



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas

Posgrado en Microbiología

**Análisis del potencial antimicrobiano de compuestos producidos
por *Bacillus velezensis* LEM1054 contra *Staphylococcus* spp.
multidrogorresistentes.**

Tesis

Que para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias (Microbiología) con opción en Bioquímica y
Genética Microbiana.

Presenta:

Biol. Jearim Betzai Tapia Rivera

Director:

D.C. José Antonio Munive Hernández

Co- Directora:

D.C. Verónica Liliana Ramírez Falcón



Abril 2024



BUAP

Puebla, Pue. a 12 de abril 2024.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CIOM-ICUAP
PRESENTE.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de tesis de maestría de la alumna **Jearim Betzai Tapia Rivera**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

"Análisis del potencial antimicrobiano de compuestos producidos por *Bacillus velezensis* LEM1054 contra *Staphylococcus* spp. multirresistentes"

A nuestro juicio, la alumna **Jearim Betzai Tapia Rivera** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente,
"Pensar Bien Para Vivir Mejor"

D.C. Antonino Baez Rogelio

D.C. Verónica Quintero Hernández



D.C. Jesús Muñoz Rojas

D.C. María del Rocio Bustillos Cristales

Posgrado en Ciencias Microbiológicas
Instituto de Ciencias (ICUNP)

Edificio 1011,
Ciudad Universitaria
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 725 00
01 (222) 227 55 01 Ext. 2502
posgrado.mic@buap.mx

AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente a mi Director de tesis el Dr. José Antonio Munive y a mi Co-directora la Dra. Verónica Ramírez por haberme permitido ser parte de su equipo de trabajo, por su apoyo y todo lo brindado para llevar a cabo esta tesis.

Al Dr. Antonino Báez, a la Dra. Verónica Quintero, a la Dra. Rocio Bustillos y al Dr. Jesús Muñoz por formar parte de mi comité tutorial y por sus aportaciones para este trabajo.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y al Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas por abrirme nuevamente sus puertas para poder seguir creciendo profesional y académicamente.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios de Maestría.

Agradezco a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis dentro del Eje IV. Modelo de Investigación abierta y compartida. Objetivo 13. Formar recursos humanos que impacten positivamente el contexto social y científico como consecuencia de su accionar en una comunidad para lograr una educación desarrolladora de la transformación. Indicador establecido en el Plan de Desarrollo Institucional 2021-2025.

Agradezco a mis padres y hermanos por estar para mi en todo momento y ser mi motivación para seguir adelante.

Finalmente agradezco a mis amigos y compañeros por motivarme y apoyarme durante este trayecto.

A mi Madre, por su apoyo incondicional y por creer siempre en mí.

A quienes me inspiran y me han ayudado a llegar hasta donde he llegado.

ÍNDICE

CONTENIDO

1.	RESUMEN	1
2.	INTRODUCCIÓN	2
2.1	Resistencia a los antimicrobianos.....	2
2.2	<i>Staphylococcus spp.</i>	3
2.3	Género <i>Bacillus</i>	4
2.3.1	<i>Bacillus velezensis</i>	5
2.3.2	<i>Bacillus velezensis</i> LEM1054.....	5
2.3.3	Producción de antimicrobianos por <i>Bacillus velezensis</i>	5
3.	ANTECEDENTES	8
4.	JUSTIFICACIÓN.....	9
5.	HIPÓTESIS.....	9
6.	OBJETIVO GENERAL.....	9
7.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
8.	MATERIAL Y MÉTODOS	10
8.1	Aislados clínicos	10
8.2	Cepa de <i>Bacillus</i>.....	10
8.3	Prueba de sensibilidad a los antibióticos convencionales	11
8.4	Extracción de compuestos producidos por <i>Bacillus velezensis</i> LEM1054	13
8.5	Actividad Inhibitoria de los compuestos obtenidos sobre las cepas multidrogorresistentes.....	13
8.6	Análisis filogenético de los genes codificantes de los posibles metabolitos responsables de la inhibición.....	14
9.	RESULTADOS	15
9.1	Corroborar la multidrogorresistencia de las cepas de <i>Staphylococcus spp.</i>	15
9.2	Extracción de compuestos producidos por <i>Bacillus velezensis</i> LEM1054.	18
9.1	Determinación de la actividad inhibitoria sobre las cepas multidrogorresistentes. ...	20
9.2	Análisis filogenético de los genes <i>srfA</i>, <i>dfnD</i>, <i>baeR</i> y <i>mInA</i>.	22
10.	DISCUSIÓN.....	26
11.	CONCLUSIONES	29
12.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
13.	ANEXOS	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. aisladas de hemocultivos de pacientes en UCI.....	10
Tabla 2. Rangos de corte por el método de multidiscos para bacterias Gram +.....	12
Tabla 3. Resultados de los antibiogramas para corroborar la multirresistencia de las cepas de <i>Staphylococcus</i>	16
Tabla 4. Medidas de los halos de inhibición de las cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. frente al extracto.	20

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Antibiogramas de las cepas de <i>Staphylococcus</i>	17
Figura 2. Imágenes de los ensayos realizados con el extracto obtenido con benceno.....	18
Figura 3. Imágenes de los ensayos realizados con el extracto obtenido con cloroformo.....	19
Figura 4. Actividad antimicrobiana del extracto obtenido con éter dietílico.....	21
Figura 5. Análisis filogenético molecular por el método de Neighbor-Joining, basado en secuencias del gen <i>srfA</i>	22
Fig.6. Análisis filogenético molecular por el método de Neighbor-Joining, basado en secuencias del gen <i>dfnD</i>	23
Figura 7. Análisis filogenético molecular por el método de Neighbor-Joining, basado en secuencias del gen <i>baeR</i>	24
Figura 8. Análisis filogenético molecular por el método de Neighbor-Joining, basado en secuencias del gen <i>mInA</i>	25

1. RESUMEN

Uno de los mayores retos de la medicina moderna es la resistencia a los antimicrobianos, la cual es provocada por el uso excesivo de estos agentes. El débil control de su uso ha propiciado que en la naturaleza se distribuyan organismos resistentes a los antimicrobianos de primera elección. Uno de los patógenos del cual se ha descrito una alta incidencia en infecciones nosocomiales, es considerado como multirresistente de mal pronóstico en pacientes inmunodeprimidos e inmunosuprimidos y se caracteriza por ser la principal causa de bacteriemia nosocomial en el mundo es *Staphylococcus aureus*, a su vez otros de los microorganismos que han tomado protagonismo por su resistencia a múltiples antimicrobianos son los coagulasa negativa tales como: *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus haemolyticus*. Dado este problema y a que el desarrollo de nuevos antibióticos se encuentra estancado y es insuficiente para hacer frente a la creciente amenaza de la resistencia microbiana, es necesaria la búsqueda de nuevos compuestos con actividad biológica capaces de inhibir el crecimiento de estos microorganismos, por tal motivo en este trabajo se probó la actividad de compuestos extraídos con éter dietílico de la cepa *Bacillus velezensis* LEM1054 sobre cepas de *Staphylococcus* spp. multidrogorresistentes provenientes de pacientes en UCI. Encontrando que el extracto obtenido mostró actividad inhibitoria frente a las seis cepas de *Staphylococcus aureus* y a la cepa de *Staphylococcus epidermidis* utilizadas en este trabajo. Esto indica la presencia de compuestos capaces de impedir el crecimiento de estos microorganismos, sin embargo, es necesario aislar e identificar el o los metabolitos presentes en el extracto, además de optimizar el método de extracción para obtener la mayor cantidad de metabolitos posibles, para continuar con la posible aplicación de estos.

2. INTRODUCCIÓN

Uno de los avances más importantes en la historia de la Medicina fue el descubrimiento y desarrollo de los antibióticos, gracias a este descubrimiento, muchas de las enfermedades potencialmente mortales, pasaron a ser un problema secundario. Durante las décadas siguientes al descubrimiento de la penicilina el ritmo en el descubrimiento y desarrollo de nuevas familias de antibióticos fue muy rápido, sin embargo, este ritmo se ha detenido, lo que supone un problema importante ya que el uso indiscriminado de estas sustancias no tardó en mostrar sus consecuencias y comenzaron a aparecer bacterias resistentes a los antibióticos, tanto que durante los últimos años se ha observado un aumento en la incidencia de infecciones causadas por bacterias multidrogorresistentes (MDR), debido a esto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha declarado a la resistencia a los antimicrobianos dentro de las diez principales amenazas de salud pública a las que se enfrenta la humanidad (Torres Manrique, 2012; Velázquez-Acosta, Cornejo-Juárez, Volkow-Fernández, 2018; Pieras , 2019; OMS, 2021).

2.1 Resistencia a los antimicrobianos

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) se produce cuando los microorganismos pueden adaptarse y crecer en presencia de medicamentos que alguna vez los impactaron (Fonou, 2017). Entre los principales factores que la promueven se encuentra el uso indebido y excesivo de estos agentes, la falta de acceso a agua limpia, saneamiento e higiene, medidas deficientes de prevención y control de las enfermedades e infecciones en los centros de atención de salud, el acceso deficiente a medicamentos, vacunas y medios de diagnóstico asequibles y de calidad, la falta de sensibilización y conocimiento; y el incumplimiento de la legislación (OMS,2019).

