



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**

**“Determinación de resistencia a  
antibióticos en una colección de cepas de  
bacterias de *Pseudomonas aeruginosa*.”**

**T E S I S**

**02/24**

Para obtener el título de:

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

Presenta:

**JOSUE ISRAEL MACEDA MENDOZA**

Director de tesis:

**DRA. NORMA ELENA ROJAS RUÍZ**

Co Director:

**GUILLERMO MUÑOZ ZURITA**



## *Agradecimientos*

Quisiera expresar mi más sentido agradecimiento a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y al mismo tiempo a la Facultad de Ciencias Biológicas por haberme otorgado una educación de calidad y al mismo tiempo otorgar las herramientas necesarias para mi futuro profesional, además que gracias a esta misma tuve las mejores experiencias, no solamente educacionales, sino que también personales.

También estoy muy agradecido con mi asesora la Dra. Norma Elena Rojas Ruíz por la gran calidad de conocimientos, habilidades y consejos que pudo aportar para mi formación, agradeciendo igualmente su paciencia y comprensión ante las situaciones que se presentaban en ocasiones, siendo muy amable y atenta en todo momento.

Agradecido con mis padres Ma. de los Ángeles Mendoza Sánchez y Juan Ramón Maceda Pulido que en todo momento me apoyaron en mi decisión de estudiar esta carrera que a pesar de no conocer o tener noción de lo que se trataba, demostraron un amor, paciencia y apoyo en todo momento hacia mi persona, cambiando su manera de pensar que tenían con respecto a ciertos aspectos de la naturaleza, consecuencia de haberme escuchado y comprendido, por lo que les dedico este logro, esperando que sea el primero de muchos, y al mismo tiempo para agradecer a la vida por haberme dado a padres tan buenos que desde pequeño con sus enseñanzas me dieron un modo de ver la vida tan único que de no ser por ellos nunca podría desarrollar, viendo la vida como es, bella, divertida, sería, dura pero a pesar de ello a luchar y seguir adelante, por haberme inculcado la capacidad para poder apreciar cada momento como si fuera el último, que la vida se vive solo una vez y hay que hacer que valga la pena vivirla.

Agradezco profundamente a todos mis tíos que han estado para mí cuando los he necesitado, dando sus puntos de vista tanto en cuestiones escolares como personales, brindándome sus conocimientos para poder guiarme en momentos donde todo parecía confuso, y al mismo tiempo enseñándome a afrontar las situaciones que se presentan en la vida

## **RESUMEN**

En el presente estudio se realizaron análisis de resistencia a antibióticos comerciales en seis cepas que fueron aisladas previamente de muestras de Agua termal. La determinación del perfil de resistencia se llevó a cabo en diferentes condiciones nutricionales: Medio Tris G (restrictivo en nutrientes), Agar P (empleado para el cultivo de bacterias del género *Pseudomonas*) y agar LB (condición de cultivo general para diversos microorganismos). Los resultados indicaron que las cepas probadas mostraron ser resistentes por lo menos a 8 antibióticos comerciales. Las cepas mostraron tener resistencia a Sulfonamidas, por lo que una vez identificado el perfil de resistencia o susceptibilidad, se determinó por PCR la amplificación de genes de resistencia a sulfonamidas (*Sul1*, *Sul2*, *Sul3* y *Sul14*), para lo cual se extrajo el ADN genómico de las dos cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, la amplificación de los genes fue determinada en electroforesis en gel de agarosa, se obtuvo amplificación de los genes *Sul1*, *Sul2* en una de las cepas analizadas.

Debido a que *P. aeruginosa* es una de las bacterias que suelen presentar mayor resistencia ante los antibióticos en la actualidad, es de suma importancia la búsqueda de nuevas alternativas para combatirlos, por lo que en este estudio se realizó la prueba de susceptibilidad de las cepas de *P. aeruginosa* a metabolitos extraídos a partir de cepas cultivadas de bacterias *Bacillus subtilis*, con la finalidad de observar el posible efecto antagónico. Las cepas empleadas en este estudio son pertenecientes a la colección del Laboratorio de Microbiología 402 del EMA-6, las cuales fueron cultivadas en diferentes condiciones nutricionales.

Para este análisis se emplearon dos cepas de *P. aeruginosa* (9 y 10) y tres cepas de *B. subtilis* (49.1, 49.2 y 49.3), las cuales son productoras de metabolitos secundarios durante la fase estacionaria de crecimiento.

Los metabolitos extracelulares producidos por las cepas con los *B. subtilis*, fueron probados en cultivos en medio sólido de las cepas de *P. aeruginosa*, posterior a la incubación se registró la inhibición del crecimiento (halo de inhibición) o el crecimiento de cultivo. Los resultados indicaron reducción en el desarrollo de las cepas de *P. aeruginosa*, por lo que a futuro estos metabolitos podrían representar una alternativa al tratamiento de cepas multirresistentes a antibióticos.

<b>RESUMEN</b>	<b>4</b>
<b>1.- INTRODUCCIÓN</b>	<b>8</b>
1.1 Género <i>Pseudomonas</i> .	9
1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	10
1.3 Factores de patogenicidad	13
1.4 El Quorum Sensing	14
1.5 Formación del Biofilm y la patogenicidad.	15
1.6 Características genéticas de <i>P. aeruginosa</i> y su relación con la patogenicidad	16
1.7 Resistencia a los antibióticos	18
1.8 Resistencia a los antimicrobianos provocados por cambios en la estructura de la bacteria, producción de enzimas y bombas de expulsión.	21
1.9 Complicaciones ocasionadas por la infección con <i>P. aeruginosa</i> .	22
<b>2. - ANTECEDENTES</b>	<b>24</b>
<b>3.- JUSTIFICACIÓN.</b>	<b>26</b>
<b>4.- OBJETIVOS.</b>	<b>27</b>
<b>5.- MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	<b>28</b>
5.1 Microorganismos empleados	28
5.2 Medios de Cultivo empleados	30
5.3 Pruebas de resistencia a antibiótico de las cepas empleadas.	31
5.4 Obtención de metabolitos producidos por <i>B. subtilis</i>	33
5.5 Pruebas de inhibición de los metabolitos de <i>B. subtilis</i> en cepas de <i>P. aeruginosa</i> .	34
5.6 Extracción de ADN de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> .	34
5.7 Amplificación por PCR del gen que codifica para la resistencia a sulfonamidas.	36
5.8 Amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S	37
<b>6.- RESULTADO</b>	<b>39</b>
6.1 Pruebas de resistencia a antibióticos comerciales en cepas <i>P. aeruginosa</i> y <i>B. subtilis</i> .	39
6.2 Amplificación por PCR de genes de resistencia a antibióticos en cepas de <i>P. aeruginosa</i>	47
6.3 Pruebas de resistencia a antibióticos comerciales en cepas de <i>B. subtilis</i> .	50
6.4 Prueba de inhibición del ultrafiltrado que contiene los metabolitos de <i>B. subtilis</i> contra <i>P. aeruginosa</i>	54
<b>7.- DISCUSIÓN</b>	<b>58</b>
<b>8.- CONCLUSIONES</b>	<b>62</b>



## 1.- INTRODUCCIÓN

Las bacterias son organismos unicelulares que habitan en todos los ambientes, obteniendo los nutrientes necesarios para la proliferación de estos mismos, y llevar a cabo sus diferentes funciones, algunos pueden ocasionar enfermedades, mientras que otros pueden ser benéficos para el hombre, un claro ejemplo de esto son; las bacterias que habitan en el sistema digestivo, las cuales ayudan a procesar de manera correcta los alimentos, otro caso son aquellos microorganismos que pueden producir nuevos antibióticos, ya que es posible que en la naturaleza se encuentran presentes una amplia diversidad de microorganismos productores de metabolitos secundarios, algunos de ellos de naturaleza antibiótica (Chavez J *et al.*, 2020).

En el ambiente, también existen bacterias que son llamadas oportunistas, las cuales pueden afectar principalmente a pacientes inmunocomprometidos, causando infecciones que pueden conducir a la muerte. *P. aeruginosa* es considerado un patógeno oportunista de suma importancia en el ámbito intrahospitalario, ya que los pacientes inmunocomprometidos pueden infectarse mediante lesiones en la capa protectora de la piel, intervención médica, el empleo de respiradores, catéteres, o por cortaduras, quemaduras, entre otros.

*P. aeruginosa* ha sido reportada por provocar daños a la salud, debido a que presenta una resistencia natural a ciertos antibióticos y a su capacidad de formar biopelículas, lo cual puede conducir a graves problemas en pacientes intrahospitalarios. (Mielko K. *et al.*, 2019).

Se considera que una bacteria es resistente a los antibióticos cuando los esquemas de tratamiento son poco eficaces o existen bajas posibilidades de éxito. (Baquero F. *et al.*, 2021).

Dicha resistencia en los microorganismos puede ser el resultado de cambios a nivel de secuencias genéticas, que favorecen el desarrollo de estos en ambientes con la presencia de antibióticos, esta resistencia puede además ser transmitida a través de las generaciones (Baquero F. *et al.*, 2021), por lo que la comprensión de cómo los microorganismos desarrollaron estas estrategias de resistencia es fundamental.

### **1.1 Género *Pseudomonas*.**

*Pseudomonas* es uno de los grupos de bacterias más estudiados, se considera que aproximadamente el 90% de su genoma se encuentra altamente conservado (Goldberg J *et al.*, 2008). Este tipo de bacterias son Gram-negativas, poseen membrana externa, apéndices superficiales y, en ocasiones, capas adicionales de cápsulas o proteínas extracelulares, además tienen la capacidad de evadir las defensas inmunitarias del huésped a través de mecanismos de adhesión, la colonización y la formación de biopelículas. (Tun F *et al.*, 2022 ).

