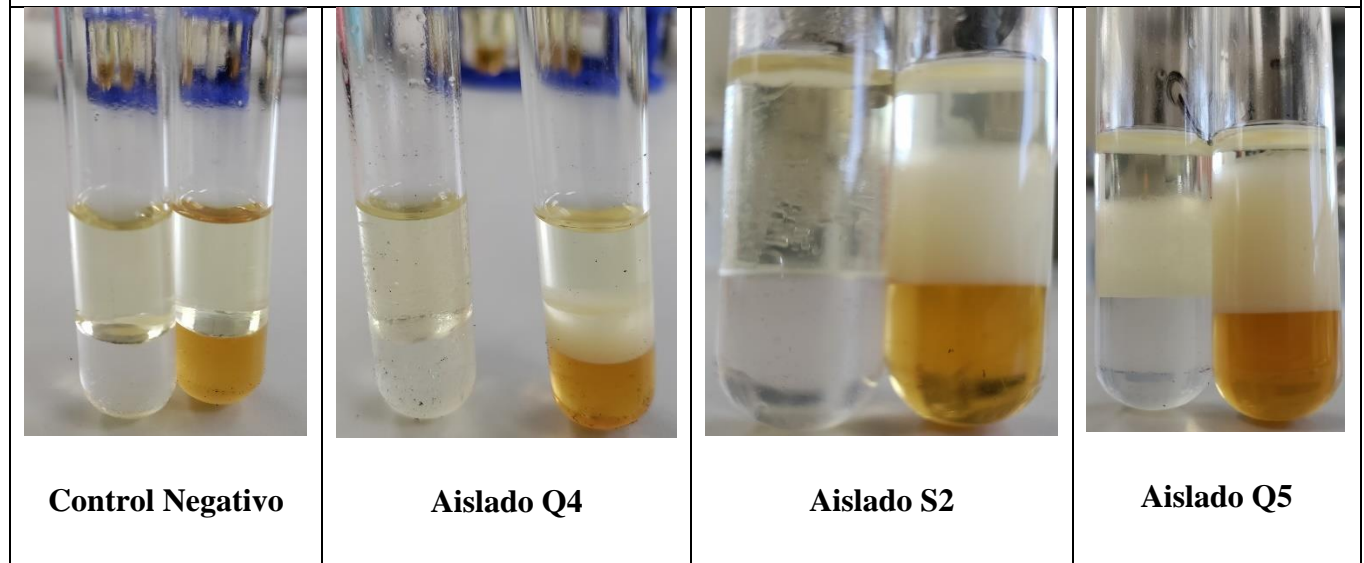
R3	10.3	U1	28.62	XXXIV	10
R4	14.28	II	45.71	Control (-)	0
S3	0	III	45		
IV	20.11	VI	7.3		
V	0	VII	19.5		
XI	28.62	IX	42.85		
XVI	0	X	26		
XVII	0	XIII	27.89		
XXXI	0	XV	0		

Al experimentar con ambos medios de cultivo, hubo variaciones significativas en la producción de emulsión entre los aislados microbianos desarrollados en medio MSM y en aquellas desarrolladas en CST, en el caso de S1 la producción de emulsión se desarrolló mejor en CST que en medio MSM, caso también que involucra al aislado Q5, ya que en este aislado se desarrolló de manera óptima en el medio MSM. Esto puede deberse a que corresponde a una cepa diferente al resto de los integrantes de la especie *B. subtilis* (tabla 7). Se anexan algunas imágenes con respecto a la comparación de los índices de emulsificación.

Aislados.	CST.	MSM + glucosa al 2%.
Q4	14.2	5.71
Q5	48.7	40
S1	28.62	51.8
S2	28.62	0
II	45.71	40
III	45	40.19
IX	42.85	35.33
XI	28.62	0
XIII	28.62	0
Control (-)	0	0

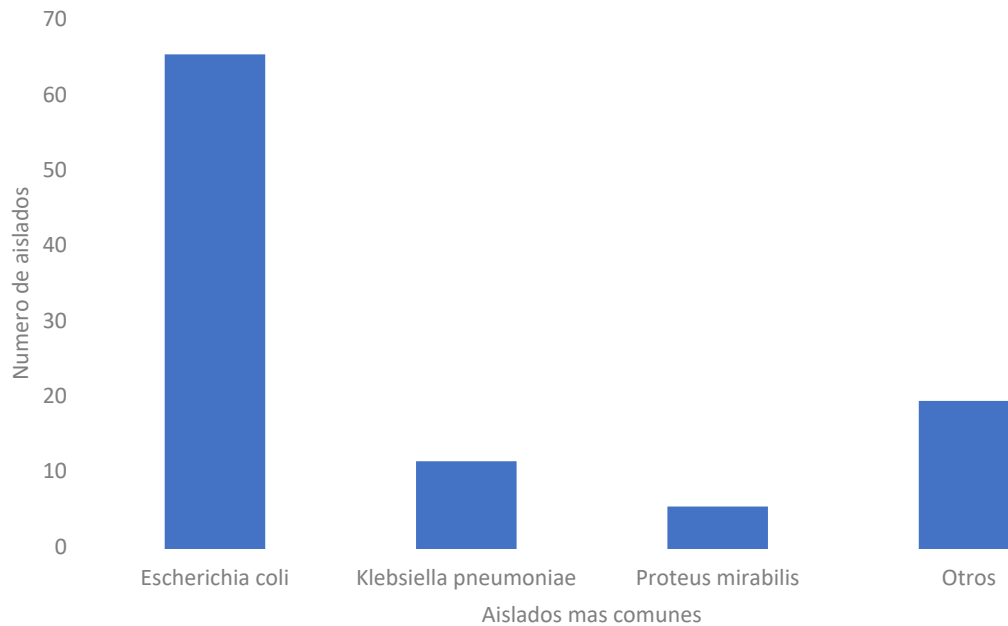
Tabla 8: Comparación de ambos medios de cultivo que permiten el desarrollo y producción de
--

surfactantes.



### Identificación de aislados microbianos en pacientes ambulatorios.

Para la segunda parte de los experimentos, se requirieron muestras de pacientes obtenidas en laboratorios privados, trabajando un lapso de 1 año, de mayo del 2020 a mayo del 2021 un total de 309 muestras de pacientes las cuales, 226 se procesaron para urocultivo (73.10%) de las muestras totales, obteniéndose un total de positivos de 101 (44.69% de las muestras procesadas para urocultivo) las cuales, se aislaron 81 microorganismos de la familia Enterobacteriaceae (80.79% de los cultivos), tomando este porcentaje como el 100%, las especies mayormente aisladas fueron 65 aislados de *E.coli* (80.24%), 11 aislados de *K. pneumoniae* (13.58%) y *P. mirabilis* detectado en 5 aislados (6.17%); del resto de los aislados microbianos, en 14 cultivos se aisló *Enterococcus faecalis* (13.86%) y el restante de cultivos positivos correspondieron a *Pseudomonas aeruginosa* (4.95%). Esta información es útil para corroborar los índices de resistencia y cuál es la frecuencia en nuestra localidad de aislar este tipo de microorganismos (figura 9).



*Figura 9: Principales agentes etiológicos de infección de vías urinarias (IVU) aisladas en 1 año.*

Para la detección de resistencias, dentro de estos perfiles se detectaron cerca de 50 cultivos que cumplen con la definición de MDR. Los principales grupos de antibióticos a los que se detectaron resistencias fueron a fluoroquinolonas y a quinolonas sencillas (55.44% y 61.38% respectivamente) seguida de resistencia a Trimetoprima con sulfametoxazol (50.25%) y cefalosporinas de tercera generación (34.65%) y por ultimo los aminoglucósidos (amikacina y gentamicina en 29.70%). Los únicos antibióticos a los que demostraron mejor efectividad fueron a nitrofurantoina (23.76%) y fosfomicina con apenas un 15.11% de resistencia (figura 10).