Actualmente a nivel mundial mueren al menos 700,000 personas cada año debido a enfermedades provocadas por organismos resistentes a los medicamentos (OMS,2021), mismos que la OMS con base en algunos criterios como las tasas de morbi-mortalidad para los agentes en específico, el tipo de antibióticos ante los cuales se ha generado resistencia, las alternativas terapéuticas aún viables para

su manejo y su prevalencia en hospitales, enlista por el grado de complejidad; como prioridad crítica a *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y al grupo *Enterobacteriaceae*, ya que estos han demostrado tener una alta prevalencia en los entornos hospitalarios, especialmente en áreas de cuidados críticos y su control se ha complicado debido a la elevada tasa de resistencia al uso de agentes como los carbapenémicos o las cefalosporinas de tercera generación, medicamentos generalmente reservados como última línea terapéutica. Como prioridad alta, considera a *Enterococcus faecium*, resistente a vancomicina; *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, con sensibilidad intermedia y resistencia a vancomicina; *Helicobacter pylori*, resistente a claritromicina; *Campylobacter* spp., resistente a fluoroquinolonas; *Salmonellae*, resistente a fluoroquinolonas; *Neisseria gonorrhoeae*, resistente a cefalosporinas y resistente a fluoroquinolonas y como prioridad media a *Streptococcus pneumoniae*, sin sensibilidad a penicilina; *Haemophilus influenzae*, resistente a ampicilina y *Shigella* spp., resistente a fluoroquinolonas (OMS, 2017).

2.2 *Staphylococcus* spp.

Uno de los primeros microorganismos en poner de manifiesto la resistencia a los antimicrobianos fue *Staphylococcus aureus*, el cual se caracteriza por ser la principal causa de bacteriemia nosocomial a nivel mundial debido al incremento en su resistencia, a su vez, es considerado como multidrogorresistente de mal pronóstico en pacientes inmunodeprimidos e inmunosuprimidos (desnutrición, trauma, edad y enfermedades crónico-degenerativas como la diabetes), esto dado por la intervención de sus distintos factores de virulencia y patogenicidad (Tong *et.al.*, 2015; Hiramatsu *et.al.*, 2014; Pasachova *et.al.*, 2019). Otros de los microorganismos involucrados en la patología humana son los *Staphylococcus* coagulasa negativa (SCN), tales como: *Staphylococcus apidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* y *Staphylococcus saprophyticus* que en conjunto alcanzan hasta un 80% de los casos. Sin embargo, su significado clínico en muchas situaciones es difícil de establecer, ya que pueden ser comensales inofensivos o patógenos invasores. Los SCN aislados de infecciones nosocomiales, en especial *S.epidermidis* y *S. haemolyticus*, son resistentes a

múltiples antimicrobianos y han tomado protagonismo como patógenos ya que se les ha asociado con el progreso de la tecnología médica (Kloos & Bannerman, 1994; TanT, *et.al.*,2006; Predari, 2007). En 2022 la Organización Mundial de la Salud declaró que el desarrollo de nuevos antibióticos se encuentra estancado y es insuficiente para hacer frente a la creciente amenaza de la resistencia microbiana. Nuestra propuesta, debido a su habilidad para producir compuestos con propiedades antimicrobianas, son los compuestos producidos por las especies del género *Bacillus*, ya que han demostrado tener un efecto antagónico en contra de diversos microorganismos.

2.3 Género *Bacillus*

El género *Bacillus* fue reportado por primera vez por Cohn en 1872, quien lo describió como bacterias productoras de endosporas resistentes al calor (Maughan y van der Auwera, 2011). Las especies de *Bacillus* se encuentran ampliamente distribuidas debido a su habilidad para formar endosporas, característica que les confiere resistencia y potencia su aislamiento en diversos hábitats, tanto ecosistemas acuáticos como terrestres, e incluso en ambientes bajo condiciones extremas. Sin embargo, el suelo es considerado el principal reservorio de este género bacteriano, debido a que la mayoría de las especies de *Bacillus* son saprófitas pudiendo utilizar la gran diversidad de sustratos orgánicos presentes en el suelo, siendo ésta una matriz compleja para el establecimiento de una gran diversidad genética y funcional de especies microbianas (Villarreal-Delgado *et.al.*, 2018). Entre las características del género *Bacillus* destaca su crecimiento aerobio o en ocasiones anaerobio facultativo, son Gram positivas de morfología bacilar con movilidad flagelar y tamaño variable (0.5 a 10 µm), su crecimiento óptimo ocurre a pH neutro, presentando un amplio intervalo de temperaturas de crecimiento, aunque la mayoría de las especies son mesófilas (temperatura entre 30 y 45 °C), su diversidad metabólica asociada a la promoción del crecimiento vegetal y control de patógenos además destaca su capacidad de producir endosporas (ovales o cilíndricas) como mecanismo de resistencia a diversos tipos de estrés. Una de las características más relevantes de este género

es que las especies que lo conforman son productoras de compuestos que presentan una amplia gama de actividad antimicrobiana.

2.3.1 *Bacillus velezensis*

Una de las cepas más estudiadas es *Bacillus subtilis* debido a su capacidad de producir metabolitos secundarios, sin embargo, se ha informado que el arsenal biosintético de *Bacillus velezensis* es más potente y diverso que el de *B. subtilis* (Fazle & Baek, 2020). *Bacillus velezensis* fue identificada por primera vez en 2005 por Ruiz-García y colaboradores, mediante el aislamiento de nuevas especies de *Bacillus* a partir de muestras ambientales del río Velez en Málaga, España. Son bacterias Gram positivas que se presentan tanto individualmente como en pares y ocasionalmente en cadenas cortas. Las endosporas son elipsoidales y se encuentran en posiciones paracentrales o subterminales en los esporangios, son móviles gracias a flagelos peritricos. Crecen dentro del rango de temperatura de 15 a 45 °C y a valores de pH de entre 5 y 10. Su metabolismo es respiratorio, con oxígeno como aceptor final de electrones. No crecen en anaerobiosis en presencia de nitrato o fumarato (Ruiz-García *et al.*, 2005). Se ha reportado que alrededor del 10 % del genoma se dedica a sintetizar metabolitos bioactivos (Hamley, 2015; Baharudin *et al.*, 2021).

2.3.2 *Bacillus velezensis* LEM1054

Bacillus velezensis LEM1054 fue aislada de *Prosopis laevigata* en una región semiárida de Puebla contaminada con metales pesados (Ramírez *et al.*, 2019). Se ha reportado que esta cepa tiene capacidad de inhibir el desarrollo de hongos fitopatógenos, demostrando su efecto sobre *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium oxysporum* y *Alternaria alternata* (Palomino G., 2023).

2.3.3 Producción de antimicrobianos por *Bacillus velezensis*

Esta bacteria puede producir sustancias antimicrobianas de distinta naturaleza como péptidos de síntesis ribosomal, policétidos (PK) y pequeñas moléculas peptídicas de síntesis no ribosomal (NRPs) (Fickers *et al.*, 2012). Los péptidos de síntesis ribosomal están ampliamente distribuidos en la naturaleza y se caracterizan por poseer una longitud entre 12 y 50 aminoácidos, generando

moléculas que son de carácter catiónico principalmente. Tienen gran diversidad y son comúnmente conocidas como bacteriocinas, las cuales pueden clasificarse de acuerdo con su estructura química, estabilidad térmica, presencia de aminoácidos modificados y su modo de acción (Fickers *et.al.*, 2012; Summi *et.al.*, 2015).

Los policétidos son una familia muy diversa de productos naturales que son biosintetizados mediante repetidas condensaciones de descarboxilación de Claisen (polimerización de subunidades acetilo y propionilo) entre la unidad extensora y la cadena de policétidos creciente (Summi *et.al.*, 2015). Se han identificado tres grupos de genes que dirigen la síntesis de policétidos, tal como macrolactina (*mln*), bacilaeno (*bae*) y difidina (*dfn*) (Chen *et.al.*, 2006; Chen *et.al.*, 2009). Estos compuestos exhiben actividades antibacterianas a través de la inhibición de la síntesis de proteínas. El bacilaeno exhibe actividad antimicrobiana contra varias bacterias y hongos (Patel *et.al.*, 1995; Um *et.al.*, 2013; Müller *et.al.*, 2014). La difidina inhibe patógenos bacterianos y finalmente la macrolactina muestra actividad antibacteriana, antifúngica y antiviral.

En cuanto a los NRPs o lipopéptidos, estos han recibido una atención considerable debido a su diversidad estructural y funcional con respecto al tamaño, el espectro de actividad antimicrobiana con bajo nivel de resistencia y baja toxicidad (Ongena y Jacques 2008; Malfanova *et. al.*, 2012; Kulimushi *et.al.* 2017). Los lipopéptidos son compuestos cíclicos o lineales, sintetizados a partir de complejos multienzimáticos largos (Akpa *et.al.*, 2001; Martínez-Núñez y López, 2016), son anfipáticos con un oligopéptido hidrofílico (con aminoácidos L y D) unido a una cadena hidrofóbica de ácidos grasos (Zhao *et.al.*, 2016). La secuencia de aminoácidos del oligopéptido clasifica a los lipopéptidos en las familias de las Iturinas, fengicinas y surfactinas (Ongena & Jacques, 2008). Debido a sus características anfipáticas, su mecanismo de acción se basa en su interacción con la membrana celular, formación de poros y canales iónicos en las membranas de la bicapa lipídica (Deleu *et.al.*, 2005).

Las iturinas consisten en heptapéptidos unidos a una cadena de ácido graso β -amino que tiene entre 14 y 17 carbonos de longitud, causan perturbaciones osmóticas al formar poros conductores de iones que resultan en la fuga de K^+ y otros iones vitales. Estas han demostrado una fuerte actividad antifúngica contra una amplia variedad de hongos, con actividad antibacteriana limitada y ninguna actividad antiviral (Yao *et.al.*, 2003; Ongena & Jaques, 2008; Grover *et.al.*, 2010). La familia de las fengicinas comprende decapéptidos que contienen un ácido graso β -hidroxi con una longitud de cadena lateral de 16 a 19 átomos de carbono (Koumoutsi *et.al.*, 2004; Romero *et.al.*, 2007; Alvarez *et.al.*, 2012; Fan *et.al.*, 2017). Al interactuar con las moléculas de esterol y fosfolípidos tienen la capacidad de alterar la permeabilidad de las membranas celulares de los hongos (Deleu, 2005) y son específicamente activas contra hongos filamentosos (Koumoutsi *et.al.*, 2004; Falardeau *et. al.*, 2013; Tang *et. al.* 2014).