Los miembros del género *Pseudomonas* son microorganismos que se encuentran ampliamente distribuidos y han sido objeto de intensas investigaciones, algunas especies debido a su papel como agente causal de algunas enfermedades (Mulcahy, L. R., 2014.) Otras son utilizadas como agentes de control biológico en cultivos por su capacidad para sintetizar compuestos antimicrobianos o al inducir resistencia sistémica al activar la respuesta inmunitaria en plantas (Diaz, M *et al.*, 2022)

Otra de las aplicaciones de algunas especies de este género son en biorremediación; esto debido a su capacidad de poder oxidar diversos contaminantes, como son los hidrocarburos, además de mostrar tolerancia a compuestos xenobióticos (Ivanova A *et al.*, 2022, Goveas L *et al.*, 2022).

En un estudio realizado por Goveas y col en 2022 se demuestra capacidad de degradación del petróleo, ya que se produjeron ramnolípidos, en un 86%-100% de todos los hidrocarburos de bajo y alto peso molecular que se encontraban presentes en el petróleo crudo (Goveas L *et al.*, 2022), por lo que se considera que su uso en protocolos de biorremediación es adecuado para el tratamiento de derrames de petróleo en mares y océanos.

Sin embargo un miembro de este género, ha cobrado relevancia; la bacteria *P. aeruginosa* la cual forma parte de un grupo de bacterias conocido como ESKAPE conformado por: *Enterococcus spp*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* y *Enterobacter spp*, las cuales han mostrado ser multirresistentes a antibióticos (Chávez J *et al.*, 2020); además estas mismas bacterias patógenas están en una lista publicada por la OMS para los que se requiere el desarrollo de nuevos antibióticos eficaces (De Oliveira *et al.*, 2020).

## **1.2 *P. aeruginosa*.**

*P. aeruginosa* es un organismo bacteriano patógeno en forma de bacilo que puede alcanzar los 0,5-1  $\mu\text{m}$  de diámetro y de 1-1,5  $\mu\text{m}$  de largo.

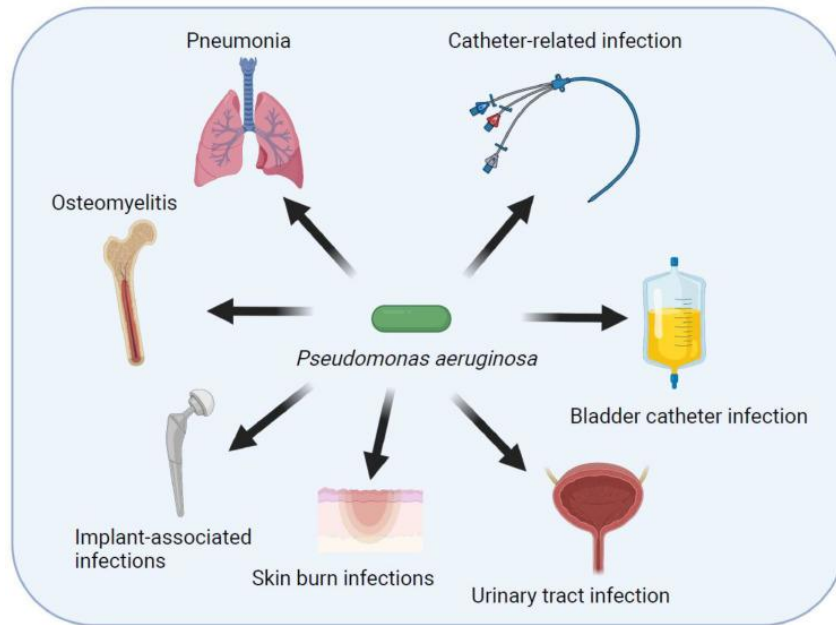
Esta especie se caracteriza por la producción de exotoxinas que pertenecen al grupo de las fenazinas, que pueden inhibir el desarrollo de otros organismos (Justo S *et al.*, 2016), presenta flagelo polar que permite su movimiento (Paz-Zarza *et al.*, 2019).

Algunas de sus características fisiológicas son; el tolerar condiciones bajas de oxígeno, de nutrientes y se puede desarrollar en un amplio rango de temperatura desde los 4°C hasta los 42°.

Un aspecto de suma importancia es que *P. aeruginosa puede* transmitirse en el ámbito intrahospitalario provocando infecciones (Tuon F. *et al.*, 2022).

Esta bacteria ha sido frecuentemente aislada de ambientes intrahospitalarios, aunque tiene una amplia distribución en otros ambientes. Se ha reportado que en el caso del ambiente intrahospitalario pueden causar y exacerbar infecciones pulmonares (Parkis M *et al.*, 2018), además en pacientes inmunocomprometidos puede ocasionar daño en tejidos blandos, infecciones en quemaduras, heridas abiertas y postoperatorias; puede causar además complicaciones en pacientes que cursan enfermedades crónicas como diabetes e individuos con alteraciones de la circulación microvascular, incluso puede estar presente en catéteres lo que facilita que el paciente se infecte con estos microorganismos (Köhler *et al.*, 2000, Morin C *et al.*, 2021), en la literatura se han reportado casos de neumonía asociada con la ventilación mecánica (Nicolau, C & Oliver, A. 2010).

En la Figura 1; se muestran algunas de las infecciones ocasionadas por *P. aeruginosa*.



**Fig. 1. Algunas de las infecciones provocadas por *P. aeruginosa*. Tomado de Tuon *et al.* 2022.**

En la última década se ha reportado que la eficacia del tratamiento contra este tipo de bacterias ha disminuido considerablemente, lo que provoca un aumento en la morbilidad, y costos de la estancia hospitalaria (Ahmadi *et al.*, 2016, De Sousa T *et al.*, 2021).

Algunas de las razones por las cuales *P. aeruginosa* puede ser tan resistente a los antibióticos son la presencia de mecanismos de evasión ante los antibióticos como la presencia de  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro, metalo- $\beta$ -lactamasas (MBL), alteración en las proteínas fijadoras de penicilina (PBP), mutación de las proteínas porinas, modificación enzimática plasmídica, mutación en las ADN-girasas y bombas de expulsión activa (Ochoa *et al.*, 2013).

### 1.3 Factores de patogenicidad

Las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* presentan una gran cantidad de mecanismos que le permiten multiplicarse con éxito en las primeras etapas de la infección (Moradali M *et al.*, 2017). En general los factores de patogenicidad se pueden agrupar en dos tipos: los asociados a la célula bacteriana y los que son secretados (Paz-Zarza *et al.*, 2019). Estos factores de patogenicidad se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1. Factores de patogenicidad de *Pseudomonas spp.***

Factores	Genes o proteínas involucradas
Asociados a célula bacteriana	
Flagelo	FliC, FliD
Pili (Tipo IV)	PilA, PilB, PilT, PilU
Proteínas de membrana	LecA, LecB, LPS
Secretados	
Factores asociados a la formación de biopelícula	
Efectores SST2	LasA, LasB
Efectores SST3	ExoA, ExoS, ExoT, ExoU, ExoY
Efectores SST5	EstA
Pigmentos	Piocianina
Efectores <i>quorum sensing</i>	LasIR, RhlIR, rhlAB, hcnABC, chic

Tomado de Paz-Zarza *et al.* (2019).

Estos factores de patogenicidad le permiten a la bacteria interactuar con el huésped, adhiriéndose a la mucosa de las vías respiratorias y secretando péptidos antimicrobianos, además la capacidad de movilizarse a través de flagelos le permiten colonizar diferentes entornos y la formación de biopelículas (Goldberg, J *et al.*, 2008).

Otra de las características que más beneficia a este tipo de bacterias es el swarming es un movimiento coordinado de bacterias a través de una superficie semisólida. Se ha reportado que las condiciones que promueven el swarming, podrían ser las mismas que se presentan en las capas mucosas que de las superficies epiteliales (Yeung A *et*

*al.*, 2009). También se ha documentado la presencia de cambios físicos en las células que realizan swarming como es el alargamiento y la expresión de ciertos genes de virulencia relacionados con el sistema de secreción de tipo III, los cuales están regulados en la población microbiana por moléculas de señalización como la N-acil homoserina lactona, se ha reportado que el swarming y la formación de biofilms pueden contribuir a la resistencia a ciertos antibióticos como: la ciprofloxacina, la gentamicina y la polimixina B (Eberl, L *et al.*, 1996).

#### **1.4 El Quorum Sensing**

Es el mecanismo por el cual se comunican las bacterias a través de moléculas de señalización como la acil-homoserina lactona (AHL), las cuales regulan globalmente la expresión de los genes y controlan el comportamiento de la población microbiana (Cady N *et al.* 2012, Vadakkan K. *et al.*, 2018).

Se ha documentado que esta vía de comunicación entre organismos, participa en la transferencia horizontal o vertical de genes, por lo que podría influir en la transmisión de genes de resistencia entre poblaciones bacterianas. Este proceso de comunicación celular involucra moléculas como homoserina lactona, y genes que codifican a reguladores como el *rsaL*. Este mecanismo es dependiente de la densidad poblacional y ayuda a la comunidad bacteriana a coordinarse y trabajar como una sola unidad, además de participar regulando la virulencia y transmisión de genes entre las bacterias (Vadakkan K. *et al.*, 2018).

## 1.5 Formación del Biofilm y la patogenicidad.

El biofilm funciona como una matriz que permite que las bacterias se adhieran a las superficies, al mismo tiempo confiere protección contra la respuesta inmune del huésped, proporciona los nutrientes para el desarrollo y facilita la comunicación entre las células bacterianas.