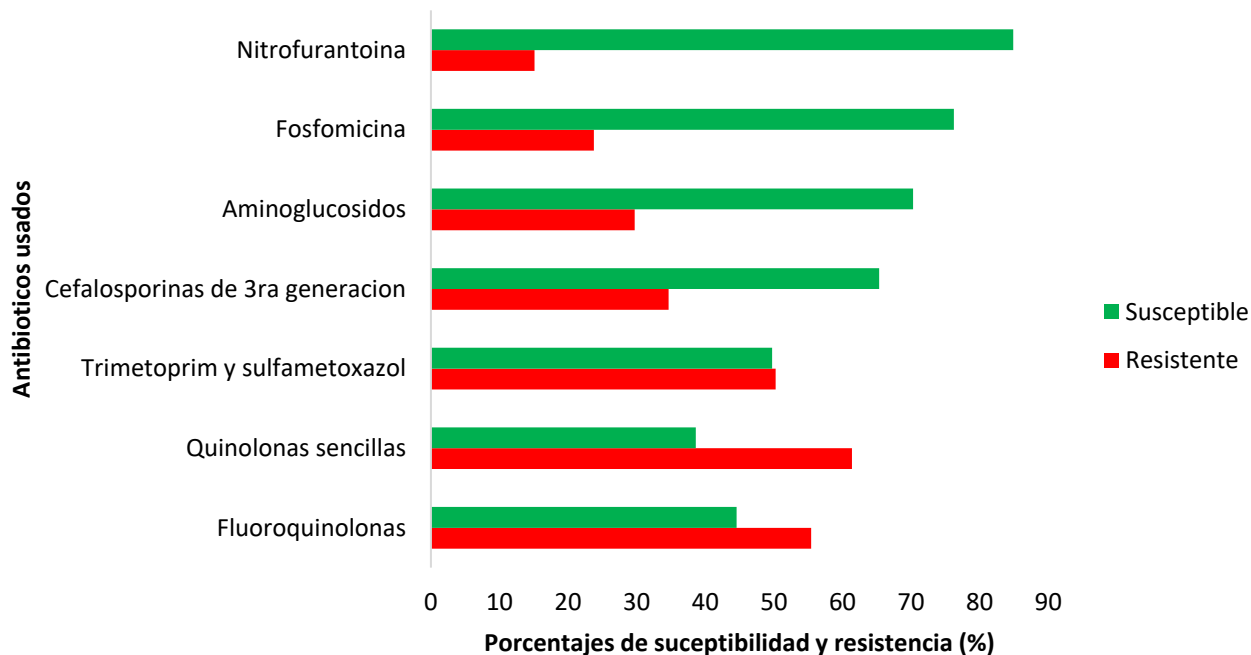


Figura 10: Antibióticos de primera y segunda línea con porcentaje de susceptibilidad y resistencia.

Tomando en cuenta a las bacterias de interés de nuestra investigación, elegimos cinco aislados bacterianos (E1, E2, E3, E4 y E5) de manera aleatoria para probar los extractos de biosurfactantes obtenidos. Para nuestro estudio también recolectamos una muestra de herida donde fue aislado *S. aureus* resistente a penicilina, la cual se abrevio como "Sa" para su identificación en los cultivos y como muestra guía para los experimentos con los biosurfactantes. A continuación, en la siguiente tabla se deja el tipo de resistencias que presentan dichos microorganismos (tabla 9).

Bacteria	Antibiograma resistente	Origen
<i>Escherichia coli</i> (1)	Ciprofloxacina, Norfloxacina, Ofloxacina, Ac. Nalidixico, Trimetoprim-sulfametoxazol, Aztreonam, Ceftriaxona, Cefixima, Cefdinir, Cefotaxima, Ceftazidima, Cefuroxima, Levofloxacina, Ampicilina, Gentamicina, Amikacina, Nitrofurantoina.	Urocultivo comunidad.
<i>Escherichia coli</i> (2)	Ciprofloxacina, Norfloxacina, Ofloxacina, Ac. Nalidixico, Trimetoprim-sulfametoxazol, Aztreonam, Ceftriaxona, Cefixima, Cefdinir, Cefotaxima, Ceftazidima, Cefuroxima, Levofloxacina, Ampicilina,	Urocultivo comunidad.

	Gentamicina, Amikacina, Nitrofurantoina.	
<i>Escherichia coli</i> (3)	Ciprofloxacina, Norfloxacina, Ofloxacina, Ac. Nalidixico, Trimetoprim-sulfametoxazol, Aztreonam, Ceftriaxona, Cefixima, Cefdinir, Cefotaxima, Ceftazidima, Cefuroxima, Levofloxacina, Ampicilina.	Urocultivo comunidad.
<i>Escherichia coli</i> (4)	Ciprofloxacina, Norfloxacina, Ofloxacina, Ac. Nalidixico, Trimetoprim-sulfametoxazol, Aztreonam, Ceftriaxona, Cefixima, Cefdinir, Cefotaxima, Ceftazidima, Cefuroxima, Cefepima, Imipenem, Levofloxacina, Ampicilina, Gentamicina, Amikacina, Nitrofurantoina.	Urocultivo comunidad.
<i>Escherichia coli</i> (5)	Ciprofloxacina, Norfloxacina, Ofloxacina, Ac. Nalidixico, Trimetoprim-sulfametoxazol, Aztreonam, Ceftriaxona, Cefixima, Cefdinir, Cefotaxima, Ceftazidima, Cefuroxima, Levofloxacina, Ampicilina.	Urocultivo comunidad.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Penicilina, Azitromicina, Eritromicina.	Herida en mano.

### **Efecto biocida de los biosurfactantes derivados de cepas extremófilas en cepas de *E.coli* MDR y *Staphylococcus aureus* resistente a penicilina.**

Para las pruebas biocidas, se eligieron los aislados bacterianos extremófilos que presentaron mayor IE<sub>24</sub>, de los cuales se eligieron cuatro para pruebas contra los cinco diferentes aislados de *E. coli* y el aislado *S. aureus*.

Una vez concentrado y extraído el surfactante, se almacenaron en tubos de 1.5 mL conteniendo aproximadamente 350 µL de agua. Las pruebas se realizaron obteniendo el surfactante en cultivos con 50, 250 y 500 mL de CST en los tiempos requeridos para el desarrollo de las bacterias extremófilas.

### **Método de Kirby-Bauer.**

En placas de Muller-Hinton posteriores a 24 horas de incubación, se midieron los halos de inhibición de las cajas de Petri, la cual para todos los casos no se detectaron halos de inhibición, por lo que se realizaron las pruebas de estos compuestos por los métodos de dilución, con probabilidad de que ambos organismos tuvieran resistencia a alguno de los compuestos derivados. Se anexan algunas imágenes donde se obtienen los resultados para la prueba (figura 10).