Las surfactinas son heptapéptidos interconectados con una cadena de ácido graso β -hidroxi, son potentes biosurfactantes con excepcionales actividades emulsionantes, espumantes y antivirales, pero sin actividad antifúngica aparente. Existen tres formas distintas de surfactina (A, B y C) que se clasifican según las variaciones en la secuencia de aminoácidos. Se sintetizan mediante una interacción compleja de NRPS codificados por el operón *surfA* (Nakano, 1991). La surfactina ejerce sus efectos celulares alterando la integridad de la membrana (Bernheimer & Avigad, 1970; Zeriuoh *et.al.*, 2011).

Aunque la mayor parte de la literatura reporta lipopéptidos de *B. velezensis* por su actividad antifúngica, para actividad antibacteriana, especialmente contra patógenos humanos, es relativamente escasa (Palazzini *et.al.* 2016; Li *et.al.*, 2020; Ye *et.al.* 2018; Grady *et.al.* 2019).

3. ANTECEDENTES

En un estudio realizado por Baharudin y colaboradores en 2021, los resultados indicaron que un compuesto antimicrobiano producido por la cepa PD9 de *Bacillus velezensis* podría usarse como un agente terapéutico universal contra diferentes cepas de MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina). Además, las cepas de *Bacillus velezensis* mostraron actividad antimicrobiana contra varias bacterias Gram positivas y Gram negativas.

En otro estudio realizado por Nam y colaboradores identificaron que el principal compuesto antiestafilocócico de *B. velezensis* NST6 es un lipopéptido cíclico, C15-bacilomicina D, que demostró su potencial para tratar cepas de *Staphylococcus* en experimentos in vitro e in vivo con un nivel insignificante de toxicidad (Nam J, *et. al.*, 2020).

Por último, Barale y colaboradores en 2022, aislaron surfactina de la cepa de *Bacillus velezensis* SK, la cual exhibió buena actividad antimicrobiana (1600 AU/ml) contra *Bacillus cereus* resistente a los medicamentos y *Staphylococcus aureus*, lo que sugiere que podría usarse en diversas aplicaciones alimentarias y biomédicas.

4. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de nuevas terapias antimicrobianas eficaces en la inhibición de bacterias patógenas multidrogorresistentes a las terapias antimicrobianas habituales, mediante el empleo de nuevos compuestos, resulta indispensable. Los compuestos antimicrobianos producidos por cepas del género *Bacillus*, han mostrado tener un efecto antagónico en contra de hongos fitopatógenos y algunas bacterias, por tal razón es una excelente alternativa que debe ser explorada como compuestos antimicrobianos en contra de cepas bacterianas de importancia clínica identificadas como multidrogorresistentes, permitiendo así contar con una alternativa para el tratamiento de las infecciones generadas por este tipo de microorganismos.

5. HIPÓTESIS

Los compuestos antimicrobianos producidos por la cepa de *Bacillus velezensis* LEM1054, tendrán efecto antagónico en contra de cepas de *Staphylococcus* spp. multidrogorresistentes.

6. OBJETIVO GENERAL

Analizar el potencial antimicrobiano de compuestos producidos por *Bacillus velezensis* LEM1054 contra cepas de *Staphylococcus* spp. multidrogorresistentes.

7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Corroborar la multidrogorresistencia de las cepas de *Staphylococcus* spp.
2. Realizar la extracción de compuestos producidos por *Bacillus velezensis* LEM1054.
3. Determinar si los compuestos obtenidos muestran actividad inhibitoria sobre las cepas multidrogorresistentes.
4. Analizar filogenéticamente los genes codificantes de los posibles metabolitos responsables de la inhibición.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Aislados clínicos

Los aislados clínicos fueron proporcionados por el Dr. José Arturo Cortes Díaz del Hospital de Traumatología y Ortopedia Dr. Rafael Moreno Valle del estado de Puebla y por la Dra. Rosa del Carmen Rocha-Gracia del laboratorio de Interacción microorganismo-hospedero del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas-BUAP (Tabla 1).

Tabla 1. Cepas de *Staphylococcus* spp. aisladas de hemocultivos de pacientes en UCI.

Cepa	Género/ especie
ATCC 25923	<i>Staphylococcus aureus</i> (cepa control)
Sac1	<i>Staphylococcus aureus</i>
Sac2	<i>Staphylococcus aureus</i>
Sac5	<i>Staphylococcus aureus</i>
LEMST12	<i>Staphylococcus aureus</i>
LEMST13	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LEMST28	<i>Staphylococcus aureus</i>

8.2 Cepa de *Bacillus*

La cepa de *Bacillus velezensis* LEM1054 fue tomada de la colección perteneciente al laboratorio de Ecología Molecular Microbiana del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas CICM del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, la cual, en trabajos previos, fue aislada de nódulos de *Prosopis laevigata* en una zona con concentraciones elevadas de metales pesados e identificada mediante análisis de secuencias de los genes ARNr1 6S y *rpoB* (Ramírez *et al.*, 2019; Chumacero ,2019).

8.3 Prueba de sensibilidad a los antibióticos convencionales

Para corroborar la resistencia a los antibióticos se tomó como referencia la prueba Kirby Bauer y se realizaron tres ensayos independientes con las 7 cepas de *Staphylococcus* spp.

Estos consistieron en que a partir de un cultivo fresco de *Staphylococcus* spp. en medio LB de 24 horas de crecimiento, se ajustó un inóculo hasta obtener una turbidez comparable a la escala 0.5 McFarland, lo que corresponde a una concentración aproximada de 1.5×10^6 UFC /ml.

Por medio de la prueba de difusión en placa se agregaron 100 microlitros del inóculo a una placa de agar Müller Hinton y con ayuda de un asa de Digralsky estéril se extendió, posteriormente con pinzas estériles se colocó el multidisco con los diferentes antibióticos (Tabla 2). Las placas se incubaron a 30°C durante 24 horas, y las medidas de los halos se reportaron a las 24 y 48 horas. La interpretación se realizó de acuerdo con los puntos de corte que indica el proveedor (Abel Gutiérrez y/o Investigación Diagnóstica), como se muestra en la Tabla 2. Como control negativo se utilizó la cepa de referencia de *Staphylococcus aureus* ATCC25923.

Tabla 2. Rangos de corte por el método de multidiscos para bacterias Gram +.

Antibiótico	Díámetro del halo (mm)	
Ampicilina 10 µg	≤28 ≥ 29	Resistente Sensible
Cefalotina 30 µg	≤29 ≥ 37	Resistente Sensible
Cefotaxima 30 µg	≤14 =16-20 ≥ 23	Resistente Intermedia Sensible
Ciprofloxacino 5 µg	≤15 =16-20 ≥ 21	Resistente Intermedia Sensible
Clindamicina 30 µg	≤28 ≥ 34	Resistente Sensible
Dicloxacilina 1 µg	≤18 ≥ 30	Resistente Sensible
Eritromicina 15 µg	≤13 =14-22 ≥ 23	Resistente Intermedia Sensible
Gentamicina 10 µg	≤12 =13-14 ≥15	Resistente Intermedia Sensible
Penicilina 10 U	≤28 ≥ 29	Resistente Sensible
Tetraciclina 30 µg	≤14 =15-18 ≥ 19	Resistente Intermedia Sensible
Sulfa + trime 25 µg	≤10 =11-15 ≥ 16	Resistente Intermedia Sensible
Vancomicina 30 µg	≤14 =15-16 ≥ 17	Resistente Intermedia Sensible

(µg= microgramos; U= Unidades)

8.4 Extracción de compuestos producidos por *Bacillus velezensis* LEM1054

Para realizar la extracción de los compuestos con probable actividad biológica, se realizó un screening con diferentes solventes de naturaleza no polar, cloroformo, benceno y éter dietílico.

Para llevar a cabo este paso, se partió de un cultivo líquido en medio YM de 24 horas de crecimiento de la cepa *Bacillus velezensis* LEM1054 incubado a 30 °C en agitación orbital a 180 rpm durante 24 horas. Posteriormente se centrifugó el tubo a 5000 rpm durante 30 minutos, se decantó el sobrenadante y se desechó el sedimento. Una vez obtenido el sobrenadante, este se mezcló con cada uno de los solventes y se agitó en el vortex durante diez minutos, finalmente se utilizaron las fases orgánicas.

8.5 Actividad Inhibitoria de los compuestos obtenidos sobre las cepas multidrogorresistentes.

Para las pruebas de actividad inhibitoria, se realizó una siembra por extensión en agar Müller Hinton en donde se colocaron 100 microlitros de un cultivo en LB de *Staphylococcus* spp., posteriormente, con ayuda de la parte superior de una punta estéril se realizó un pozo en donde se colocaron 100 microlitros del extracto. Finalmente, las placas se incubaron durante 24 horas a 30 °C y se observó la presencia o ausencia de halos de inhibición. Como controles negativos se utilizaron benceno, cloroformo y éter dietílico.