EL biofilm le ha permitido a las bacterias sobrevivir en diversos ambientes, por ejemplo en condiciones de carencia de nutrientes, como escasez de hierro, estas bacterias producirán pioverdinas, para la adquisición del mismo en el medio extracelular (Cezard C *et al.* 2014), donde estas moléculas funcionan como captadores de hierro (III) y transportadores de este ión (Cezard C *et al.* 2014).

*P. aeruginosa* es capaz de formar dos tipos generales de biopelícula;

1.- Plana o inicial: caracterizada por presentar una distribución uniforme de bacterias en la superficie (Paz-Zarza *et al.*, 2019). Se inicia con ella cuando la bacteria se adhiere a superficies tisulares, lo que conduce a la formación de microcolonias.

2.- Estructurado o maduro: está compuesto por agregados bacterianos separados por canales (Bolívar V *et al.*, 2021).

En el caso de un biofilm cuya distribución de las células es heterogénea, las células que se ubican en la superficie de la biopelícula tendrán un diferente suministro de nutrientes con respecto a las de la parte interna del biofilm, las de la parte externa serán metabólicamente más activas en comparación con las células internas, esto debido probablemente a las limitaciones en nutrientes y oxígeno (De Kievit, T *et al.*, 2001).

Para la formación del Biofilm se ha reportado que es necesario la presencia de diversas moléculas como: proteínas, lípidos, sustancias poliméricas extracelulares (EPS), polipéptidos, polisacáridos, exopolisacáridos como Psl, Pel y alginato, además de ADN de tipo extracelular (eDNA) (Thi, M., Wibowo, D., & Rehm, 2020).

### **1.6 Características genéticas de *P. aeruginosa* y su relación con la patogenicidad**

La estructura principal del genoma de estos microorganismos consta de dos partes: Una altamente conservada y un genoma accesorio de naturaleza variable, en este último se pueden presentar mutaciones, que conducen a cambios de expresión de proteínas (Kung V *et al.*, 2010). Por lo que al ser una región variable del genoma, puede presentar cambios constantes, que podrían ser ocasionados por factores presentes en el medio de desarrollo (condiciones de cultivo) y pueden ser transmitidos a través del tiempo a futuras generaciones. Algunos de los cambios reportados en el genoma de *P. aeruginosa* son: las deleciones, reordenamientos y mutaciones dentro del genoma central. Lo anteriormente mencionado junto con la transferencia horizontal de genes pueden contribuir a la evolución del genoma de *P. aeruginosa* (Kung V *et al.*, 2010).

En la Tabla 2 se muestran algunos genes que codifican para factores de virulencia y sus efectos sobre el huésped.

**Tabla 2. Genes que codifican para toxinas y otros factores de virulencia.**

<b>Genes que codifican para toxinas o factores de virulencia</b>	<b>Efectos sobre el huésped y la célula</b>	<b>Referencias</b>
--	---	--------------------

---

<i>Exo S</i>	Cambios en el citoesqueleto, alterando la fagocitosis y muerte celular	(Jurado M <i>et al.</i> , 2021)
<i>Exo T</i>	Inhibe la fagocitosis de la bacteria por parte de las células epiteliales y reconocimiento por parte de los macrófagos	(Jurado M <i>et al.</i> , 2021)
<i>Exo U</i>	Provoca lesiones pulmonares, infecciones graves o agudas, sepsis y mortalidad, causa daño en macrófagos células epiteliales y fibroblastos	(Jain M., <i>et al.</i> , 2004)
<i>Exo A</i>	Inhibición de síntesis de proteínas del huésped	(Cady K <i>et al.</i> , 2012)
Swarming	Codifican el sistema de secreción de tipo III y sus efectores, modificando proteasas extracelulares y los asociados con transporte de hierro, haciendo posible su supervivencia en ambientes difíciles para su crecimiento	(Overhage J <i>et al.</i> , 2008)
<i>LasB</i> y <i>PvdQ</i>	Participa en la degradación de células de huésped, en el proceso inflamatorio.	(Everett, M <i>et al.</i> , 2023)
<i>LasR</i> y <i>rhl</i>	Regulan la transcripción de genes de virulencia involucrados en infecciones agudas y daño de la célula	(Jurado M <i>et al.</i> , 2021) (Oluwabusola E <i>et al.</i> , 2022)
3-oxo-C12-HSL	Induce apoptosis en macrófagos y neutrófilos	(Golpasha ID <i>et al.</i> , 2015)
MexY	Confieren resistencia a los antibióticos a nivel de plásmido y transmembrana	(Lau CH, <i>et al.</i> , 2014).

---

**Elaboración propia.**

## 1.7 Resistencia a los antibióticos

*Pseudomonas spp.* Puede contrarrestar el efecto de los antibióticos por medio de tres tipos de resistencia: intrínseca, adquirida y adaptativa.

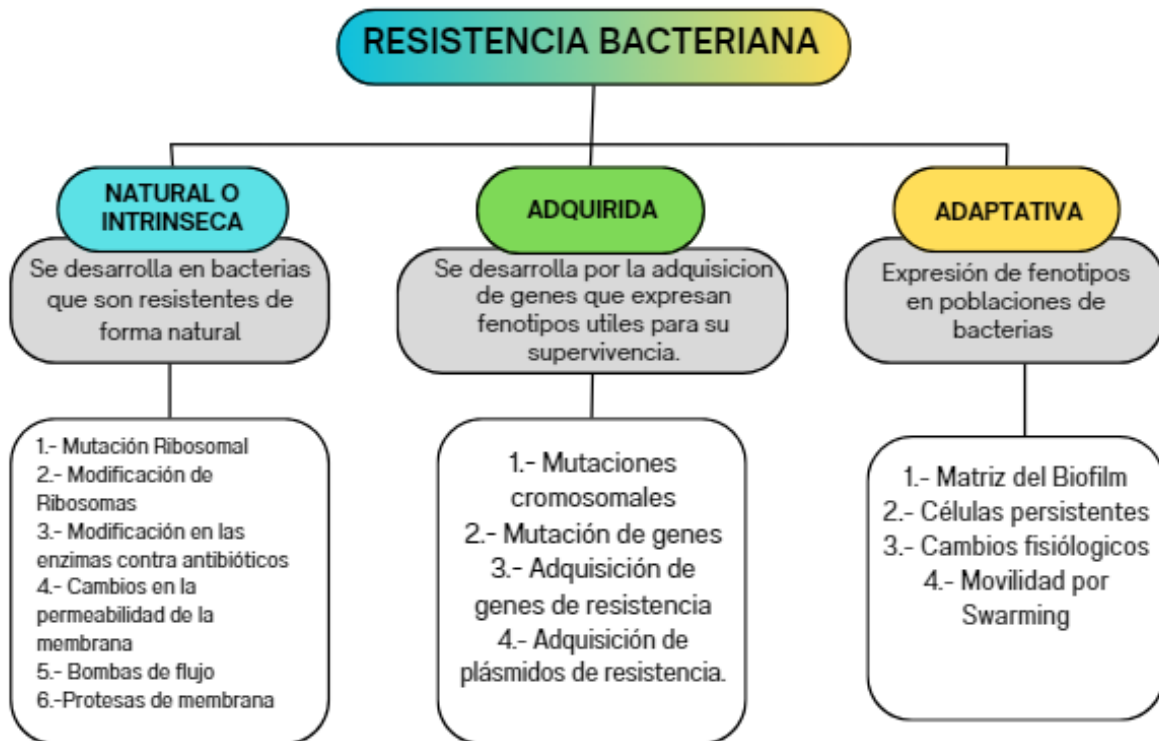
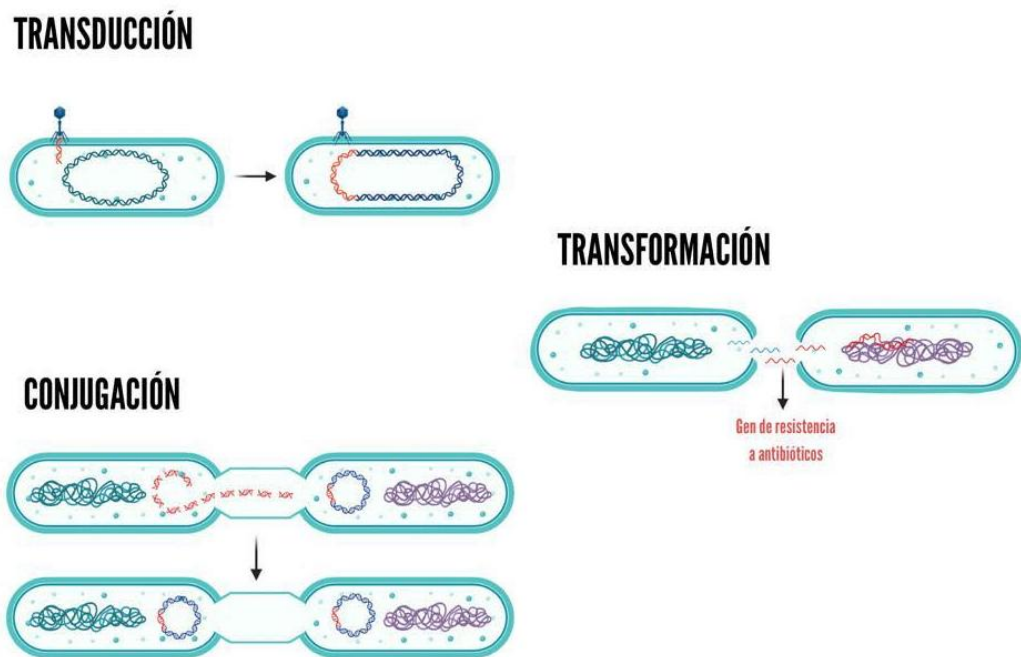


Figura 2. Tipos de resistencia a los antibióticos en bacterias.  
Modificado de (Khan F *et al.*, 2020).