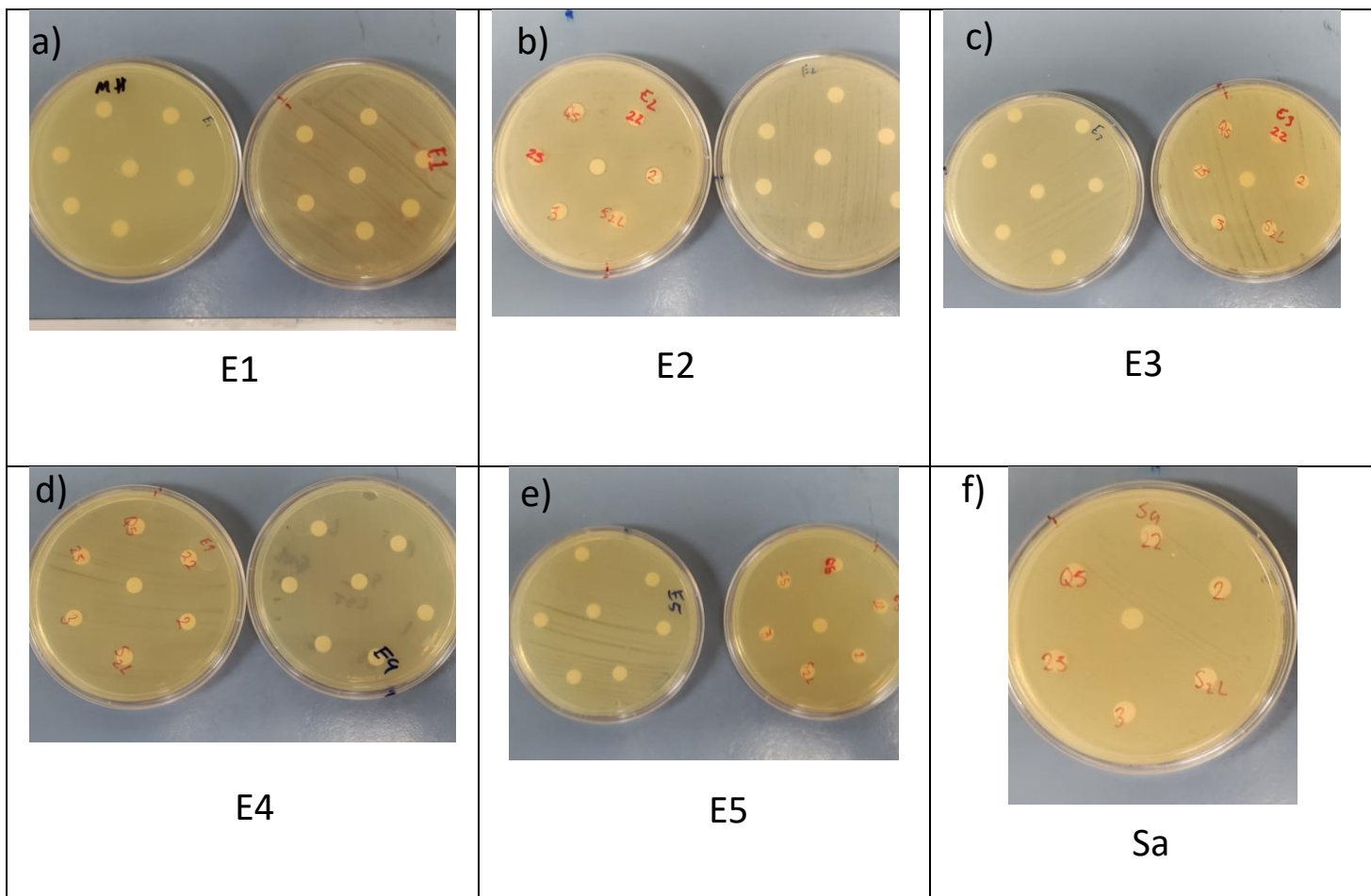


Figura 11: Imágenes de los medios de cultivo con los sensidiscos impregnados con los biosurfactantes después de 24 horas. De izquierda a derecha: imagen de 11a hasta 11e: Cultivo con siembra masiva de *E.coli* MDR 1 a *E.coli* MDR 5 (Abreviadas como E1 a E5) sin mostrar halo de inhibición. Se incluye a la caja con Sa (11f) que bajo este método no se demuestra halo de inhibición.

### Método de dilución para cálculo de $IC_{50}$

Para el cálculo de  $IC_{50}$ , se realizó la medición a través de un lector de placas y los valores de absorbancia fueron comparados con los blancos con caldo de cultivo MH y CST a las 0, 12 y 24 horas. Los valores obtenidos se pasaron al sistema Graphpad prism 8, el cual contiene las fórmulas para determinación de  $IC_{50}$ , calculado por medio de una regresión lineal. Para comparar los efectos de los surfactantes en *E.coli* MDR y *S. aureus* se consideró el uso de antibióticos de última línea para el uso en contra de los microorganismos MDR y XDR como es el imipenem de la familia de los Beta-lactámicos y la colistina, considerando que esta última pertenece al grupo

de los lipopéptidos, con estructuras compatibles de biosurfactante en los microorganismos Gram negativos. A continuación, se muestran las gráficas con los resultados de dichos antibióticos.

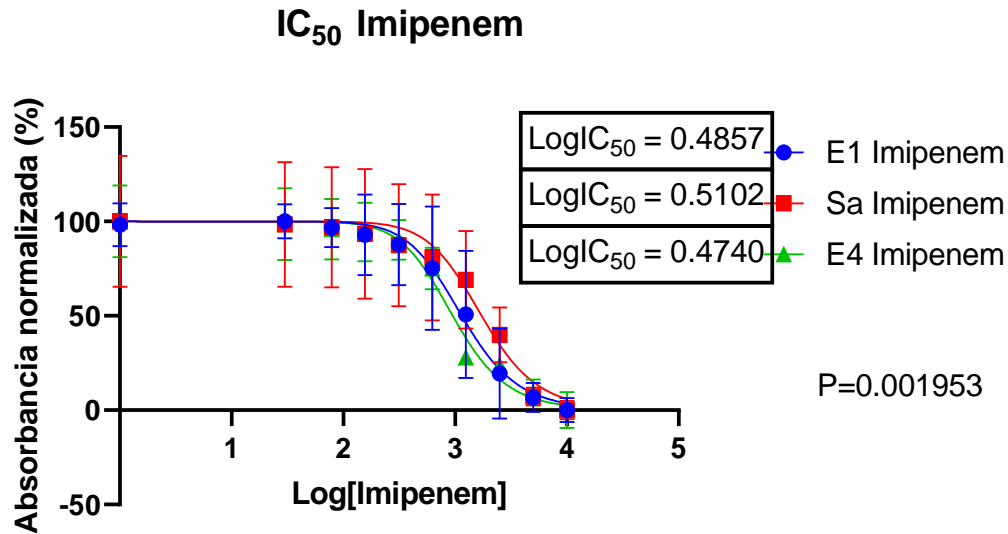


Figura 12: Proceso de normalización de las absorbancias obtenidas de las 3 repeticiones para obtener el análisis, en el caso del antibiótico Imipenem se corrobora la concentración logarítmica requerida para obtener la cantidad necesaria de antibiótico en estos tres aislados bacterianos.

Para el caso del imipenem mostrado en la figura 12 podemos determinar su efectividad con las concentraciones logarítmicas de cada uno los microorganismos probados en contra de imipenem. Previamente, durante la determinación fenotípica de las resistencias, estas bacterias habían presentado sensibilidad a dicho antibiótico, por lo que se eligió para comparar los resultados y valores de las pruebas realizadas con los surfactantes aislados. Para el caso de la colistina (figura 13), se corrieron pruebas solamente en los aislados *E coli* MDR, debido a que *S. aureus* posee una resistencia natural a colistina. A continuación, se muestran los efectos en dos cepas a manera de prueba y control.

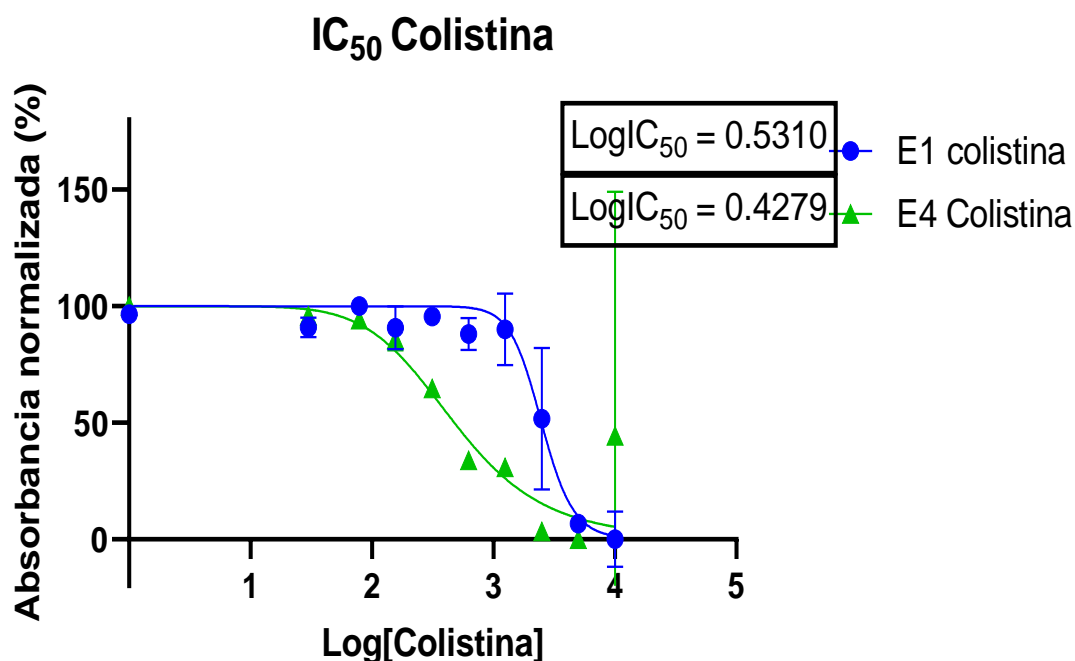
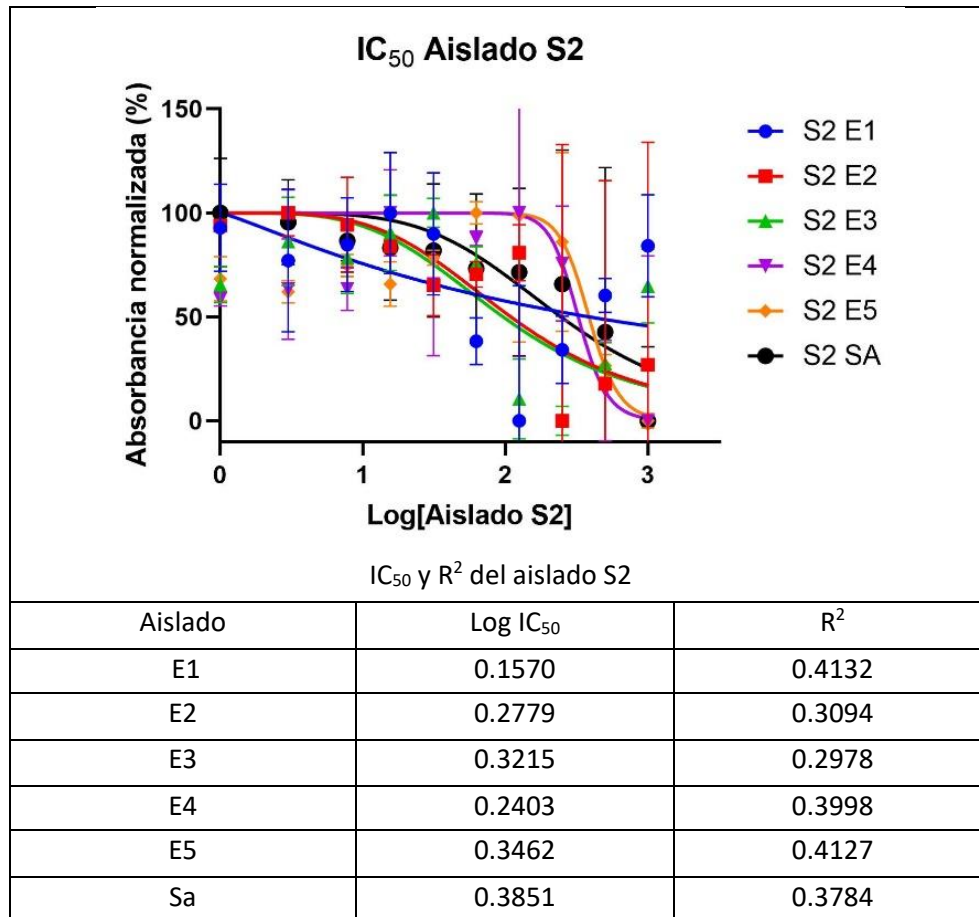