8.6 Análisis filogenético de los genes codificantes de los posibles metabolitos responsables de la inhibición

Puesto que, en estudios recientes realizados por el equipo de trabajo del Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana, determinaron la presencia de los genes *srfA*, *dfnD*, *baeR* y *mlnA* los cuales codifican para la producción de surfactina, difucidina, bacilaeno y macrolactina respectivamente y posiblemente se encuentren implicados en la actividad antimicrobiana de *Bacillus velezensis*, en este trabajo realizamos el análisis filogenético de estos genes para observar que tanto se encuentran reportados y su distribución en las distintas especies de *Bacillus*. Para llevar a cabo esto, se realizó la búsqueda de las secuencias aminoacídicas de los genes (*srfA*, *dfnD*, *baeR* y *mlnA*) en la base de datos de NCBI (National Center for Biotechnology Information). Se llevó a cabo el alineamiento de las secuencias mediante el programa Clustal X y su edición con el programa BioEdit. Posteriormente, se generaron los árboles por el método de Neighbor-Joining con el programa MEGA11. La confianza de los árboles se obtuvo con 1000 réplicas de Bootstrap.

9. RESULTADOS

9.1 Corroborar la multidrogorresistencia de las cepas de *Staphylococcus* spp.

La finalidad de nuestro primer objetivo fue corroborar que las cepas de *Staphylococcus* spp. fueran multidrogorresistentes. De las cepas probadas, las siete presentaron resistencia a más de tres antibióticos de familias diferentes.

La cepa de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC25923 presentó sensibilidad a los doce antimicrobianos probados.

En el caso de la cepa Sac1 presentó resistencia a seis antibióticos de los doce probados, de los cuales dos pertenecen a la familia de los betalactámicos (ampicilina y penicilina) uno a la familia de las cefalosporinas (cefalotina) uno a la familia de las quinolonas (ciprofloxacino) y a uno a la familia de las lincosamidas (clindamicina).

La cepa Sac2 mostró resistencia a ampicilina, dicloxacilina, cefalotina clindamicina, y tetraciclina, de los cuales los primeros dos pertenecen a la familia de los betalactámicos, seguido de una cefalosporina, lincosamida y tetraciclina respectivamente.

En cuanto a la cepa Sac5 mostró resistencia a ampicilina, dicloxacilina, penicilina cefalotina y clindamicina, de los cuales los primeros tres pertenecen a la familia de los betalactámicos, el siguiente a la familia de las cefalosporinas y el último a la familia de las lincosamidas.

Por último, las cepas LEMST12 y LEMST28 presentaron resistencia a los 12 antibióticos probados y la cepa LEMST13 presentó resistencia a 10 antibióticos y sensibilidad intermedia a dos antibióticos (cefatoxima y ciprofloxacino). En la Tabla 3 se muestra gráficamente la respuesta que tuvieron las cepas frente a los antibióticos probados y en la figura 1 se muestran los antibiogramas realizados para cada cepa.

Tabla 3. Resultados de los antibiogramas para corroborar la multirresistencia de las cepas que se utilizaron para este trabajo.

CEPA	AM ampicilina	CF Cefalotina	CFX cefotaxima	CPF ciprofloxacino	CLM clindamicina	DC dicloxacilina	E eritromicina	GE gentamicina	PE penicilina	TE tetraciclina	SXT Sulfa+trime	VA vancomicina
Sac1	*	*		*	*	*			*			
Sac2	*	*			*	*				*		
Sac5	*	*			*	*			*			
LEMST12	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
LEMST13	*	*	**	**	*	*	*	*	*	*	*	*
LEMST28	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

* Resistencia al antibiótico. ** Sensibilidad intermedia al antibiótico.

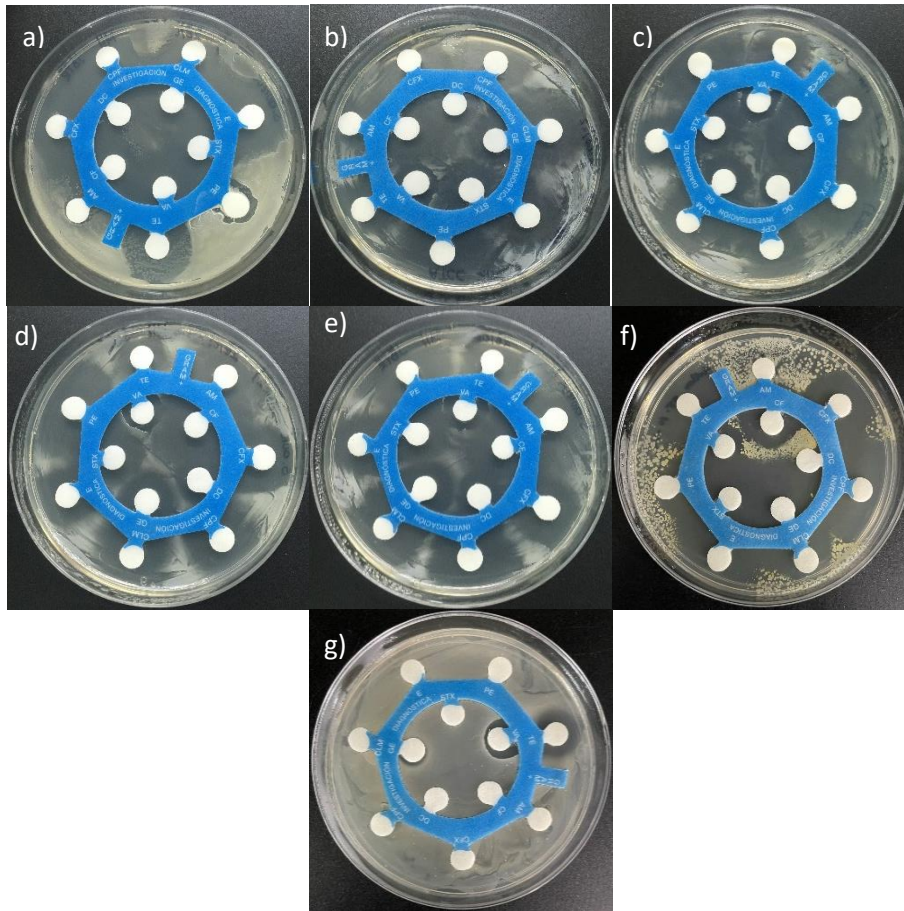


Figura 1. Antibiogramas de las cepas de *Staphylococcus*. a) ATCC25923, b) Sac1, c) Sac2, d) Sac5, e) LEMST12, f) LEMST13, g) LEMST28.

9.2 Extracción de compuestos producidos por *Bacillus velezensis* LEM1054.

De los tres solventes que se probaron para la extracción de los posibles metabolitos con actividad antimicrobiana, el extracto obtenido con benceno (fig.2) y con cloroformo (fig. 3) a diferencia del que se obtuvo con éter dietílico no formaron halos de inhibición. Por esta razón se continuó trabajando con éter dietílico.

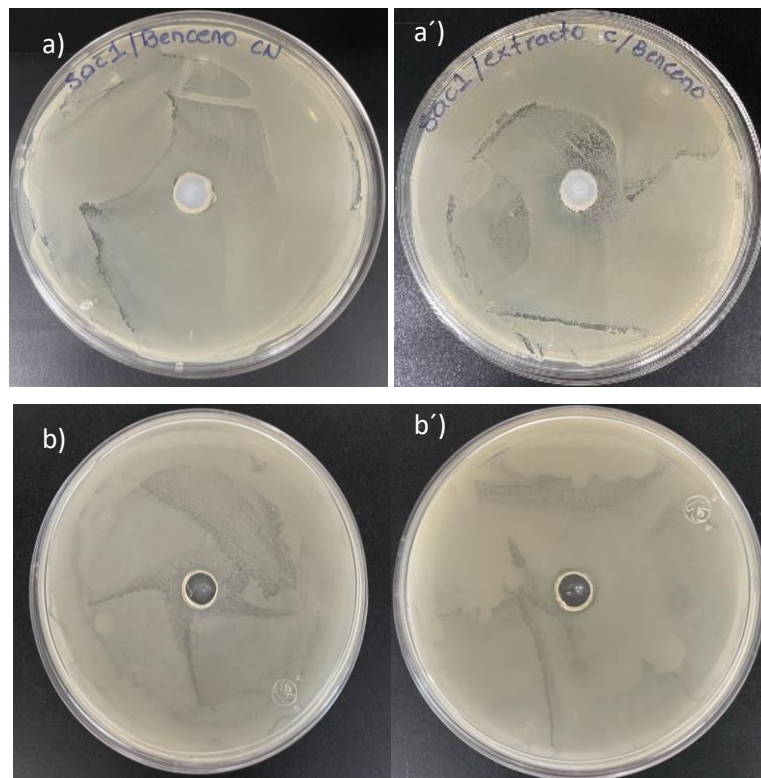


Figura 2. Imágenes de los ensayos realizados con el extracto obtenido con benceno, como control negativo se utilizó benceno. a) control negativo de la cepa Sac1, a') cepa Sac1 con el extracto. b) control negativo de la cepa LEMST12, b') cepa LEMST12 con el extracto.