**1.- Resistencia natural o intrínseca:** se presenta en bacterias que de forma natural son resistentes a ciertos antibióticos, por ejemplo por presentar cambios en la permeabilidad de la membrana externa, la presencia de bombas de salida que expulsan los antibióticos fuera de la célula y la producción de enzimas que inactivan a los antibióticos (Pang Z *et al.*, 2019).

**2.- Resistencia adquirida:** se presenta cuando la bacteria adquiere genes por transferencia horizontal, provocando la expresión de un fenotipo que los ayude a resistir los efectos de los antibióticos. , por ejemplo; la síntesis de enzimas como las beta-lactamasas, que hidrolizan el anillo  $\beta$ -lactámico de los antibióticos y destruyen el sitio activo del AB inhibiendo su actividad (Gómez *et al.*, 2005).



**Figura 3. Mecanismos de adquisición horizontal de genes de resistencia en bacterias. Elaboración propia.**

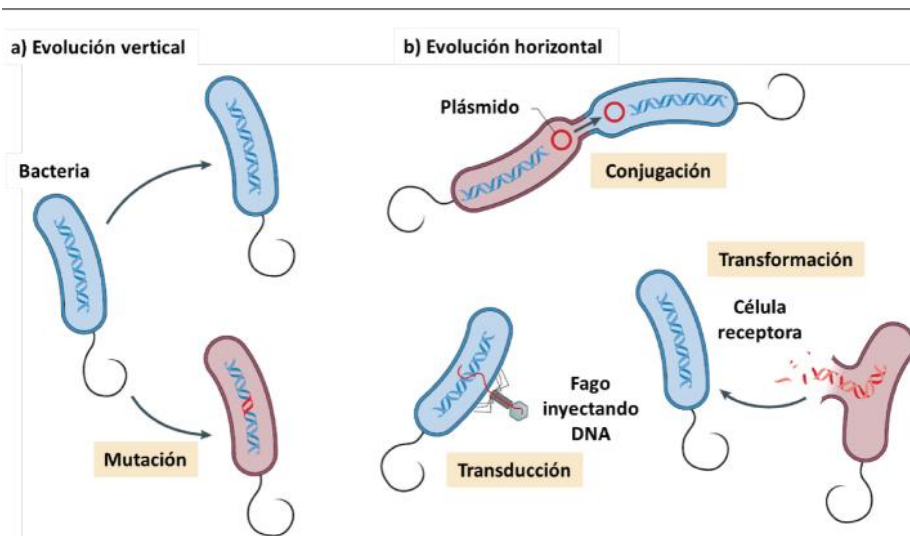
Los mecanismos por los cuales una bacteria puede adquirir genes de resistencia son:

- 1) La transducción: es la transferencia de material genético de una bacteria a otra mediante un virus que infecta bacterias (bacteriófago). En este caso el material genético del virus puede integrarse en el genoma bacteriano, recombinarse y

transferirse cuando el virus infecta a otra célula, posibilitando la transferencia de genes de resistencia a los antimicrobianos (Moreno M *et al.*, 2009).

- 2) La conjugación: es un mecanismo de transferencia de material genético que requiere el contacto directo entre dos células bacterianas, una donadora y la otra receptora, y media la transferencia de plásmidos conjugativos que pueden conferir resistencia a diferentes compuestos (Chávez J *et al.*, 2020).
- 3) La transformación: es la incorporación de material genético que fue liberado mediante la lisis de la célula donadora y una célula receptora puede incorporar genes de resistencia a su genoma (Chávez J *et al.*, 2020).

En la Figura 4; se muestran los mecanismos por los cuales las bacterias pueden adquirir genes de resistencia.



**Figura 4. La resistencia puede evolucionar a través de dos mecanismos; a) La evolución vertical representa la generación de una nueva mutación en el genoma bacteriano y la subsecuente transferencia a su progenie. b) La adquisición de genes de resistencia de manera horizontal puede ocurrir mediante transducción, conjugación o transformación. Tomado de Chávez J *et al.*, 2020.**

**3.- Resistencia adaptativa:** Es un tipo de resistencia que se manifiesta principalmente en características fenotípicas de una bacteria una población de microorganismos, por ejemplo se ha reportado en la literatura que la formación de biopelículas confiere resistencia a las bacterias al impedir el acceso de los antibióticos y otros antimicrobianos (Ochoa *et al.*, 2015). En este caso el biofilm funciona como barrera selectiva que impide el paso de los antibióticos.

### **1.8 Resistencia a los antimicrobianos provocados por cambios en la estructura de la bacteria, producción de enzimas y bombas de expulsión.**

Algunas de las razones por las cuales *P. aeruginosa* puede ser tan resistente a los antibióticos son la presencia de mecanismos de evasión ante los antibióticos como la presencia de  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro, metalo- $\beta$ -lactamasas (MBL), alteración en las proteínas fijadoras de penicilina (PBP), mutación de las proteínas porinas, modificación enzimática plasmídica, mutación en las ADN-girasas y bombas de expulsión activa (Ochoa *et al.*, 2013).

**Producción de enzimas:** Se han identificado diversas enzimas que pueden realizar modificaciones como: fosforilación, acetilación y las que adenilan al fármaco, además se ha mostrado que altos niveles de resistencia pueden estar relacionados con la metilación del 16 rRNA (Lister P *et al.*, 2009, Pang Z *et al.*, 2019).

Se ha reportado que *P. aeruginosa* es capaz de producir betalactamasas cromosómicas, las cuales tienen actividad de cefalosporinasa y son inducibles ante la exposición a los antibióticos beta-lactámicos (Ortiz *et al.*, 2007, Lister P., *et al.* 2009, Nicolau, C & Oliver, A. 2010, Pourmand M *et al.*, 2015).

**Bombas de expulsión:**

Está documentado que la resistencia a los antibióticos puede estar causada por modificaciones cromosómicas que dan lugar a alteraciones en la permeabilidad de la membrana de la bacteria, la pérdida de porinas y la sobreexpresión de la bomba de flujo (Yoon E *et al.*, 2021). Por ejemplo se ha reportado que los genes; *mexR*, los cuales codifican para una hiperexpresión de MexAB-OprM, el cual es un complejo que constituye una bomba de membrana citoplasmática, donde canales de salida, proteínas ligadoras que facilitan la salida de detergentes y sustancias anfipáticas, podrían causar la muerte de la bacteria, además de permitir la resistencia a los antimicrobianos: tetraciclina, cloranfenicol, entre otros (Gómez *et al.* 2005). También está documentado que las mutaciones en los genes *nfx C* y *nfx b* implicados en la penetración de la membrana externa, provocan un incremento en la resistencia a antibióticos (Hooper D *et al* 1993).

### **1.9 Complicaciones ocasionadas por la infección con *P. aeruginosa*.**

Las infecciones causadas por *P. aeruginosa* pueden causar severas complicaciones en personas inmunocomprometidas, se ha reportado que estas bacterias pueden colonizar el tracto intestinal de humanos que padecen alguna otra enfermedad (Verhoeve V *et al.*, 2022), en pacientes oncológicos se ha llegado a comprobar que el 10% de los pacientes que ingresan a las zonas de emergencia pueden adquirir este microorganismo del ambiente intrahospitalario en un periodo de tiempo de seis meses (Griffith *et al.*, 1989).

En enfermedades como la fibrosis quística, donde existe una respuesta inmunitaria hiperinflamatoria, la presencia de esta bacteria ocasiona infecciones pulmonares

crónicas en las vías respiratorias, que resultan en un incremento en la morbilidad, la reducción en la vida de la persona o incluso la muerte (Malhotra S *et al.*, 2019).

## 2.- ANTECEDENTES

*P. aeruginosa* es una bacteria con grandes capacidades de adaptación, que se puede encontrar ampliamente distribuida, no sólo en el ambiente intrahospitalario, donde frecuentemente ha sido asociada a áreas como la de cuidados intensivos, o a los fomites contaminados que son empleados para el tratamiento de los pacientes en diversas áreas. Diversos estudios indican que *P. aeruginosa* es capaz de causar infecciones tanto agudas como crónicas, debido a la gran cantidad de factores de virulencia que posee (Jurado M *et al.*, 2021). Además su alta resistencia a los antibióticos la han colocado como una de las principales bacterias para las cuales es urgente se realicen investigaciones para ofrecer tratamientos eficaces contra su desarrollo.

A nivel local en investigaciones llevadas a cabo previamente el laboratorio de Microbiología 402 EMA-6 de la BUAP, se realizó el aislamiento de cepas de *P. aeruginosa* a partir de muestras de origen termal, las cuales son multirresistentes a más de 7 antibióticos comerciales. En este trabajo se planteó determinar el efecto antimicrobiano del empleo de metabolitos producidos por cepas de *B. subtilis* contra cepas de *P. aeruginosa*.

Los *Bacillus* son un grupo de bacterias Gram positivas, aerobias, de amplia distribución en la naturaleza, son formadoras de endosporas ante condiciones ambientales adversas, se ha reportado que tienen capacidad para metabolizar una amplia gama de sustratos. (Dhruw C. *et al.*, 2020). Por lo cual se han realizado diversos estudios que muestran su capacidad metabólica para la producción de moléculas de importancia a

nivel industrial tales como: la riboflavina, estreptavidina,  $\beta$ -lactamasa entre otras (Maughan H *et al.*, 2011).