Figura 13.: Efectos de colistina en la concentración y desarrollo de *E.coli* MDR.

#### Respuesta de *E.coli* MDR y *S. aureus* a la exposición de los biosurfactantes.

Los valores de absorbancia fueron analizados con la herramienta Graphpad Prism 8, con la opción de cálculo de IC<sub>50</sub> de las 3 corridas. Para fundamentar y detectar los valores se tomaron en cuenta el IC<sub>50</sub> de cada uno de los extractos y comparamos los efectos con cada uno de los aislados de *E. coli* MDR, adjuntando la respuesta contra *S. aureus*. En cada una de las gráficas se detectó un comportamiento diferente en cada uno de los aislados de *E. coli* MDR presentes, dando diferentes resultados al análisis de regresión y el cálculo de R cuadrada (R<sup>2</sup>). A continuación, se explican por medio de gráficas los resultados de las unidades logarítmicas de cada IC<sub>50</sub> calculado y el resultado de R cuadrada de cada aislado y el comportamiento de cada *E. coli* MDR y de *S. aureus*.

En la figura 14 podemos observar los valores calculados de la actividad del biosurfactante obtenido de S2 con los aislados microbianos seleccionados, al comparar los resultados de la regresión lineal, los surfactantes generaron una respuesta aceptable en E1 y E5.



*Figura 14: Resultados del Aislado S2*

En la figura 15, comparando los resultados obtenidos del biosurfactante del aislado 2, se puede observar una R<sup>2</sup> más ajustada y comparando con los efectos sobre *S. aureus*, tiene mejor respuesta en contra de estos microorganismos que los efectos observados en *E. coli*. Parte de estos resultados obtenidos en este experimento se describirá más en discusión y conclusiones, ya que confirma algunos experimentos previos.

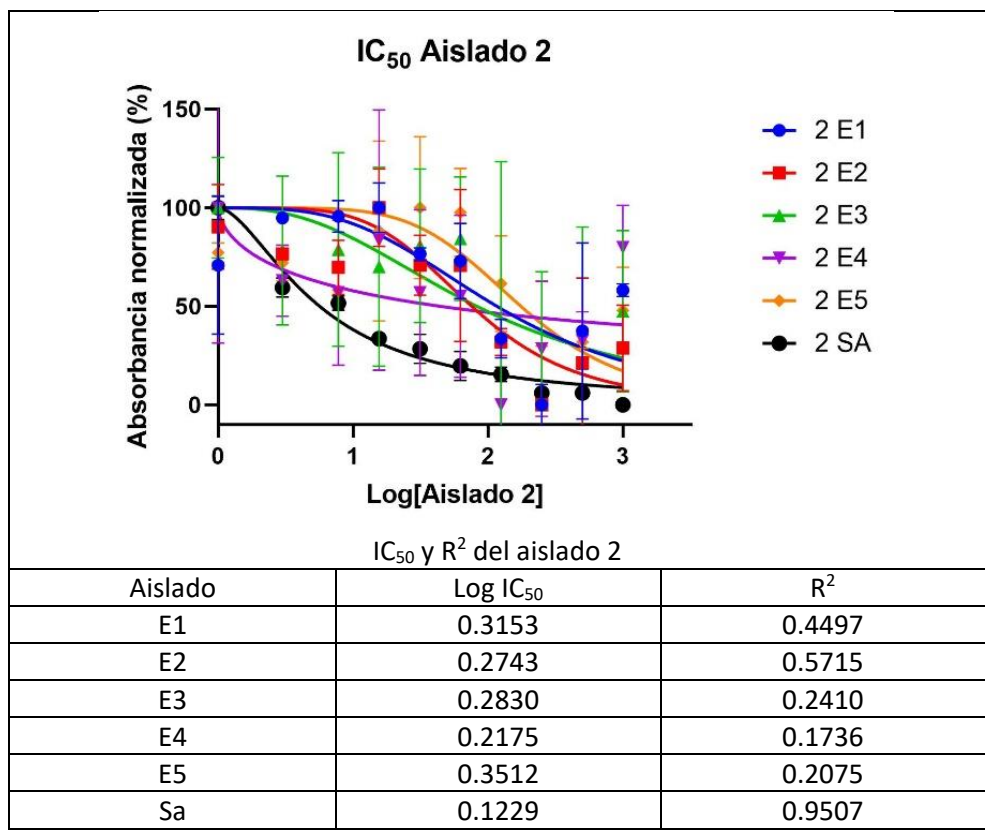
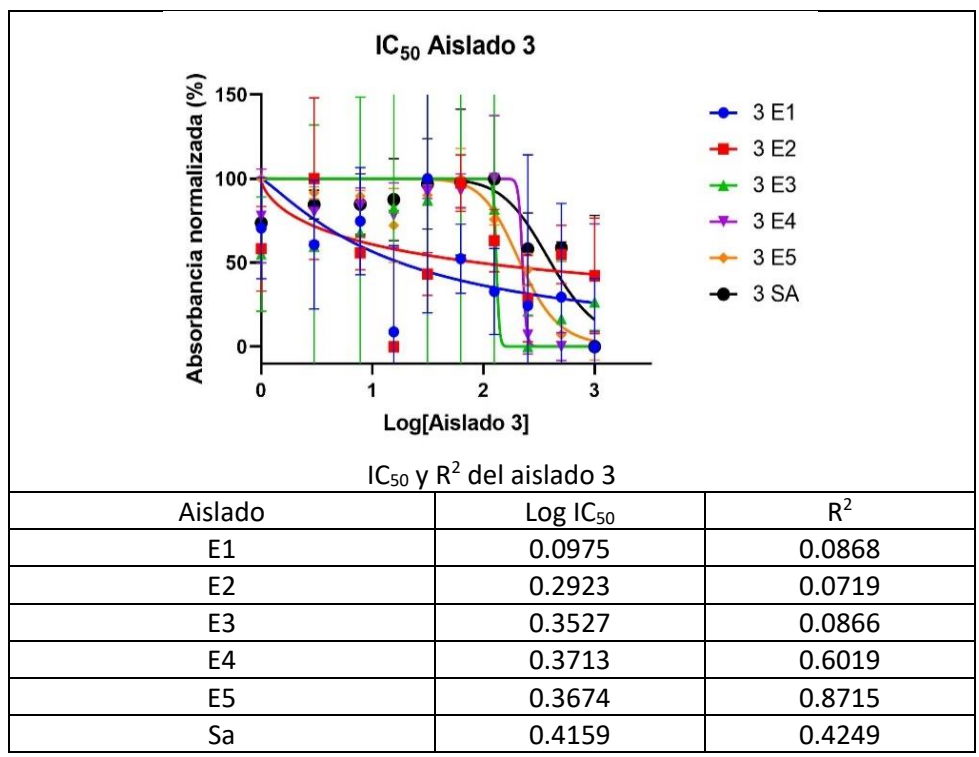