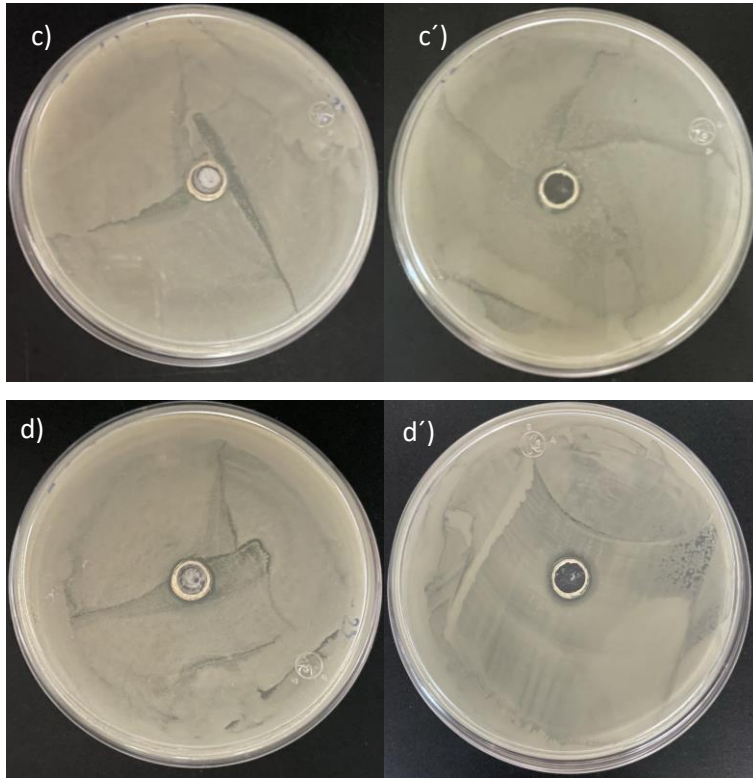


Figura 3. Imágenes de los ensayos realizados con el extracto obtenido con cloroformo, como control negativo se utilizó cloroformo. c) control negativo de la cepa Sac1, c') cepa Sac1 con el extracto. d) control negativo de la cepa LEMST12, d') cepa LEMST12 con el extracto.

9.1 Determinación de la actividad inhibitoria sobre las cepas multidrogorresistentes.

En cuanto a las pruebas realizadas con el extracto obtenido con éter dietílico las cepas que mostraron halos de inhibición de mayor diámetro fueron la ATCC 25923 y la LEMST13, seguido de la cepa LEMST12 (Tabla 4) y en la figura 4 se muestran algunas imágenes de los ensayos realizados con el extracto obtenido con éter dietílico.

Tabla 4. Medidas de los halos de inhibición de las cepas de *Staphylococcus* spp. frente al extracto obtenido con éter dietílico.

Cepa	Diámetro del halo (mm)
ATCC25923	15.4
Sac1	13.3
Sac2	13.3
Sac5	13.1
LEMST12	13.9
LEMST13	14.5
LEMST28	13.2

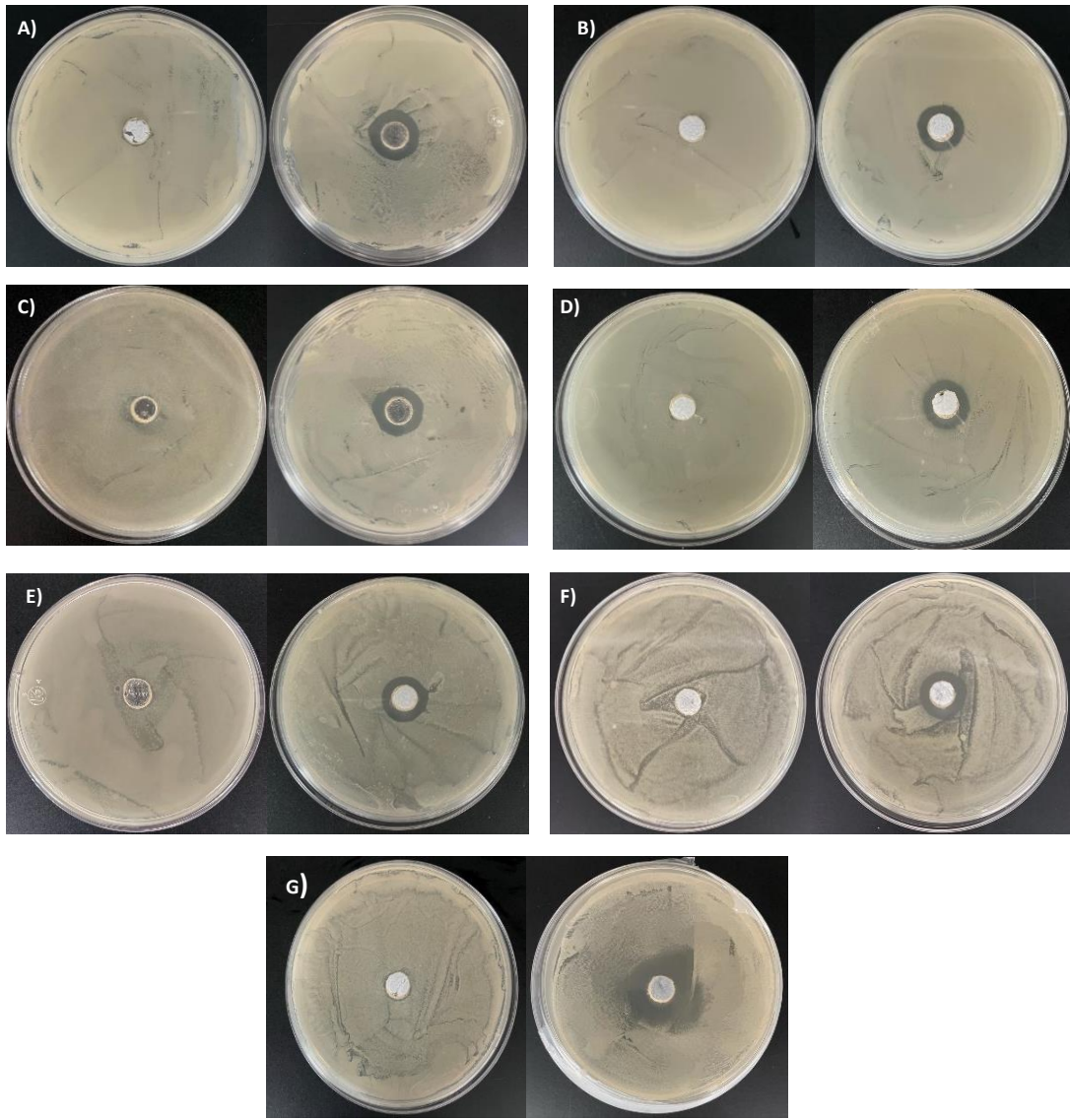


Figura 4. Actividad antimicrobiana del extracto obtenido con éter dietílico, como control negativo se utilizó éter dietílico. Las imágenes de la derecha muestran los controles negativos de cada cepa y a la izquierda en la figura A) cepa ATCC25923, B) cepa Sac1, C) cepa Sac2, D) cepa Sac5, E) cepa LEMST12, F) cepa LEMST13, G) cepa LEMST28.

9.2 Análisis filogenético de los genes *surfA*, *dfnD*, *baeR* y *mlnA*.

Para llevar a cabo el análisis filogenético de cada uno de los genes, se utilizó el método de Neighbor-Joining (Saitou N. & Nei M, 1987). Se muestran los árboles óptimos y el porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba de arranque (1000 réplicas), se muestran junto a las ramas (Felsenstein J., 1985). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de corrección de Poisson (Zuckerlandl E. & Pauling L., 1965) y están en unidades del número de sustituciones de aminoácidos por sitio. Todas las posiciones ambiguas se eliminaron para cada par de secuencias (opción de eliminación por pares). Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA11 (Tamura K., Stecher G.& Kumar S. 2021).

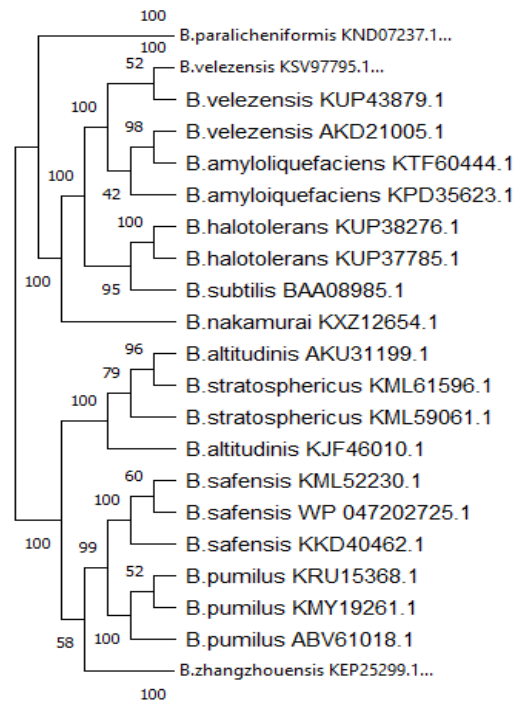


Figura 5. Análisis filogenético molecular por el método de Neighbor-Joining, basado en secuencias del gen *surfA* que codifica para la producción de surfactina, de todas las especies reportadas del género *Bacillus*. El análisis involucró 25 secuencias de aminoácidos y un total de 1542 posiciones en el conjunto de datos final. El árbol reveló la similitud filogenética de los genes de biosíntesis de biosurfactantes de *Bacillus velezensis* con otras especies del género.