El género *Bacillus* además ha sido de interés debido a los metabolitos de naturaleza antibiótica que produce, en estudios recientes han sido de interés para la búsqueda y caracterización de nuevos antimicrobianos (Samaras, A *et al.*, 2021, Oni F *et al.*, 2022).

### **3.- JUSTIFICACIÓN.**

Las infecciones causadas por microorganismos multiresistentes a los antibióticos son una de las preocupaciones de mayor relevancia a nivel mundial en la actualidad, *P. aeruginosa* es uno de los microorganismos de mayor importancia por su papel como patógeno oportunista en el ambiente intrahospitalario, además de formar parte de la lista de patógenos prioritarios pertenecientes al grupo ESKAPE para los cuales la OMS ha emitido una alerta a nivel mundial desde 2017 debido a su resistencia a diversos antibióticos, dado que es un microorganismo ampliamente distribuido en la naturaleza es indispensable la determinación del perfil de resistencia a antibiótico de cepas de *P. aeruginosa* aisladas a partir de muestras ambientales, en este caso agua termal. Además se comparará el efecto de la adición de metabolitos producidos por *B. subtilis* en el desarrollo de cepas de *P. aeruginosa*.

## 4.- OBJETIVOS.

### Objetivo general

Determinar el fenotipo de resistencia a antibióticos comerciales en cepas del género *P. aeruginosa* aisladas a partir de muestras de agua de origen termal y analizar su resistencia o susceptibilidad ante metabolitos extracelulares sintetizados por cepas de *B. subtilis*.

### Objetivos específicos

- Cultivar en diferentes condiciones nutricionales cepas de bacterias del género *P. aeruginosa*.
- Determinación de resistencia a antibiótico en cepas bacterias del género *P. aeruginosa*
- Aislar metabolitos del género *B. Subtilis*.
- Evaluar el efecto antimicrobiano de metabolitos producidos por *B. subtilis* en *P. aeruginosa*.

## 5.- MATERIALES Y MÉTODOS.

La metodología empleada en esta investigación se muestra en la figura 5;

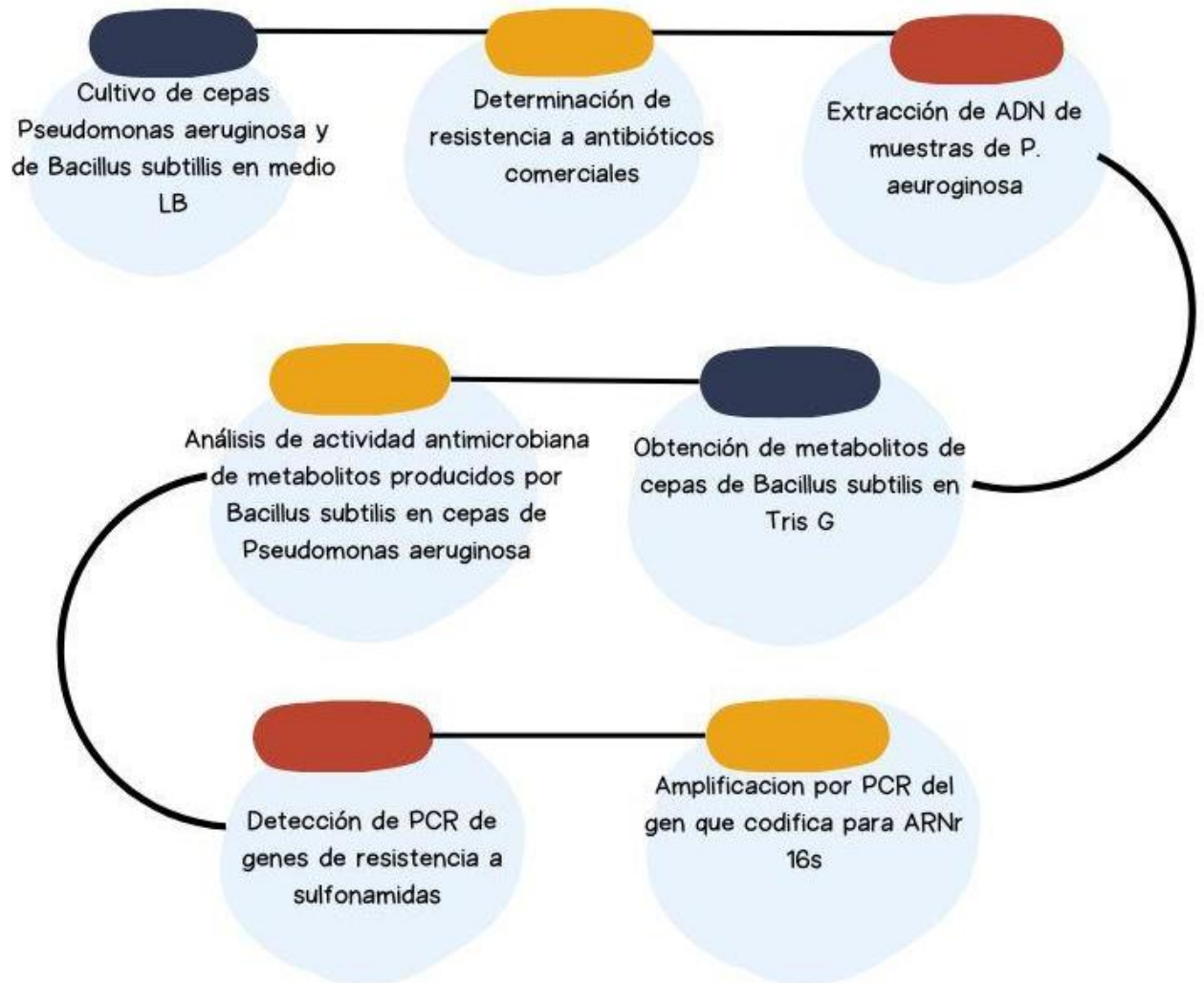


Figura 5. Diagrama de flujo de la metodología empleada en esta investigación.

### 5.1 Microorganismos empleados

Los microorganismos empleados en los análisis de determinación de resistencia a antibióticos comerciales fueron seis cepas de *P. aeruginosa* correspondientes a las cepas número 16, 24, 27, 32, 38 y 39 también se emplearon bacterias pertenecientes al género *B. subtilis* cepas 49.1, 49.2 y 49.3, las cuales son productoras de metabolitos secundarios y fueron utilizadas en los ensayos de actividad antimicrobiana contra las

cepas 9 y 10 de *P. aeruginosa*. Las cepas bacterianas fueron previamente obtenidas y pertenecen a colecciones del Laboratorio de Microbiología 402-EMA 6, lo que se muestra en la tabla 3.

**Tabla 3. Cepas empleadas en esta investigación**

<b>Nombre de la cepa</b>	<b>Género de la cepa</b>	<b>Origen de la cepa</b>
27	<i>P. aeruginosa</i>	Agua termal, 2019
32	<i>P. aeruginosa</i>	Agua termal, 2019
39	<i>P. aeruginosa</i>	Agua termal, 2019
38	<i>P. aeruginosa</i>	Agua termal, 2019
16	<i>P. aeruginosa</i>	Agua termal, 2019
9	<i>P. aeruginosa</i>	Agua termal, 2019
10	<i>P. aeruginosa</i>	Agua termal, 2019
24	<i>P. aeruginosa</i>	Agua termal, 2019
49.1	<i>B. Subtilis</i>	Rizósfera de planta medicinal, 2019
49.2	<i>B. Subtilis</i>	Rizósfera de planta medicinal, 2019

## 5.2 Medios de Cultivo empleados

Se emplearon tres medios de cultivo, los cuales se muestran en la tabla 4.

1.- Medio Luria-Bertani (LB): Es empleado para el aislamiento y crecimiento microbiano, debido a que proporciona condiciones adecuadas para el desarrollo de una amplia variedad de bacterias, esto es debido a que es un medio rico en nutrientes como la triptona (o peptona) y el extracto de levadura, además de contener NaCl (Garboza F *et al.*, 2011).

2.- Medio Tris G: Es un medio de cultivo restrictivo en nutrientes, ya que sus principales componentes son sales y una baja cantidad de glucosa y extracto de levadura como fuente de carbono y nitrógeno respectivamente.

3.- Agar P: Medio de cultivo utilizado para el aislamiento, la detección y la diferenciación de especies del género *P. aeruginosa* en base a la producción de piocianina.

**Tabla 4. Medios de cultivo empleados.**

Medios de cultivo	Uso	Microorganismos cultivados
Luria-Bertani (LB)	Aislamiento y crecimiento bacteriano	Amplio espectro de crecimiento.

Tris G	Cultivo y producción de metabolitos secundarios de naturaleza antimicrobiana y producción de pigmentos	<i>Bacillus spp.</i> y <i>Pseudomonas spp.</i>
Agar P	Es un medio selectivo para la identificación y aislamiento de especies de <i>Pseudomonas spp.</i> , debido a la producción de pirocianina	<i>P. aeruginosa</i>

---

Las cepas de *P. aeruginosa* y *B. subtilis*, que estaban preservadas en ultracongelación fueron cultivadas de la siguiente forma, una asada del contenido de bacterias en un criovial de cada cepa fue inoculada en tubos conteniendo 3 mL de medio LB líquido, los cuales fueron incubados a 28 °C en agitación constante a 120 rpm durante 24 horas, transcurrido el tiempo de incubación las cepas fueron sembradas por estría cruzada, con la finalidad de obtener colonias aisladas y corroborar la morfología colonial esperada. Este procedimiento se realizó con todas las cepas proporcionadas.