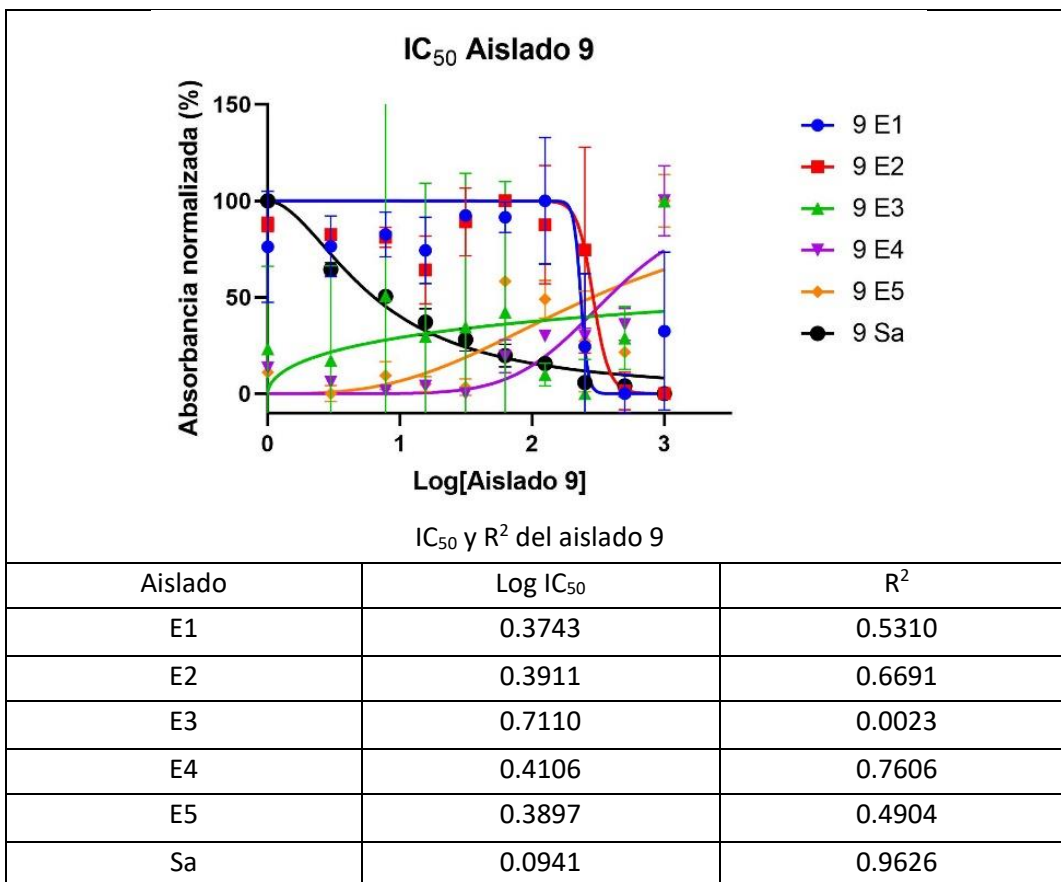
Figura 15:  
Resultados  
Aislado 2.

del



En el mismo caso al observar los resultados en los surfactantes del aislado 3 en la figura 16, tanto en E5 fue la única de las *E. coli* que tuvo respuesta contra estos biosurfactantes. Algo que se demostró en este experimento es el caso de *S. aureus*, del cual no se encontró una respuesta

Figura 16: Resultados del Aislado 3.



favorable como en el caso de los surfactantes del aislado 2.

*Figura 17: resultados aislado 9*

Para el último extracto de biosurfactantes del aislado 9, se repite la respuesta efectiva en contra del aislado de *S. aureus* y en el caso de *E. coli* la respuesta fue variable para los aislados E4 y E2 según a las pruebas de  $R^2$ , sin embargo, al analizar la curva obtenida para el aislado E4 no es compatible con la respuesta o conducta que debe de presentar para el  $IC_{50}$ .

### **Discusiones y conclusiones.**

Al revisar y comparar las respuestas de cada uno de los biosurfactantes sobre las cepas patógenas, se detectó una respuesta variable en cada uno de los aislados de *E. coli*, sin embargo, para el caso de los aislados de *S. aureus* hay una respuesta favorable. Tomando esto en cuenta podemos demostrar en este estudio que existe una respuesta inhibitoria de los biosurfactantes sobre *S. aureus* que para *E.coli*.

Para esto existen dos posibilidades a la respuesta de *E.coli*. La primera teoría es respecto a la composición de los biosurfactantes, la mayoría de los biosurfactantes aislados en las cepas de *B. subtilis* tienen mayor afinidad a los componentes de pared de los Gram positivos, a diferencia de los Gram negativos que presentan una resistencia natural en contra de estos componentes. Esta teoría se puede apoyar en los trabajos de Luo et al., 2019; Toral et al., 2018; Viesser et al., 2020

y Yuliani et al., 2018 quienes refieren que los biosurfactantes producidos por *Bacillus* s.p. no tienen efecto en contra de *E. coli*, debido a que muchos de los biosurfactantes no logran producir de manera directa el efecto surfactante sobre la pared de los Gram negativos. La segunda teoría que puede explicar este comportamiento en *E. coli* podría ser por la característica de ser MDR, de tratarse de bacterias que tienen diferentes mecanismos de resistencia, por lo que alguna de ellas pueda afectar a la respuesta de los biosurfactantes. Algunas cepas de *B. subtilis* han tenido la capacidad de producir surfactantes con una respuesta media a baja a *E. coli*, sin embargo estas sustancias han respondido mejor en contra de microorganismos productores de biopelículas, causantes de enfermedades intrahospitalarias (de Souza Freitas et al., 2020). Otro estudio reciente probó la efectividad de los derivados de *B. subtilis*, entre los más importantes la surfactina, demostrando que se requieren dosis aproximadas de 100 g/1000 mL para tener un efecto mínimo en el desarrollo de las bacterias y con un ligero retraso en el tiempo de desarrollo (Lilge et al., 2022).

El estudio de los biosurfactantes producidos por microorganismos ha sido un campo ampliamente explorado, para sus diversas aplicaciones en las áreas industriales, ambientales y en la medicina. Actualmente, hay estudios que demuestran que los biosurfactantes tienen una importante actividad contra una gran diversidad de hongos que puede ser patógenos para el ser humano y para las plantas (Goswami & Deka, 2019; Jiao et al., 2021; A. Kumar et al., 2021; Qin Gu et al., 2017) y otro grupo de investigadores confirman la susceptibilidad de *S. aureus* y sus cepas hacia los biosurfactantes producidos por el género *Bacillus* s.p. (Kumar et al., 2016; Liu et al., 2019; Ndlovu et al., 2017; Trenozhnikova y Azizan, 2018).

En un estudio reciente (Kourmentza et al., 2021) se menciona que los surfactantes tienen mejor espectro contra organismos Gram positivos que en los Gram negativos por los componentes de la pared, recordando que aquellos poseen diferencias estructurales en el tipo de pared que presentan que estos últimos. Otro estudio demuestra que el uso de los biosurfactantes logra inhibir en gran medida la producción de biopelícula en el caso de microorganismos como *S. aureus* en combinación de otros antibióticos (Juma et al., 2020). Otro artículo (Kaspar et al., 2019) analiza la combinación de medicamentos como los macrólidos, ampliamente utilizados para microorganismos Gram positivos y también derivados de cepas de *B. subtilis* muestran grandes efectos en contra de microorganismos fitopatógenos.

Dentro de los estudios y la búsqueda bibliográfica, también se ha detectado otros tipos de biosurfactantes derivados de otros microorganismos, como en el caso de *Pseudomonas s.p.* con la capacidad de producir un daño importante en el desarrollo de células hijas interfiriendo el desarrollo de estas y el remodelado de la pared celular, una vez más, observado en Gram positivos como en *L. monocytogenes* y *S. aureus* (Schlusselhuber et al., 2018) (Henkel & Hausmann, 2019), otro de los espectros en los que se puede detallar las funciones como biocidas a los surfactantes, es en la aplicación como antifúngicos, en especial la surfactina e iturina aisladas en las cepas de *B. subtilis*, sin embargo en los trabajos de (H. Chen et al., 2018) (Fira et al., 2018) revela las dificultades que poseen estos lipopetidos para la inhibición de bacterias Gram negativas como *E. coli*, pero no para hongos de interés médico y de interés agroindustrial.