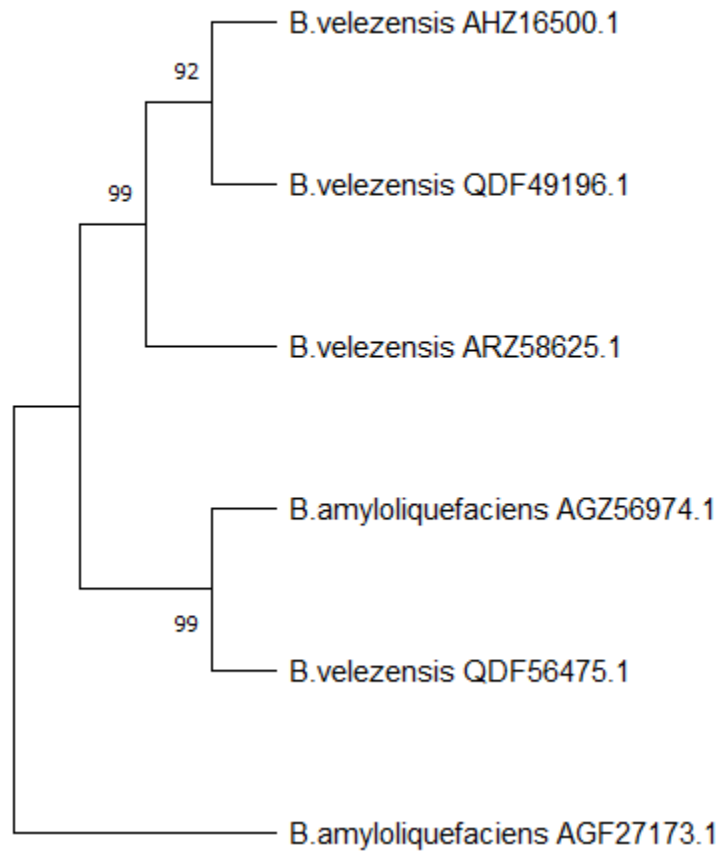


Fig.6. Análisis filogenético molecular por el método de Neighbor-Joining, basado en secuencias del gen *dfnD* que codifica para la producción de difidina, de todas las especies reportadas del género *Bacillus*. El análisis involucró 6 secuencias de aminoácidos. Hubo un total de 4198 posiciones en el conjunto de datos final.

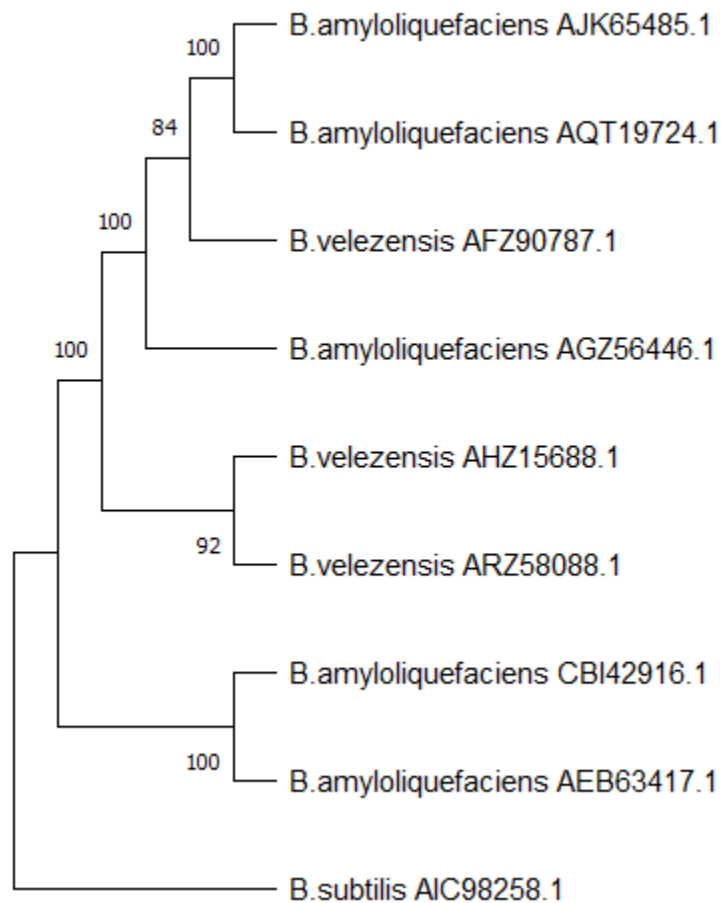


Figura 7. Análisis filogenético molecular por el método de Neighbor-Joining, basado en secuencias del gen *baeR* que codifica para la producción de bacilaeno, de todas las especies reportadas del género *Bacillus*. El análisis involucró 9 secuencias de aminoácidos. Hubo un total de 2559 posiciones en el conjunto de datos final.

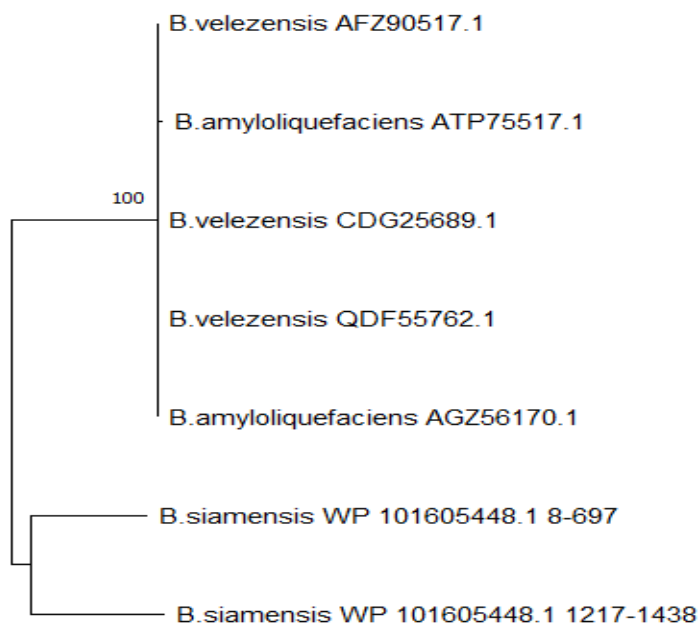


Figura 8. Análisis filogenético molecular por el método de Neighbor-Joining, basado en secuencias del gen *mlnA* que codifica para la producción de macrolactina; de todas las especies reportadas del género *Bacillus*. El análisis reveló la ruta de biosíntesis de este lipopéptido esta evolutivamente conservado en las cepas con respecto a los genes en esta especie. Las cepas reportadas se agruparon en un solo cluster y como grupo externo se agrupó *B. siamensis*. Este análisis involucró 7 secuencias de aminoácidos y hubo un total de 2553 posiciones en el conjunto de datos final.

10. DISCUSIÓN

Las infecciones que produce *Staphylococcus* spp. ocurren regularmente en pacientes hospitalizados y tienen severas consecuencias a pesar de la terapia antimicrobiana. El antibiótico de primera línea en el tratamiento de infecciones graves causadas por *Staphylococcus* durante más de cuatro décadas ha sido la vancomicina, un glucopéptido que inhibe la síntesis de la pared celular por medio de la unión a la terminación D-Ala-Da-Ala del peptidoglicano (van Hal, Fowler, 2013), uno de los problemas relacionados con este antibiótico que causan preocupación y se ha convertido en objeto de diversas investigaciones a nivel mundial, es la emergencia de cepas de *Staphylococcus* con sensibilidad disminuida a la vancomicina (Peterson, 2019). Existen numerosas publicaciones con relación a la resistencia a los antibióticos de *S. aureus*, sin embargo, si se restringe la búsqueda a cepas provenientes de hemocultivos de pacientes recluidos en UCI, la información disponible está mucho más restringida (Castellano-González *et.al.*, 2019). El aumento de las tasas de resistencia a los antibióticos glucopéptidos para microorganismos Gram positivos es un problema importante en las UCI. Tal como podemos observar en nuestro estudio, las cepas *S. aureus* y la correspondiente a *S. epidermidis* provenientes de UCI se mostraron resistentes y con sensibilidad intermedia a vancomicina. Al mismo tiempo se determinó la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas frente a antibióticos de uso común, encontrando que las seis cepas mostraron resistencia a betalactámicos. En la actualidad, más del 90 % de las cepas de *Staphylococcus* spp. han desarrollado resistencia a estos antibióticos, sin embargo, cuando la cepa es sensible, este antibiótico se utiliza de primera línea debido a su buena disponibilidad, bajo costo y baja toxicidad. Otro antibiótico al que fueron resistentes las seis cepas fue a uno perteneciente a la familia de las lincosamidas, lo cual se ha reportado varía ampliamente entre países, instituciones y el tipo de mecanismo de resistencia prevalente en los aislamientos (Janapatla *et. al.*, 2007).

Estos resultados nos permiten tener un acercamiento a la presencia de cepas que amenazan la salud pública y la importancia de contar con alternativas para el tratamiento efectivo de las infecciones producidas por cepas de *Staphylococcus*

multidrogorresistentes y que por supuesto tiendan a desarrollar menor resistencia para alcanzar el éxito clínico (Eliopoulos, 2009; Barton & MacGowan, 2009).

Una de las alternativas para combatir este problema son algunos compuestos producidos por *Bacillus* los cuales se consideran uno de los candidatos a fármacos más prometedores para las próximas décadas, ya que tienen un amplio rango de actividad, toxicidad reducida, el potencial para la producción en masa respetuosa con el medio ambiente y un menor desarrollo de resistencia asociada a su uso (Zhang & Sun, 2018). Uno de los métodos mas empleados para la extracción y purificación de estos compuestos (lipopéptidos), es el uso de solventes orgánicos con diferentes índices de polaridad como cloroformo, acetato de etilo, hexano y éter han sido empleados con este propósito (Biniarz *et al.*, 2016). Por tal razón, en este estudio se realizaron pruebas con tres solventes (benceno, cloroformo y éter dietílico), siendo el extracto obtenido con éter dietílico el que mostró halos de inhibición al probarlo frente a las cepas de *Staphylococcus* multidrogorresistentes, al mismo tiempo no mostrar halos en el control, nos indicó que el solvente por si solo no inhibe el crecimiento de las bacterias. Esto probablemente se debe a que el extracto con éter dietílico tiene una alta actividad emulsionante, tal como lo reporta Gandhimathi y colaboradores.