### **5.3 Pruebas de resistencia a antibiótico de las cepas empleadas.**

Para los ensayos de resistencia a antibióticos, las cepas de los microorganismos fueron inoculadas en 3 mL de medio LB, los tubos fueron incubados con agitación constante a una temperatura de 37°C para las cepas de *P. aeruginosa* y 28°C para las cepas de *B. subtilis* por 18 horas, posteriormente las bacterias empleadas fueron cultivadas en diferentes condiciones nutricionales: Agar P, Medio Tris G y medio LB, para lo cual se inocularon 100 µL de los cultivos de las cepas, los cuales fueron sembrados por la técnica de extensión en placa con asa de Vidrio de Digrafsky, se esperaron 30 minutos para posteriormente colocar los discos de antibióticos.

Los antibióticos para las cepas de *P. aeruginosa* fueron de la serie 2 para Gram negativos multidiscos PT-35 Multibac I.D con 12 antimicrobianos: Amikacina, Ampicilina, Carbenicilina, Cefalotina, Cefotaxima, Ciprofloxacina, Cloranfenicol, Gentamicina, Netilmicina, Nitrofurantoina, Norfloxacino y Sulfametoxazol/Trimetoprim y en el caso de las cepas de *B. subtilis* fueron la serie para Gram positivos PT-34 Multibac con los antibióticos: Ampicilina, Cefalotina, Cefotaxima, Ciprofloxacino, Clindamicina, Dicloxacilina, Eritromicina, Gentamicina, Penicilina, Tetraciclina, Sulfametoxazol/Trimetoprim y Vancomicina. Ambas series de la marca de Investigación diagnóstica.

Las cajas Petri fueron incubadas a temperatura de 37°C para las cepas de *P. aeruginosa* y 28°C para las cepas de *B. subtilis*, ambas por 48 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se midieron los halos de inhibición.

En cuanto a los resultados, estos dependen de la relación que exista entre el tamaño del halo de inhibición y el crecimiento de colonias en el medio de cultivo utilizado, clasificando en tres categorías; sensible, intermedia y resistente según los parámetros obtenidos como se muestran en la tabla 5.

**Tabla 5. Patrones parámetros para halos de inhibición en *P. aeruginosa* y *Acinetobacter spp.***

GRUPO	Antimicrobiano	Carga del disco (µg)	Diámetro del halo de inhibición (mm)			Punto de corte Equivalente a la CMI(µg/ml)		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 Intervalo
			Resistente	Intermedia	Sensible	Resistente	Sensible	
A	Mezlocilina <sup>b</sup> <i>Pseudomonas</i> spp.	75	≤17	18-20	≥21	≥128	≤16	--
	Mezlocilina <i>Acinetobacter</i> spp.	75	≤15	--	≥16	≥128	≤64	19-25
	Ticarcilina <sup>b</sup> <i>Pseudomonas</i> spp.	75	≤14	--	≥15	≥128	≤64	22-28
	Ticarcilina <i>Acinetobacter</i> spp.	75	≤14	15-19	≥20	≥128	≤16	--
	Piperacilina <sup>b</sup> <i>Pseudomonas</i> spp.	100	≤17	--	≥18	≥128	≤64	25-33
	Piperacilina <i>Acinetobacter</i> spp.	100	≤17	18-20	≥21	≥128	≤16	--
	Ceftazidima	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8	22-29
Gentamicina	10	≤12	13-14	≥15	≥8	≤4	16-21	
B	Amp./sulbact. <i>Acinetobacter</i> spp.	10/10	≤11	12-14	≥15	≥32/16	≤8/4	--
	Ticar./clav. <i>Pseudomonas</i> spp.	75/10	≤14	--	≥15	≥128/2	≤64/2	20-28
	Ticar./clav. <i>Acinetobacter</i> spp.	75/10	≤14	15-19	≥20	≥128/2	≤16/2	--
	Piper./tazob. <i>Pseudomonas</i> spp.	100/10	≤17	--	≥18	≥128/4	≤64/4	25-33
	Piper./tazob. <i>Acinetobacter</i> spp.	100/10	≤17	18-20	≥21	≥128/4	≤16/4	--
	Cefepima	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8	24-30
	Cefoperazona	75	≤15	16-20	≥21	≥64	≤16	23-29
	Aztreonam	30	≤15	16-21	≥22	≥32	≤8	23-29
	Imipenem	10	≤13	14-15	≥16	≥16	≤4	27-33
	Meropenem	10	≤13	14-15	≥16	≥16	≤4	20-28
	Amikacina	30	≤14	15-16	≥17	≥32	≤16	18-26
	Tobramicina	10	≤12	13-14	≥15	≥8	≤4	19-25
	Ciprofloxacino	5	≤15	16-20	≥21	≥4	≤1	25-33

Tabla obtenida a partir de Picazo, J. J. de datos del 2000

**Tabla 6. Patrones parámetros para halos de inhibición en *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp.**

GRUPO	Antimicrobiano	Carga del disco (µg)	Diámetro del halo de inhibición (mm)			Punto de corte Equivalente a la CMI(µg/ml)		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 Intervalo
			Resistente	Intermedia	Sensible	Resistente	Sensible	
C	Cefotaxima	30	≤14	15-22	≥23	≥64	≤8	18-22
	Ceftriaxona	30	≤13	14-20	≥21	≥64	≤8	17-23
	Netilmicina	30	≤12	13-14	≥15	≥32	≤12	17-23
	Cloranfenicol	30	≤12	13-17	≥18	≥32	≤8	--
	Trimetoprim/ sulfametoxazol	1,25/23,75	≤10	11-15	≥16	≥8/152	≤2/38	--
D	Carbenicilina <i>Pseudomonas</i> spp.	100	≤13	14-16	≥17	≥512	≤128	18-24
	Carbenicilina <i>Acinetobacter</i> spp.	100	≤19	20-22	≥23	≥64	≤16	--
	Ceftizoxima	30	≤14	15-19	≥20	≥32	≤8	12-17
	Tetraciclina <sup>c</sup>	30	≤14	15-18	≥19	≥16	≤4	--
	Lomefloxacino	10	≤18	19-21	≥22	≥8	≤2	22-28
	Levofloxacino	5	≤13	14-16	≥17	≥8	≤2	19-26
	Norfloxacino	10	≤12	13-16	≥17	≥16	≤4	22-29
	Ofloxacino	5	≤12	13-15	≥16	≥8	≤2	17-21
	Sulfisoxazol <sup>d</sup>	250 o 300	≤12	13-16	≥17	≥350	≤100	--

Tabla obtenida a partir de Picazo, J. J. datos del 2000

#### 5.4 Obtención de metabolitos producidos por *B. subtilis*

Las cepas de *B. subtilis* 49.1, 49.2 y 49.3 fueron inoculadas en 3 mL de medio de cultivo Tris G, fueron incubados con agitación constante a una temperatura de 28°C durante 120 horas, posteriormente para extraer los metabolitos de naturaleza extracelular, los

cultivos fueron microfiltrados con membranas de 0.22  $\mu$  y fueron colocados a pruebas de esterilidad durante 24 horas.

### **5.5 Pruebas de inhibición de los metabolitos de *B. subtilis* en cepas de *P. aeruginosa*.**

Las cepas del género *P. aeruginosa* correspondientes a las número nueve y diez, fueron sembradas en medio LB agar y medio Tris G, para lo cual se colocaron 100  $\mu$ L de un cultivo líquido previamente obtenido de cada cepa, el cual fue inoculado por extensión en placa empleando asa de Digrafsky, 30 minutos posteriores las placas se dividieron en cuatro áreas, tres para los microfiltrados de los metabolitos y uno para el control. De cada uno de los metabolitos microfiltrados se colocaron 20  $\mu$ L, los cuales fueron rotulados con los números 49.1, 49.2 y 49.3 y la letra C para el control negativo, en el cual no se le administró ningún tipo de metabolito por lo que se esperaba un crecimiento de las bacterias.

### **5.6 Extracción de ADN de las cepas de *P. aeruginosa*.**

Se llevó a cabo la extracción de ADN genómico de las cepas utilizadas pertenecientes a *P. aeruginosa* mediante el siguiente protocolo: a partir de cultivos en caja Petri se tomó una asada y se inoculó en tubos que contenían de medio líquido LB, los tubos fueron incubados a 30°C en agitación constante a 200 rpm por 24 horas.

Posteriormente se colocaron 1.5 mL del cultivo de cada cepa en tubos Eppendorf los cuales fueron centrifugados a 11,000 rpm por 5 minutos, posterior a ese tiempo se decantó el sobrenadante, la pastilla se resuspendió en 150 microlitros de buffer de

lisis y 30  $\mu$ l de lisozima, y los tubos fueron colocados en un termoblock durante 30 minutos a una temperatura de 37°, transcurrido el tiempo para complementar el procedimiento de lisis se agregaron 22  $\mu$ L de Sarcosil al 20%. A los tubos se les agregó un volumen de solución Fenol- Cloroformo-Alcohol Isoamílico (V/V), y los tubos se invirtieron suavemente durante 5 minutos aproximadamente, la emulsión se centrifugó por 5 minutos a 11,000 rpm y la fase acuosa fue transferida a otro tubo al cual le fue adicionado nuevamente un volumen de Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico para luego mezclarlo por inversión durante 5 minutos, los tubos fueron centrifugados a 11,000 rpm por 5 minutos y se transfirió la fase acuosa a otro tubo, se les agregó un volumen de cloroformo, los tubos fueron homogenizados por inversión durante 5 minutos, posteriormente fueron centrifugados nuevamente por 5 minutos a 11,000 rpm, la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se repitió nuevamente el paso anterior.

La fase acuosa que contenía el ADN fue transferida a un nuevo tubo al cual se le adicionó un 10% del volumen obtenido de Acetato de Sodio 3M pH 7 y 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Los tubos fueron mantenidos a una temperatura de -20°C durante 10 minutos, para posteriormente centrifugar a 11,000 rpm por 5 minutos.