Es necesario continuar con la búsqueda de nuevas alternativas ante la amenaza creciente de las bacterias resistentes a los antibióticos, al menos en aquellos que la ONU y la OMS consideran como prioridad número uno. La búsqueda de nuevas sustancias continua y los microorganismos extremófilos están aún en el foco de atención de la comunidad científica por la cantidad de enzimas, péptidos y biosurfactantes que pueden producir tanto hongos como bacterias.

En este estudio demostramos la efectividad de los biosurfactantes sobre una bacteria de gran interés como lo es *S. aureus*, pese a que el objetivo de nuestro estudio era buscar respuesta en contra de *E.coli* MDR, este documento servirá para impulsar toda una línea de investigación para la búsqueda y determinación de sustancias que puedan inhibir a *E .coli* MDR o a otros bacilos Gram negativos que se encuentran dentro de esta lista negra que podría desatar una nueva emergencia sanitaria a futuro.

## Referencias

- Abouelkheir, S. S., Kamara, M. S., Atia, S. M., Amer, S. A., Youssef, M. I., Abdelkawy, R. S., Khattab, S. N., & Sabry, S. A. (2020). Novel research on nanocellulose production by a marine *Bacillus velezensis* strain SMR: a comparative study. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70857-7>
- Abushaheen, M. A., Muzaaheed, Fatani, A. J., Alosaimi, M., Mansy, W., George, M., Acharya, S., Rathod, S., Divakar, D. D., Jhugroo, C., Vellappally, S., Khan, A. A., Shaik, J., & Jhugroo, P. (2020). Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *Disease-a-Month*, *66*(6). <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2020.100971>
- Arima, K., Kakinuma, A., & Tamura, G. (1968). Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *31*(3), 488–494. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(68\)90503-2](https://doi.org/10.1016/0006-291X(68)90503-2)
- Ballot, D. E., Bandini, R., Nana, T., Bosman, N., Thomas, T., Davies, V. A., Cooper, P. A., Mer,

- M., & Lipman, J. (2019). *A review of -multidrug-resistant Enterobacteriaceae in a neonatal unit in Johannesburg , South Africa*. 1–9.
- Bartolini, M., Cogliati, S., Vileta, D., Bauman, C., Ramirez, W., & Grau, R. (2019). *Positive Role in the Antifungal Proficiency of Bacillus subtilis*. 85(9), 1–15.
- Bassetti, M., Peghin, M., Vena, A., & Giacobbe, D. R. (2019). Treatment of Infections Due to MDR Gram-Negative Bacteria. *Frontiers in Medicine*, 6(April), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00074>
- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Technical Bulletin of the Registry of Medical Technologists*, 36(3), 49–52.
- Beveridge, T. J. (1999). Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *Journal of Bacteriology*, 181(16), 4725–4733. <https://doi.org/10.1128/jb.181.16.4725-4733.1999>
- Bradbury, J. M., Abdul-wahab, O. M. S., Yavari, C. A., Dupiellet, J., & Bow, J. M. (1993). *gallisepticum and Found in Birds*. 728, 721–728.
- Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 969–976. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>
- Chen, H., Wang, L., Su, C. X., Gong, G. H., Wang, P., & Yu, Z. L. (2008). Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. *Letters in Applied Microbiology*, 47(3), 180–186. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02412.x>
- Chen, J., Wu, Q., Hua, Y., Chen, J., Zhang, H., & Wang, H. (2017). Potential applications of biosurfactant rhamnolipids in agriculture and biomedicine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(23–24), 8309–8319. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8554-4>
- Control, D. (2015). *2015 Human Isolates Surveillance Report*.
- Cooper, D. G., & Goldenberg, B. G. (1987). Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(2), 224–229. <https://doi.org/10.1128/aem.53.2.224-229.1987>
- Danilovich, M. E., Sánchez, L. A., Acosta, F., & Delgado, O. D. (2018). Antarctic bioprospecting: in pursuit of microorganisms producing new antimicrobials and enzymes. *Polar Biology*, 41(7), 1417–1433. <https://doi.org/10.1007/s00300-018-2295-4>
- de Souza Freitas, F., Coelho de Assis Lage, T., Ayupe, B. A. L., de Paula Siqueira, T., de Barros, M., & Tótola, M. R. (2020). *Bacillus subtilis* TR47II as a source of bioactive lipopeptides against Gram-negative pathogens causing nosocomial infections. *3 Biotech*, 10(11), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02459-z>
- Delcour, A. H. (2009). Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1794(5), 808–816.

<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.005>

- Duitman, E. H., Wyczawski, D., Boven, L. G., Venema, G., Kuipers, O. P., & Hamoen, L. W. (2007). Novel methods for genetic transformation of natural *Bacillus subtilis* isolates used to study the regulation of the mycosubtilin and surfactin synthetases. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(11), 3490–3496. <https://doi.org/10.1128/AEM.02751-06>
- Dulm, E. Van, Tholen, A. T. R., Pettersson, A., Rooijen, M. S. Van, Willemsen, I., Molenaar, P., Damen, M., Gruteke, P., Id, P. O., Kuijper, J., Hertogh, C. M. P. M., & Vandenbroucke-graals, C. M. J. E. (2019). *High prevalence of multidrug resistant Enterobacteriaceae among residents of long term care facilities in Amsterdam , the Netherlands*. 1–14.
- Esser, V. M., & Elefson, D. E. (1970). Experiences with the Kirby-Bauer method of antibiotic susceptibility testing. *American Journal of Clinical Pathology*, *54*(2), 193–198. <https://doi.org/10.1093/ajcp/54.2.193>
- Fan, Y., Wang, J., Gao, C., Zhang, Y., & Du, W. (2020). A novel exopolysaccharide-producing and long-chain n-alkane degrading bacterium *Bacillus licheniformis* strain DM-1 with potential application for in-situ enhanced oil recovery. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65432-z>
- Feng, Y., Xie, Z., Jiang, X., Li, Z., Shen, Y., Wang, B., & Liu, J. (2018). The applications of promoter-gene-engineered biosensors. *Sensors (Switzerland)*, *18*(9). <https://doi.org/10.3390/s18092823>
- Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., & Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*, *285*, 44–55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>
- García Apac, C. (2018). Resistencia antimicrobiana. *Diagnóstico*, *57*(2), 79–81. <https://doi.org/10.33734/diagnostico.v57i2.138>
- Garza-González, E., Morfín-Otero, R., Mendoza-Olazarán, S., Bocanegra-Ibarias, P., Flores-Treviño, S., Rodríguez-Noriega, E., Ponce-de-León, A., Sanchez-Francia, D., Franco-Cendejas, R., Arroyo-Escalante, S., Velázquez-Acosta, C., Rojas-Larios, F., Quintanilla, L. J., Maldonado-Anicacio, J. Y., Martínez-Miranda, R., Ostos-Cantú, H. L., Gomez-Choel, A., Jaime-Sanchez, J. L., Avilés-Benítez, L. K., ... Camacho-Ortiz, A. (2019). A snapshot of antimicrobial resistance in Mexico. Results from 47 centers from 20 states during a six-month period. *PLoS ONE*, *14*(3), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209865>
- George Georgiou, Sung-Chyr Lin, M. M. S. (1992). Surface-active compounds from microorganisms. *Nature Biotechnology*, *10*(1), 60–65.
- Goswami, M., & Deka, S. (2019). Biosurfactant production by a rhizosphere bacteria *Bacillus altitudinis* MS16 and its promising emulsification and antifungal activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *178*, 285–296. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.03.003>
- Grégoire, N., Aranzana-Climent, V., Magréault, S., Marchand, S., & Couet, W. (2017). Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Colistin. *Clinical Pharmacokinetics*, *56*(12),