Este estudio tuvo como principal objetivo determinar si los extractos que se obtuvieron mostraban actividad inhibitoria sobre las cepas de *Staphylococcus*, los compuestos extraídos con éter dietílico de la cepa de *Bacillus velezensis* LEM1054 mostraron actividad inhibitoria exhibiendo halos de inhibición con diámetros semejantes contra las cepas ATCC25923, Sac1, Sac2, Sac5, LEMST12, LEMST28 y LEMST13, de las cuales las primeras seis pertenecen a la especie *aureus* y la última a la especie *epidermidis*. Estos resultados sugieren que existe la presencia de compuestos que impiden el crecimiento de estas bacterias patógenas, y aunque en la literatura se ha reportado que los responsables de la inhibición suelen ser en su mayoría lipopéptidos, tal como lo reportan Nam J y colaboradores en 2020, Baharudin y colaboradores en 2021 y Barale y

colaboradores en 2022, es necesario purificar y aislar el o los componentes responsables de la inhibición.

En el análisis filogenético, se encontró que los genes *srfA*, *dfnD*, *baeR* y *mInA* de *Bacillus velezensis* se encuentran altamente conservados entre cepas y especies del género. El gen más reportado es el *srfA* ya que los biosurfactantes son producidos por gran variedad de especies de este género. En cuanto al gen *dfnD* las secuencias reportadas son pocas, esto se debe a que la especie *Bacillus velezensis* es una de las principales productoras de este metabolito. Del mismo modo para el gen *baeR*, los reportes son pocos dado a que *Bacillus velezensis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus subtilis* son productoras de este metabolito, este gen se encuentra altamente conservado entre las especies del género, aunque *B. subtilis* formo un grupo separado. Por último, el gen que codifica para la producción de macrolactina, las secuencias reportadas mostraron el cien por ciento de homología, como grupo externo se agrupo *B. siamensis*, es conveniente resaltar que la mayoría de las macrolactinas provienen de cepas de *Bacillus*, y si bien poseen una amplia gama de bioactividades, sus mecanismos de acción aún no se encuentran bien definidos (Wu, T., Xiao, F., & Li, W., 2020).

11. CONCLUSIONES

- En este estudio se puede concluir que la cepa *Bacillus velezensis* LEM1054 puede producir compuestos con probable actividad antimicrobiana contra cepas de *Staphylococcus* multidrogasresistentes, sin embargo, es necesario identificar, aislar y caracterizar el o los metabolitos presentes en el extracto para avanzar en la aplicación de estos.
- En cuanto al solvente utilizado es necesaria la búsqueda de un método de extracción mas eficiente para obtener la mayor cantidad de metabolitos posibles.
- Finalmente, con respecto al estudio filogenético, este nos permitió observar que las secuencias reportadas aun son pocas, lo que a su vez indica que la cepa ha sido poco estudiada en cuanto a los genes que codifican para la producción de estos metabolitos y su aplicación frente a bacterias de importancia clínica.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alvarez, F., Castro, M., Principe, A., Borioli, G., Fischer, S., Mori, G. & Jofré, E. (2012), 'The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP218 and ARP23 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease', *J. Appl. Microbiol.* 112(1), 159–174.
2. Akpa E., Jacques P., Wathelet B., *et.al.* (2001). Influence of culture conditions on lipopeptide production by *Bacillus subtilis*. *Appl Biotechnol* 91:551-561. <https://doi.org/10.1385/ABAB:91-93:1-9:551>.
3. Baharudin MMA-a, Ngalamat MS, Mohd Shariff F, Balia Yusof ZN, Karim M, Baharum SN, *et al.* (2021). Antimicrobial activities of *Bacillus velezensis* strains isolated from stingless bee products against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* 16(5): e0251514. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251514>
4. Barale SS, Ghane SG, Sonawane KD. (2022). Purification and characterization of antibacterial surfactin isoforms produced by *Bacillus velezensis* SK. *AMB Express.* 27;12(1):7. doi: 10.1186/s13568-022-01348-3. PMID: 35084596; PMCID: PMC8795249.
5. Barton E, MacGowan A. (2009). Future treatment options for Gram-positive infections--looking ahead. *Clin Microbiol Infect.* 15(S6):17–25. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03055.x>.
6. Bernheimer AW, Avigad LS. (1970). Nature and properties of a cytolytic agent produced by *Bacillus subtilis*. *J Gen Microbiol.* 61: 361–369. 10.1099/00221287-61-3-361
7. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am. J. Clin. Pathol.* 1966, 45: 493.
8. Biniarz, P.; Łukaszewicz, M. and Janek, T. (2016). Screening concepts, characterization and structural analysis of microbial-derived bioactive lipopeptides: a review. *Critical Rev. Biotechnol.* 37(3):393-410. <https://doi.org/10.3109/07388551.2016.11633>

9. Castellano-González, M. J., Franquis-Rodríguez, R. M., Perozo-Mena, A. J., & Sandoval-Castellano, I. V. (2020). Susceptibilidad a meticilina y vancomicina en *Staphylococcus aureus* aislados de hemocultivos. *Kasmera*, 48(1). <https://doi.org/10.5281/zenodo.3712378>
10. Chen X.H., Koumoutsi A., Scholz R., Schneider K., Vater J., Süßmuth R., Piel J., Borriss R. (2009). Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *J. Biotechnol.* 140:27–37. doi: 10.1016/j.jbiotec.2008.10.011.
11. Chen X.-H., Vater J., Piel J., Franke P., Scholz R., Schneider K., Koumoutsi A., Hitzeroth G., Grammel N., Strittmatter A.W., et al. (2006). Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42. *J. Bacteriol.* 188:4024–4036. doi: 10.1128/JB.00052-06.
12. Chumacero M. B. (2019). Diversidad genética y filogenia de bacterias pertenecientes al género *Bacillus* tolerantes a Cromo asociadas al mezquite (*Prosopis laevigata*). [Tesis de Maestría, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla] <https://repositorioinstitucional.buap.mx/items/2ad1d0fc-505e-433f-94b1-b760971358d4>
13. Cohn F. (1872). Untersuchungen Über Bakterien. Beitrage zur Biologie Pflanz. 1:127-1224.
14. Deleu, M., Paquot, M. & Nylander, T. (2005). 'Fengycin interaction with lipid monolayers at the air aqueous interface implications for the effect of fengycin on biological membranas. *J. Colloid Interface Sci.* 283(2), 358–365.
15. Eliopoulos GM. (2009). Microbiology of drugs for treating multiple drug-resistant Gram-positive bacteria. *J Infect* 59: S17–24. [http://dx.doi.org/10.1016/S0163-4453\(09\)60004-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0163-4453(09)60004-9).
16. Falardeau J, Wise C, Novitsky L, Avis TJ. (2013). Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* lipopeptides on plant pathogens. *J Chem Ecol.* 39: 869–878. 10.1007/s10886-013-0319-7

17. Fan B, Blom J, Klenk HP, Borriss R. (2017). *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* form an operational group *B. amyloliquefaciens* within the *B. subtilis* species complex. *Front Microbiol.* 8: 22 10.3389/fmicb.2017.00022
18. Fazle Rabbee M, Baek K-H. (2020). Antimicrobial activities of Lipopeptides and Polyketides of *Bacillus velezensis* for Agricultural Applications *Molecules.* 25(21):4973. <https://doi.org/10.3390/molecules25214973>
19. Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
20. Fickers P. (2012). Antibiotic compounds from *Bacillus*: Why are they so Amazing *Am J Biochem Biochnol.* 8(1):38-43. Doi: <https://doi.org/10.3844/ajbbbsp.2012.38.43>
21. Founou RC, Founou LL, Essack SY. (2017). Clinical and economic impact of antibiotic resistance in developing countries: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.*12: e0189621. doi:10.1371/journal.pone.0189621
22. Gandhimathi, R., Seghal Kiran, G., Hema, T. A., Selvin, J., Rajeetha Raviji, T., & Shanmughapriya, S. (2009). *Production and characterization of lipopeptide biosurfactant by a sponge-associated marine.*
23. Grady EN, Macdonald J, Ho MT, Weselowski B, Mcdowell T, Solomon O, Renaud J, Yuan ZC (2019). Characterization and complete genome analysis of the surfactin-producing, plant-protecting bacterium *Bacillus velezensis*. *BMC Microbiol.* 9D–6:1–14.
24. Grover M, Nain L, Singh SB, Saxena AK. (2010). Molecular and biochemical approaches for characterization of antifungal trait of a potent biocontrol agent *Bacillus subtilis* RP24. *Curr Microbiol.* 60: 99–106. 10.1007/s00284-009-9508-6
25. Hamley IW. (2015). Lipopeptides: from self-assembly to bioactivity. *Chem Commun.* 51:8574–83.
26. Hiramatsu, K., Katayama, Y., Matsuo, M., Sasaki, T., Morimoto, Y., Sekiguchi, A., Baba, T. (2014). Multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* and future