Finalmente a la pastilla de ADN resultante se le adicionaron 200  $\mu$ L de etanol al 70%, se decantó la fase acuosa y los tubos se dejaron secar.

La pastilla de ADN fue resuspendida en 20  $\mu$ L de agua libre de nucleasas y se almacenó en el ultracongelador a -20°C.

Para confirmar la integridad del ADN se procedió a realizar una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, el gel fue visualizado con luz UV en un transiluminador Maestrogene.

## 5.7 Amplificación por PCR del gen que codifica para la resistencia a sulfonamidas.

Una vez obtenidos los ADNs de las bacterias utilizadas se procedió a realizar la detección por PCR de los genes que codifican la resistencia a sulfonamidas (Sul1, Sul2, Sul3 y Sul4) en cepas de *P. aeruginosa*, con la finalidad de corroborar el fenotipo de resistencia obtenido en los antibiogramas.

Para realizar las reacciones de PCR para la detección de los genes Sul 1, Sul 2, Sul 3 y Sul4 se emplearon los componentes de la tabla 6 para reacciones de 25  $\mu$ L.

**Tabla 7. Componentes para Reacción de PCR para la amplificación de los genes de resistencia a sulfonamidas SUL 1, Sul2, Sul3 y Sul4**

Componentes	Cantidades
Buffer	2.5 $\mu$ L
dNTP's	0.5 $\mu$ L
Primer Forward	0.5 $\mu$ L
Primer Reverse	0.5 $\mu$ L
Taq polimerasa	0.5 $\mu$ L
Agua libre de nucleasa	19.5 $\mu$ L
ADN genómico	1 $\mu$ L

Se emplearon las siguientes condiciones de amplificación:

- Desnaturalización a 94°C por 1:30 minutos
- Alineamiento a 94° por 0:30 segundos
- Hibridación a 55°C por 45 segundos
- Elongación a 72°C por 1 minuto.
- 30 ciclos de amplificación.
- Conservación a 72°C por 4 minutos.

Para visualizar los fragmentos amplificados se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

### 5.8 Amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S

Se realizó la amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S, para lo cual se empleó

ADN de la cepa 39 de *P. aeruginosa* utilizando los primers:

TXBA1	5'AGAGTTTGATCATGGCTCA 3'	100nm STD
TXBA101	5'AGGAGGTGATCCAACCGCA 3'	100nm STD

En la Tabla 8 se muestran los reactivos empleados para la reacción de amplificación, donde se realizó la preparación para el MIX para el volumen final de 25 µL.

**Tabla 8. Componentes para Reacción de PCR para la amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S**

Componentes	Cantidades
ADN genómico	1 µL

Primer TXBA 101	0.5 $\mu$ L
Primer reverse TXBA 1	0.5 $\mu$ L
Buffer TAQ	5 $\mu$ L
Taq polimerasa	0.5 $\mu$ L
Agua libre de nucleasas	17.5 $\mu$

---

Las condiciones de PCR para 30 ciclos:

- 95 °C para 1.30 minutos
- 94 °C para 30 segundos
- 54 °C para 45 segundos
- 55 °C para 2 minutos
- 72 °C para 1 minuto

## 6.- RESULTADOS

### 6.1 Pruebas de resistencia a antibióticos comerciales en cepas *P. aeruginosa* y *B. subtilis*.

Se realizaron pruebas de susceptibilidad o resistencia a antibióticos comerciales a dos cepas de *P. aeruginosa* y tres de *B. subtilis*, los ensayos fueron realizados en tres condiciones nutricionales: Agar TrisG, Agar P y Agar LB, los resultados indicaron que existe una relación entre el tamaño del halo de inhibición y la condición nutricional empleada para el cultivo de las cepas, de acuerdo a los parámetros mostrados en las tablas 5 y 6 en los apartados de materiales y métodos, los microorganismos fueron clasificados en tres categorías: resistentes, sensibles o intermedios.

Para realizar los antibiogramas de las cepas de *P. aeruginosa* y *B. subtilis* empleando antibióticos comerciales en discos para bacterias Gram Negativas y Positivas respectivamente.

Para el caso del medio Tris G, que es un medio de cultivo restrictivo en nutrientes, que contiene principalmente sales, una baja cantidad de glucosa y extracto de levadura, como fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente, los resultados indicaron que las cepas de *P. aeruginosa* fueron resistentes al menos a 7 de 12 antibióticos comerciales, todas las cepas presentaron sensibilidad a la Amikacina (AK), Ciprofloxacino (CPF), Norfloxacino (NOF) y a Gentamicina (GE), algunas cepas mostraron tener resistencia o una resistencia intermedia a Netilmicina (NET) (Tabla 9 y Figura 6).

**Tabla 9. Pruebas de resistencia a antibióticos de cepas de *P. aeruginosa* en medio Tris G.**

Antibiótico	Cepas de <i>P. aeruginosa</i>					
	16	24	27	32	38	39
<b>Ampicilina (AM)</b>	R	R	R	R	R	R
	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h
<b>Amikacina (AK)</b>	S	S	S	S	S	S
R= ≤ 14mm	1.8 cm	2 cm	1.7 cm	1.9 cm	2 cm	1.9 cm
I= 15-16 mm						
S= ≥17						
<b>Carbenicilina (CB)</b>	R	R	R	R	R	R
	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h
<b>Gentamicina(GE)</b>	S	S	S	S	S	S
R= ≤ 12mm	1.7 cm	1.8 cm	1.8 cm	1.6 cm	2 cm	1.7 cm
I= 13-14 mm						
S= ≥15						
<b>Cefalotina (CF)</b>	R	R	R	R	R	R
	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h
<b>Cefotaxima (CFX)</b>	R	R	R	R	R	R
	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h
<b>Netilmicina (NET)</b>	I	I	I	R	I	R
R= ≤ 12mm	1.2 cm	1.4 cm	1.3 cm	1.1 cm	1.4 cm	1.2 cm
I= 13-14 mm						
S= ≥15						

<b>Ciprofloxacino(CPF)</b>	I	S	S	S	I	I
<b>R= ≤ 15mm</b>	1.6 cm	2.5 cm	2.5 cm	2.5 cm	1.8 cm	1.8 cm
<b>I= 16-20 mm</b>						
<b>S= ≥21</b>						
<b>Norfloxacino (NOF)</b>	S	S	S	S	S	S
<b>R= ≤ 12 mm</b>	2 cm	1.8 cm	2 cm	1.7 cm	2 cm	1.7 cm
<b>I= 13-16 mm</b>						
<b>S= ≥17</b>						
<b>Cloranfenicol (CL)</b>	R	R	R	R	R	R
	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h
<b>Trimetropin (STX)</b>	R	S	R	R	R	R
	s/h		s/h	s/h	s/h	s/h
<b>Nitrofurantoína(NF)</b>	R	R	R	R	R	R
	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h

**R = Resistente**

**S = Sensible**

**I = Intermedia**

**s/h = Sin halo de inhibición**

En la Figura 6 se muestran las fotografías de los antibiogramas realizados en cepas de

*P. aeruginosa* en medio de cultivo Tris G.



**a)16**



**b)24**



**c)27**

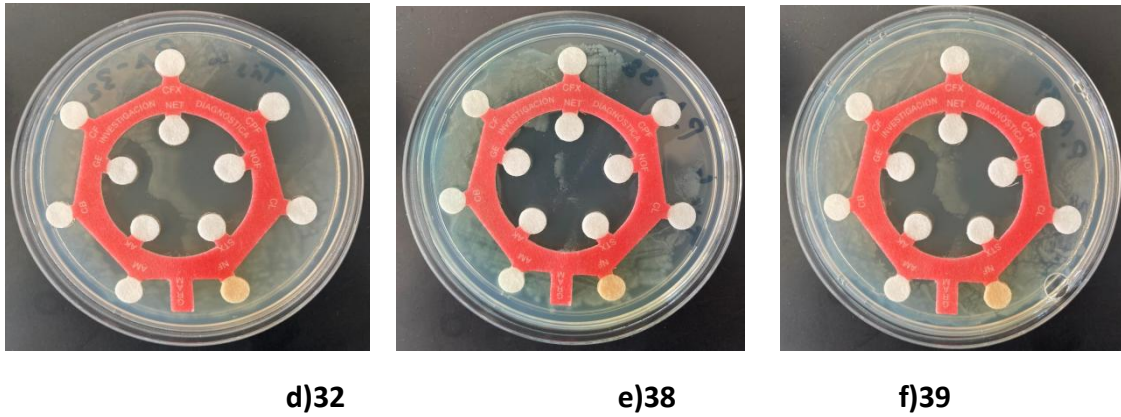


Figura 6. Pruebas de resistencia a antibiótico en cepas de *P. aeruginosa* en medio Tris G.

Se realizó el ensayo de resistencia en el medio Agar P, el cual es un medio rico en nitrógeno y carbono, además contiene glicerol que es empleada como fuente de carbono, este medio es utilizado frecuentemente para la diferenciación entre diferentes especies del género *Pseudomonas*. Con respecto a los resultados de los antibiogramas, se observó que las cepas de *P. aeruginosa* fueron resistentes a 10 de los 12 antibióticos, esto de acuerdo a los parámetros de comparación, las cepas presentaron resistencia intermedia a Gentamicina y sensibilidad a Ciprofloxacino(CPF) y Norfloxacino (NOF) (Tabla 10 y figura 7).

Tabla 10. Pruebas de resistencia a antibióticos de cepas de *P. aeruginosa* en medio Agar P.