1441–1460. <https://doi.org/10.1007/s40262-017-0561-1>

- Gupta, G. N., Srivastava, S., Khare, S. K., & Prakash, V. (2014). Extremophiles: An Overview of Microorganism from Extreme Environment. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, 7(2), 371. <https://doi.org/10.5958/2230-732x.2014.00258.7>
- Henkel, M., & Hausmann, R. (2019). Diversity and Classification of Microbial Surfactants. In *Biobased Surfactants* (Second Edi). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812705-6.00002-2>
- Hoeprich, P. D. (1970). The polymyxins. *Medical Clinics of North America*, 54(5), 1257–1265. [https://doi.org/10.1016/s0025-7125\(16\)32591-3](https://doi.org/10.1016/s0025-7125(16)32591-3)
- Hsueh, Y. H., Somers, E. B., Lereclus, D., Ghelardi, E., & Wong, A. C. L. (2007). Biosurfactant production and surface translocation are regulated by PlcR in *Bacillus cereus* ATCC 14579 under low-nutrient conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(22), 7225–7231. <https://doi.org/10.1128/AEM.00690-07>
- Infectious Diseases Society of America IDSA. (2004). Bad bugs, no drugs: as antibiotics discovery stagnates... A public health crisis brews. *Infectious Diseases Society of America*, July, 35.
- Irwin, J. A. (2020). Overview of extremophiles and their food and medical applications. In *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles*. INC. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818322-9.00006-x>
- Jiang, D., Zeng, G., Huang, D., Chen, M., Zhang, C., Huang, C., & Wan, J. (2018). Remediation of contaminated soils by enhanced nanoscale zero valent iron. *Environmental Research*, 163(February), 217–227. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.01.030>
- Jiao, R., Cai, Y., He, P., Munir, S., Li, X., Wu, Y., Wang, J., Xia, M., He, P., Wang, G., Yang, H., Karunarathna, S. C., Xie, Y., & He, Y. (2021). *Bacillus amyloliquefaciens* YN201732 Produces Lipopeptides With Promising Biocontrol Activity Against Fungal Pathogen *Erysiphe cichoracearum*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11(June), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.598999>
- Juma, A., Lemoine, P., Simpson, A. B. J., Murray, J., O'Hagan, B. M. G., Naughton, P. J., Dooley, J. G., & Banat, I. M. (2020). Microscopic Investigation of the Combined Use of Antibiotics and Biosurfactants on Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, 11(July), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01477>
- Kaspar, F., Neubauer, P., & Gimpel, M. (2019). Bioactive Secondary Metabolites from *Bacillus subtilis*: A Comprehensive Review. *Journal of Natural Products*, 82(7), 2038–2053. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00110>
- Kempf, I., Jouy, E., & Chauvin, C. (2016). Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 48(6), 598–606. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.09.016>

- Kourmentza, K., Gromada, X., Michael, N., Degraeve, C., Vanier, G., Ravallec, R., Coutte, F., Karatzas, K. A., & Jauregi, P. (2021). Antimicrobial Activity of Lipopeptide Biosurfactants Against Foodborne Pathogen and Food Spoilage Microorganisms and Their Cytotoxicity. *Frontiers in Microbiology*, *11*(January), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.561060>
- Kumar, A., Singh, S. K., Kant, C., Verma, H., Kumar, D., Singh, P. P., Modi, A., Droby, S., Kesawat, M. S., Alavilli, H., Bhatia, S. K., Saratale, G. D., Saratale, R. G., Chung, S. M., & Kumar, M. (2021). Microbial biosurfactant: A new frontier for sustainable agriculture and pharmaceutical industries. *Antioxidants*, *10*(9). <https://doi.org/10.3390/antiox10091472>
- Kumar, V., Sheoran, P., Gupta, A., Yadav, J. P., & Tiwari, S. K. (2016). Antibacterial property of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LD4 isolated from a fermented food. *Annals of Microbiology*, *66*(4), 1431–1440. <https://doi.org/10.1007/s13213-016-1230-6>
- Lara-Severino, R. del C., Gómez Oliván, L. M., Sandoval Trujillo, Á. H., Isaac-Olive, K., & Ramírez-Durán, N. (2017). Búsqueda de capacidad productora de biosurfactantes en actinobacterias haloalcalófilas y haloalcalotolerantes. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, *33*(3), 529–539. <https://doi.org/10.20937/RICA.2017.33.03.15>
- Lenhard, J. R., Nation, R. L., & Tsuji, B. T. (2016). Synergistic combinations of polymyxins. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *48*(6), 607–613. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.09.014>
- Lescat, M., Poirel, L., Tinguely, C., & Nordmann, P. (2019). A Resazurin Reduction-Based Assay for Rapid Detection of Polymyxin Resistance in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, *57*(3), 1–6. <https://doi.org/10.1128/JCM.01563-18>
- Lilge, L., Ersig, N., Hubel, P., Aschern, M., Pillai, E., Klausmann, P., Pfannstiel, J., Henkel, M., Heravi, K. M., & Hausmann, R. (2022). *Surfactin Shows Relatively Low Antimicrobial Activity against Bacillus subtilis and Other Bacterial Model Organisms in the Absence of Synergistic Metabolites*.
- Liu, J., Li, W., Zhu, X., Zhao, H., Lu, Y., Zhang, C., & Lu, Z. (2019). Surfactin effectively inhibits *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm formation on surfaces. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *103*(11), 4565–4574. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09808-w>
- Longo, G. A., Sousa, V. S. De, & Kraychete, G. B. (2019). Instituto de Microbiologia Paulo de Góes , Universidade Federal do Rio de Janeiro , Rio de Janeiro , Hospital Universitário Antônio Pedro , Faculdade de Medicina , Universidade Federal Fluminense , Instituto Nacional do Câncer , Rio de Janeiro , Brazil Co. *International Journal of Antimicrobial Agents*. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.08.017>
- Lopes, J., & Inniss, W. E. (1969). Electron microscopy of effect of polymyxin on *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Journal of Bacteriology*, *100*(2), 1128–1129.
- Luo, C., Chen, Y., Liu, X., Wang, X., Wang, X., Li, X., Zhao, Y., & Wei, L. (2019). Engineered biosynthesis of cyclic lipopeptide locillomycins in surrogate host *Bacillus velezensis* FZB42

- and derivative strains enhance antibacterial activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(11), 4467–4481. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09784-1>
- Lutgring, J. D., Kim, A., Campbell, D., Karlsson, M., Brown, A. C., & Burd, E. M. (2019). Evaluation of the MicroScan colistin well and gradient diffusion strips for colistin susceptibility testing in enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*, 57(5). <https://doi.org/10.1128/JCM.01866-18>
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Maurer, F. P., Christner, M., Hentschke, M., & Rohde, H. (2017). Advances in rapid identification and susceptibility testing of bacteria in the clinical microbiology laboratory: Implications for patient care and antimicrobial stewardship programs. *Infectious Disease Reports*, 9(1), 18–27. <https://doi.org/10.4081/idr.2017.6839>
- McGlone, S. M., Bailey, R. R., Zimmer, S. M., Popovich, M. J., Tian, Y., Ufberg, P., Muder, R. R., & Lee, B. Y. (2012). The economic burden of *Clostridium difficile*. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 282–289. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03571.x>
- Mouta, P., Oliveira, N. De, Buonora, S. N., Letícia, C., Souza, P., Júnior, R. S., Carolina, T., José, G., Bom, T., Henrique, C., & Ricardo, A. (2019). *Major Article Surveillance of multidrug-resistant bacteria in pediatric and neonatal intensive care units in Rio de Janeiro State, Brazil*. 1–7. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0205-2019>
- Moyes, R. B., Reynolds, J., & Breakwell, D. P. (2009). Differential staining of bacteria: Gram stain. *Current Protocols in Microbiology*, SUPPL. 15, 1–8. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca03cs15>
- Navarrete-Navarro, S., & Armengol-Sánchez, G. (1999). Costos secundarios por infecciones nosocomiales en dos unidades pediátricas de cuidados intensivos. *Salud Publica de Mexico*, 41(SUPPL. 1), 51–58.
- Ndlovu, T., Rautenbach, M., Vosloo, J. A., Khan, S., & Khan, W. (2017). Characterisation and antimicrobial activity of biosurfactant extracts produced by *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a wastewater treatment plant. *AMB Express*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0363-8>
- Nordberg, P., Monnet, D. L., Cars, O., Lodato, B. E. M., & Kaplan, W. (2013). *Priority Medicines for Europe and the World “A Public Health Approach to Innovation” Background Paper 6.1 Antimicrobial resistance*. April.
- Padayachee, T., & Klugman, K. P. (1999). Novel expansions of the gene encoding