- chemotherapy. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 20(10) 593-601.
DOI:10.1016/j.jiac.2014.08.001
27. Janapatla RP, Yan JJ, Huang AH, Chen HM, Wu HM, Wu JJ. (2007) Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates causing bacteremia at a university hospital in southern Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 58(2):203-9. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0732889306005244>
28. J. Nam, S.T. Alam, K. Kang, J. Choi, M.-H. Seo. (2021). Anti-staphylococcal activity of a cyclic lipopeptide, C₁₅-bacillomycin D, produced by *Bacillus velezensis* NST6. *Journal of Applied Microbiology*. 131:1(1) 93–104. <https://doi.org/10.1111/jam.14936>
29. Kloos W E, Bannerman T L. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7: 117-40.
30. Koumoutsis A, Chen XH, Henne A, Liesegang H, Hitzeroth G, Franke P, et al., (2004). Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J Bacteriol.*; 186: 1084–1986. 10.1128/jb.186.4.1084-1096.2004
31. Kulimushi P.Z., Arias A.A., Franzil L., Steels S., Ongena M. (2017). Stimulation of fengycin-type antifungal lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* in the presence of the maize fungal pathogen *Rhizomucor variabilis*. *Front. Microbiol.* 8:850. doi: 10.3389/fmicb.2017.00850.
32. Li FZ, Zeng YJ, Zong MH, Yang JG, Lou WY (2020). Bioprospecting of a novel endophytic *Bacillus velezensis* FZ06 from leaves of *Camellia assamica*: Production of three groups of lipopeptides and the inhibition against food spoilage microorganisms. *J Biotechnol.* 323:42–53.
33. Malfanova, N., Franzil, L., Lugtenberg, B., Chebotar, V., & Ongena, M. (2012). Cyclic lipopeptide profile of the plant-beneficial endophytic bacterium *Bacillus subtilis* HC8. *Archives of microbiology*, 194(11), 893–899. <https://doi.org/10.1007/s00203-012-0823-0>

34. Martínez-Núñez Ma y López VE. (2016). Nonribosomal peptides synthetases and their applications in industry. *Sustain Chem Process.* 4:13 Doi: <https://doi.org/10.1186/s40508-016-0057-6>
35. Maughan H, Van der Auwera G. (2011). *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infect Genet Evol.* 11(5):789-97. doi: 10.1016/j.meegid.2011.02.001. Epub. PMID: 21334463.
36. Müller, S., Strack, SN, Hoefler, BC, Straight, P., Kearns, DB y Kirby, JR, (2014). El bacillaeo y la esporulación protegen a *Bacillus subtilis* de la depredación por *Myxococcus xanthus*. *aplicación Reinar. Microbiol.* 80:5603–5610. doi: 10.1128/ aem.01621-14.
37. Nakano M.M., Magnuson R., Myers A., Curry J., Grossman A.D., Zuber P. (1991) *srfA* is an operon required for surfactin production, competence development, and efficient sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 173:1770–1778. doi:10.1128/JB.173.5.1770-1778.1991.
38. Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antimicrobianos. (2021).
39. OMS. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan emergentemente nuevos antibióticos. [Internet]. 2017 Consultado: 17 de marzo del 2023; Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/es/>
40. Ongena M, Jacques P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapon for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 2008; 16: 115–125. 10.1016/j.tim.2007.12.009
41. Palazzini JM, Dunlap CA, Bowman MJ, Chulze SN. (2016). *Bacillus velezensis* RC 218 as a biocontrol agent to reduce *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation: Genome sequencing and secondary metabolite cluster profiles. *Microbiol Res.* 192:30–36.
42. Palomino G.A. “Análisis de la interacción de compuestos orgánicos producidos por *Bacillus velezensis* frente a hongos fitopatógenos (*Fusarium fujikuroi*, *Fusarium oxysporum* y *Alternaria alternata*)”. (2023). [Tesis de Licenciatura, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla].

43. Pasachova Garzón, Ramírez Martínez, Muñoz Molina L. (2019). *Staphylococcus aureus*: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular.
44. Patel PS, Huang S., Fisher S., Pimik D., Aklonis C., Dean L., et.al. (1995). Bacillaene, un nuevo inhibidor de la síntesis de proteínas procarióticas producido por *Bacillus subtilis*: producción, taxonomía, aislamiento, caracterización fisicoquímica y actividad biológica. *J. Antibiótico*. 48, 997–1003. doi: 10.7164/antibióticos.48.997
45. Patógenos multirresistentes que son prioritarios para la OMS. (s/f). Paho.org. Recuperado el 3 de septiembre de 2021, de <https://www.paho.org/es/noticias/4-3-2021-patogenos-multirresistentes-que-son-prioritarios-para-oms>
46. Peterson LR. (2019). Bad bugs, no drugs: No ESCAPE revisited. *Clin Infect Dis NOVA*.17 (32): 25-38.
47. Pieras López María. (2019). Molecular mechanism in the development of antimicrobial resistance: alternatives to the use of antibiotics. [Tesis de licenciatura. Universidad de Cantabria]. <https://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/16683/PierasLopezMaria.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
48. Predari S. Estafilococos coagulasa negativos: el enemigo silente. *Rev Arg Microbiol* 2007; 39: 1-3.
49. Ramírez V, Baez A, López P, Bustillos R, Villalobos MÁ, Carreño R, Contreras JL, Muñoz-Rojas J, Fuentes LE, Martínez J and Munive JA. (2019). Chromium Hyper-Tolerant *Bacillus* sp. MH778713 Assists Phytoremediation of Heavy Metals by Mesquite Trees (*Prosopis laevigata*). *Front. Microbiol*. 10:1833. doi: 10.3389/fmicb.2019.01833
50. Romero D., De Vicente A., Rakotoaly R.H., Dufour S.E., Veening J., Arrebola E., Cazorla F.M., Kuipers O.P., Paquot M., Pérez-García A (2007). The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Mol. Plant Microbe Interact*. 20: 430–440. doi: 10.1094/MPMI-20-4-0430.

51. Ruiz-García C, Béjar V, Martínez-Checa F, Llamas I, Quesada E. (2005). *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain. *Int J Syst Evol Microbiol*. 55(Pt 1):191-195. doi: 10.1099/ijss.0.63310-0. PMID: 15653875.
52. Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
53. Summi CD, Yang BW, Yeo IC, Hahm YT. (2015) Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. *Can J Microbiol*. 61(2):693-103. Doi: <https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0613>
54. Tamura K., Stecher G., and Kumar S. (2021). MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
55. Tan T Y, Ng S Y, Ng W X. Clinical significance of coagulase negative staphylococci recovered from nonsterile sites. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3413-4.
56. Tang Q, Bie X, Lu Z, Lv F, Tao Y, Qu X. Effects of fengycin from *Bacillus subtilis* fmbj on apoptosis and necrosis in *Rhizopus stolonifer*. *J Microbiol*. 2014; 52: 675–680. 10.1007/s12275-014-3605-3
57. Torres C. (2012). La resistencia bacteriana a los antibióticos, siete décadas después de Fleming. Zaragoza.
58. Tong S, Davis J, Eichenberger E, Holland T, Fowler V. (2015). *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clinical Microbiology Reviews*.28(3):603-661
59. Um, S., Fraimout, A., Sapountzis, P., Oh, D.-C. y Poulsen, M. (2013). La termita que cultiva hongos, *Macrotermes natalensis*, alberga *Bacilo* sp. que inhiben hongos potencialmente antagónicos. *ciencia Rep*. 3:3250. doi: 10.1038/srep03250
60. van Hal SJ, Fowler VG., Jr (2013). Is it time to replace vancomycin in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections *Clin Infect Dis*. 56:1779–88. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cit178>.

61. Velázquez-Acosta, C., Cornejo-Juárez, P., & Volkow-Fernández, P. (2018). *Cepas E-ESKAPE multidrogasresistentes aisladas en hemocultivos de pacientes con cáncer. Salud Pública de México, 60:151. doi:10.21149/8767*
62. Villarreal-Delgado, María Fernanda, Villa-Rodríguez, Eber Daniel, Cira-Chávez, Luis Alberto, Estrada-Alvarado, María Isabel, Parra-Cota, Fannie Isela, & Santos-Villalobos. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista mexicana de fitopatología. 36(1), 95-130. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>*
63. Wu, T., Xiao, F., & Li, W. (2020). Macrolactins: biological activity and biosynthesis. *Marine life science & technology, 3(1), 62–68. <https://doi.org/10.1007/s42995-020-00068-6>*
64. Yao S, Gao X, Fuchsbauer N, Hillen W, Vater J, Wang J. (2003). Cloning, sequencing, and characterization of the genetic region relevant to biosynthesis of the lipopeptides iturin A and surfactin in *Bacillus subtilis*. *Curr Microbiol.*; 47: 272–277. 10.1007/s00284-002-4008-y
65. Ye M, Tang X, Yang R, Zhang H, Li F, Tao F, Li F, Wang Z. (2018). Characteristics and Application of a Novel Species of Bacillus: *Bacillus velezensis*. *ACS Chem Biol. 13(3):500–505.*
66. Zhao X, Kuipers OP. (2016). Identification and classification of known and putative antimicrobial compounds produced by a wide variety of Bacillales species. *BMC Genomics. 17(1):882.*
67. Zhang, L., Sun, C. (2018). Fengycins, cyclic lipopeptides from marine *Bacillus subtilis* strains, kill the plant-pathogenic fungus *Magnaporthe grisea* by inducing reactive oxygen species production and chromatin condensation. *Appl. Environ. Microbiol. 84.*
68. Zerriouh H, Romero D, García-Gutiérrez L, Cazorla FM, de Vicente A, Pérez-García A. (2011). The iturin-like lipopeptides are essential components in the biological control arsenal of *Bacillus subtilis* against bacterial diseases of cucurbits. *Mol Plant Microbe Interact. 24: 1540–1552. 10.1094/MPMI-06-11-0162*

69. Zuckerkandl E. and Pauling L. (1965). Evolutionary divergence and convergence in proteins. Edited in *Evolving Genes and Proteins* by V. Bryson and H.J. Vogel, pp. 97-166. Academic Press, New York

13. ANEXOS

Medio YM 1L

- 10 g de manitol
- 1g de extracto de levadura
- 0.5 g de ácido glutámico
- Agua destilada

Medio LB 1L

- 10 g Peptona de caseína
- 10 g cloruro de sodio
- 5 g extracto de levadura

Agar Muller Hinton MCD LAB