- dihydropteroate synthase in trimethoprim-sulfamethoxazole-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(9), 2225–2230.  
<https://doi.org/10.1128/aac.43.9.2225>
- Poole, K. (2005). Efflux-mediated antimicrobial resistance. In *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (Vol. 56, Issue 1). <https://doi.org/10.1093/jac/dki171>
- Qin Gu, A., Yang Yang, a Qiming Yuan, a Guangming Shi, A., Liming Wu, a Zhiying Lou, a Rong Huo, a Huijun Wu, a Rainer Borriss, B., & Gaoa, X. (2017). Bacillomycin D Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* Is Involved in the Antagonistic Interaction with the Plant-Pathogenic Fungus *Fusarium graminearum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(19), 1–17.
- R, C. (2010). Lectura interpretada del antibiograma: una necesidad clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(6), 375–385. <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-pdf-S0213005X1000087X>
- Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates*, 13(6), 151–171. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2010.08.003>
- Rampelotto, P. H. (2013). Extremophiles and extreme environments. *Life*, 3(3), 482–485.  
<https://doi.org/10.3390/life3030482>
- Read, A. F., & Woods, R. J. (2014). Antibiotic resistance management. *Evolution, Medicine and Public Health*, 2014(1), 147. <https://doi.org/10.1093/emph/eou024>
- Reyes Tena, A., Rincón Enríquez, G., López Pérez, L., Evangelista Martínez, Z., & Quiñones Aguilar, E. (2015). Lucha entre microbios: una herramienta para el control de enfermedades de plantas. *Revista Digital Universitaria UNAM*, 16(11), 1–15.
- Roca, F. P. y J. José. (2004). Acción de los antibióticos. *Revista de La Oficina de Farmacia*, 23, 116–124.
- Rohde, M. (2019). *The Gram-Positive Bacterial Cell Wall*. 1–21.  
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0044-2018>.Correspondence
- Rosenberg, G., Steinberg, N., Oppenheimer-Shaanan, Y., Olender, T., Doron, S., Ben-Ari, J., Sirota-Madi, A., Bloom-Ackermann, Z., & Kolodkin-Gal, I. (2016). Not so simple, not so subtle: The interspecies competition between *Bacillus simplex* and *Bacillus subtilis* and its impact on the evolution of biofilms. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 2(June 2015), 1–11.  
<https://doi.org/10.1038/npjbiofilms.2015.27>
- Sadaka, C., Ellsworth, E., Hansen, P. R., Ewin, R., Damborg, P., & Watts, J. L. (2018). Review on abyssomicins: Inhibitors of the chorismate pathway and folate biosynthesis. *Molecules*, 23(6), 1–25. <https://doi.org/10.3390/molecules23061371>
- Sánchez Pila, F. E. (2016). Importance of *Bacillus subtilis* lipopeptides in the biological control of diseases in crops of high economic value. *Bionatura*, 1(3), 135–138.  
<https://doi.org/10.21931/rb/2016.01.03.7>

- Schlüsselhuber, M., Godard, J., Sebban, M., Bernay, B., Garon, D., Seguin, V., Oulyadi, H., & Desmaures, N. (2018). Characterization of milkisin, a novel lipopeptide with antimicrobial properties produced by *Pseudomonas* sp. UCMA 17988 isolated from bovine raw milk. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAY), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01030>
- Sharma, A. (2011). Antimicrobial resistance: No action today, no cure tomorrow. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 29(2), 91–92. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.81774>
- Shrestha, P., Cooper, B. S., Coast, J., Oppong, R., Do Thi Thuy, N., Phodha, T., Celhay, O., Guerin, P. J., Wertheim, H., & Lubell, Y. (2018). Enumerating the economic cost of antimicrobial resistance per antibiotic consumed to inform the evaluation of interventions affecting their use. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0384-3>
- Smith, A. C., & Hussey, M. A. (2005). Gram stain protocols. *American Society for Microbiology*, 1(September 2005), 14.
- So, A. D., Gupta, N., Brahmachari, S. K., Chopra, I., Munos, B., Nathan, C., Outtersson, K., Paccaud, J. P., Payne, D. J., Peeling, R. W., Spigelman, M., & Weigelt, J. (2011). Towards new business models for R&D for novel antibiotics. *Drug Resistance Updates*, 14(2), 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2011.01.006>
- Soto-Estrada, G., Moreno-Altamirano, L., Pahua Díaz, D., Soto-Estrada, G., Moreno-Altamirano, L., & Pahua Díaz, D. (2016). Epidemiological overview of Mexico's leading causes of morbidity and mortality. *Revista de La Facultad de Medicina (México)*, 59(6), 8–22. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0026-17422016000600008](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0026-17422016000600008)
- Spellberg, B., Guidos, R., Gilbert, D., Bradley, J., Boucher, H. W., Scheld, W. M., Bartlett, J. G., & Edwards, J. (2008). The Epidemic of Antibiotic-Resistant Infections: A Call to Action for the Medical Community from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 46(2), 155–164. <https://doi.org/10.1086/524891>
- Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Infection Control*, 34(5 SUPPL.). <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2006.05.219>
- Toral, L., Rodríguez, M., Béjar, V., & Sampedro, I. (2018). Antifungal activity of lipopeptides from *Bacillus* XT1 CECT 8661 against *Botrytis cinerea*. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUN), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01315>
- Tortorella, E., Tedesco, P., Esposito, F. P., January, G. G., Fani, R., Jaspars, M., & De Pascale, D. (2018). Antibiotics from deep-sea microorganisms: Current discoveries and perspectives. *Marine Drugs*, 16(10), 1–16. <https://doi.org/10.3390/md16100355>
- Trenozhnikova, L., & Azizan, A. (2018). Discovery of Actinomycetes from Extreme Environments with Potential to Produce Novel Antibiotics. *Central Asian Journal of Global Health*, 7(1). <https://doi.org/10.5195/cajgh.2018.337>
- van Teeseling, M. C. F., de Pedro, M. A., & Cava, F. (2017). Determinants of bacterial

- morphology: From fundamentals to possibilities for antimicrobial targeting. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUL), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01264>
- Veterinarians, E. Q. (2012). *Antimicrobial resistance Antimicrobial resistance*. May, 2012–2013. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Viesser, J. A., Sugai-Guerios, M. H., Malucelli, L. C., Pincerati, M. R., Karp, S. G., & Maranhão, L. T. (2020). Petroleum-Tolerant Rhizospheric Bacteria: Isolation, Characterization and Bioremediation Potential. *Scientific Reports*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59029-9>
- WHO. (2017). Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) Report. In *Who*. <https://doi.org/ISBN 978-92-4-151344-9>
- Wijman, J. G. E., De Leeuw, P. P. L. A., Moezelaar, R., Zwietering, M. H., & Abee, T. (2007). Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: Formation, sporulation, and dispersion. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(5), 1481–1488. <https://doi.org/10.1128/AEM.01781-06>
- Wohlleben, W., Mast, Y., Stegmann, E., & Ziemert, N. (2016). Antibiotic drug discovery. *Microbial Biotechnology*, 9(5), 541–548. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12388>
- World Health Organization. (2014). *WHO | The top 10 causes of death*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
- Young, K. D. (2007). Bacterial morphology: why have different shapes? *Current Opinion in Microbiology*, 10(6), 596–600. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.09.009>
- Yuliani, H., Perdani, M. S., Savitri, I., Manurung, M., Sahlan, M., Wijanarko, A., & Hermansyah, H. (2018). Antimicrobial activity of biosurfactant derived from *Bacillus subtilis* C19. *Energy Procedia*, 153(January 2019), 274–278. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2018.10.043>
- Yun, J. H., Cho, D. H., Lee, B., Kim, H. S., & Chang, Y. K. (2018). Application of biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9 for controlling cladoceran grazers in algal cultivation systems. *Scientific Reports*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23535-8>
- Zapun, A., Contreras-Martel, C., & Vernet, T. (2008). Penicillin-binding proteins and  $\beta$ -lactam resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), 361–385. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00095.x>
- Zhou, S., Liu, G., Zheng, R., Sun, C., & Wu, S. (2020). Structural and functional insights of iturin W, a novel lipopeptide produced by the deep-sea bacterium *Bacillus* sp. wsm-1. *Applied and Environmental Microbiology*, August. <https://doi.org/10.1128/aem.01597-20>

Martinez - Miranda, R., Estrada - Guzman, J., Ayala - Figueroa, R., Arauz - Cabrera, J., Soria - Rodriguez, C. and Delgadillo - Valles, R. (2019). *Identificación del perfil de resistencia y betalactamasas de espectro extendido en cepas uropatógenas de infecciones adquiridas en la comunidad e intrahospitalarias*. [online] Revista-portalesmedicos.com. Available at: <https://www.revista-portalesmedicos.com/revista-medica/identificacion-del-perfil-de-resistencia-y-betalactamasas-de-espectro-extendido-en-cepas-uropatogenas-de-infecciones-adquiridas-en-la-comunidad-e-intrahospitalarias/>