Antibiótico	Cepas de <i>P. aeruginosa</i>					
	16	24	27	32	38	39
<b>Ampicilina (AM)</b>	R	R	R	R	R	R
	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h
<b>Amikacina (AK)</b>	R	R	R	R	R	R
<b>R= ≤ 14mm</b>	1 cm	1.2 cm	1 cm	1.2 cm	1.2 cm	1 cm

I= 15-16 mm

S=  $\geq 17$

<b>Carbenicilina (CB)</b>	R	R	R	R	R	R
	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h
<b>Gentamicina(GE)</b>	I	I	I	I	I	I
R= $\leq 12$ mm	1.4 cm	1.3 cm	1.3 cm	1.3 cm	1.3 cm	1.3 cm
I= 13-14 mm						
S= $\geq 15$						
<b>Cefalotina (CF)</b>	R	R	R	R	R	R
	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h
<b>Cefotaxima (CFX)</b>	R	R	R	R	R	R
	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h
<b>Netilmicina (NET)</b>	R	R	R	R	R	R
	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h
<b>Ciprofloxacino(CPF)</b>	S	S	S	S	S	S
R= $\leq 15$ mm	2.3 cm	2.8 cm	2.6 cm	2.9 cm	2.4 cm	2.5 cm
I= 16-20 mm						
S= $\geq 21$						
<b>Norfloxacino (NOF)</b>	S	S	S	S	S	S
R= $\leq 12$ mm	2.5 cm	2.4 cm	2.1 cm	2.5 cm	1.9 cm	2.6 cm
I= 13-16 mm						
S= $\geq 17$						
<b>Cloranfenicol (CL)</b>	R	R	R	R	R	R
	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h
<b>Trimetropin (STX)</b>	R	R	R	R	R	R
	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h

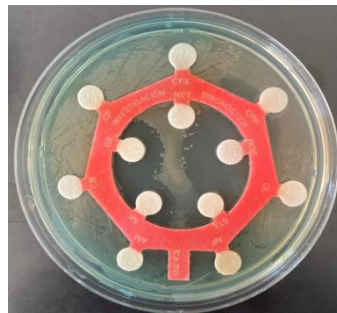
<b>Nitrofurantoina(NF)</b>	R	R	R	R	R	R
	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h	s/h

**R = Resistente**  
**S = Sensible**  
**I = Intermedia**  
**s/h = Sin halo de inhibición**

Los resultados indican que en Agar P se favoreció la producción de piocianina que es un pigmento característico de *P. aeruginosa*, lo cual se aprecia de forma evidente en la figura 7, donde se muestran los resultados de las pruebas de antibiograma comercial en medio Agar P en 6 cepas de *P. aeruginosa*. En este medio las cepas mostraron un comportamiento similar, ya que resultaron ser resistentes o sensibles a los mismos antibióticos (Tabla 11 y figura 7).



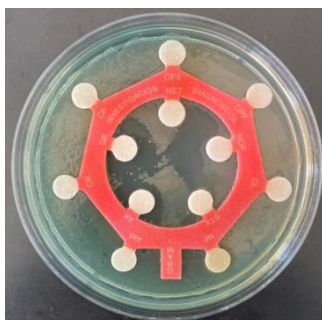
**a)16**



**b)24**



**c)27**



**c)32**



**d)38**



**e)39**

**Figura 7. Pruebas de resistencia a antibiótico en cepas de *P. aeruginosa* en medio Agar P.**

Finalmente en Medio LB, el cual se caracteriza por ser un medio que proporciona la mayoría de los nutrientes necesarios para el desarrollo de una amplia variedad de microorganismos, contiene como fuente de nitrógeno peptona de caseína y extracto de levadura, además de contener cloruro de sodio el cual ayuda al equilibrio osmótico. En este medio al realizar los ensayos de resistencia a antibiótico todas las cepas de *P. aeruginosa* mostraron ser resistentes por lo menos a 8 antibióticos: Ampicilina, Carbenicilina, Cefotaxima, Cloranfenicol, Trimetropin y Nitrofurantóina, y tener una resistencia intermedia o ser sensible a 4 antibióticos (Tabla 12).

**Tabla 12. Pruebas de resistencia a antibióticos de cepas de *P. aeruginosa* en medio LB**

Antibiótico	Cepas de <i>P. aeruginosa</i>					
	16	24	27	32	38	39
<b>Ampicilina (AM)</b>	R	R	R	R	R	R
<b>Amikacina (AK)</b>	R	R	S	R	S	S
R= ≤ 14mm I= 15-16 mm S= ≥17		1.4 cm	1.8 cm		1.7 cm	1.7 cm
<b>Carbenicilina (CB)</b>	R	R	R	R	R	R
<b>Gentamicina(GE)</b>	R	S	S	R	S	S
		1.8 cm	1.6 cm	1.2 cm	1.8 cm	1.6 cm

R= ≤ 12mm

I= 13-14 mm

S= ≥15

<b>Cefalotina (CF)</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>
<b>Cefotaxima (CFX)</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>
<b>Netilmicina (NET)</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>
<b>Ciprofloxacino(CPF)</b>	<b>R</b>	<b>I</b>	<b>S</b>	<b>I</b>	<b>S</b>	<b>S</b>
	<b>0.9 cm</b>	<b>1.8 cm</b>	<b>2.5 cm</b>	<b>1.8 cm</b>	<b>2.5 cm</b>	<b>2.5 cm</b>

R= ≤ 15mm

I= 16-20 mm

S= ≥21

<b>Norfloxacino(NOF)</b>	<b>I</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>S</b>
	<b>1 cm</b>		<b>1.7 cm</b>		<b>1.8 cm</b>	<b>2.3 cm</b>

R= ≤ 12 mm

I= 13-16 mm

S= ≥17

<b>Cloranfenicol (CL)</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>
<b>Trimetropin (STX)</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>
<b>Nitrofurantoína(NF)</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>

---

**R = Resistente**

**S = Sensible**

**I = Intermedia**

**s/h = Sin halo de inhibición**

En la figura 8; Se muestran los resultados de las pruebas de resistencia a antibióticos comerciales en medio Medio LB en 6 cepas de *P. aeruginosa*. Con respecto a la sensibilidad ante los antibióticos probados: cuatro de las cepas fueron sensibles a Gentamicina (GE), tres a Amikacina (AK), Ciprofloxacino(CPF), Norfloxacino (NOF).

En este ensayo las cepas 16 y 32 mostraron tener una gran resistencia a 11 de los 12 antibióticos probados.



a)16

b)24

c)27



d)32

e)38

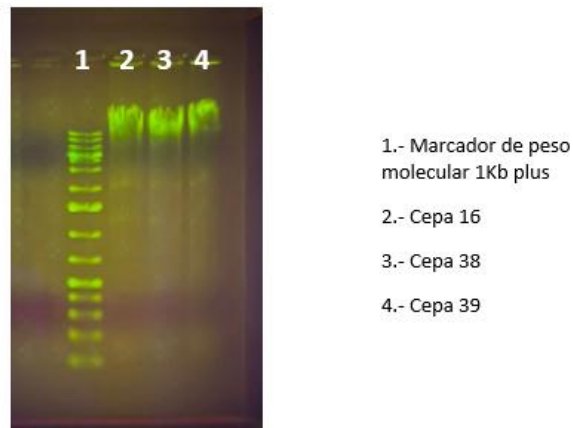
f)39

**Figura 8. Pruebas de resistencia a antibiótico en cepas de *P. aeruginosa* en medio Agar LB.**

En los diferentes medios de cultivo probados se observó que el fenotipo de resistencia o sensibilidad cambió dependiendo de los nutrientes que tengan las bacterias a su disposición en los diferentes medios de cultivos.

## **6.2 Amplificación por PCR de genes de resistencia a antibióticos en cepas de *P. aeruginosa***

Para corroborar la presencia de genes de resistencia en cepas de *P. aeruginosa*, se obtuvieron cultivos de las cepas en medio LB, para posteriormente extraer ADN genómico de acuerdo a la técnica mostrada en materiales y métodos. En la figura 9 se muestran las extracciones de ADN genómico de las cepas 16, 38 y 39.

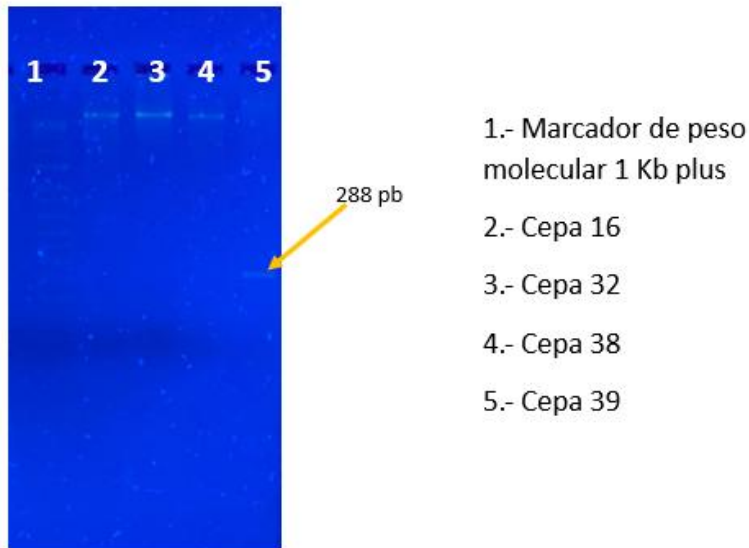


**Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa del ADN genómico de cepas de *P. aeruginosa*.**

Debido a los resultados obtenidos en las pruebas de resistencia a antibióticos, donde las cepas mostraron ser resistentes a Trimetropin-Sulfametoxazol (STX), se decidió realizar la amplificación de los genes que codifican para la resistencia a sulfonamidas.

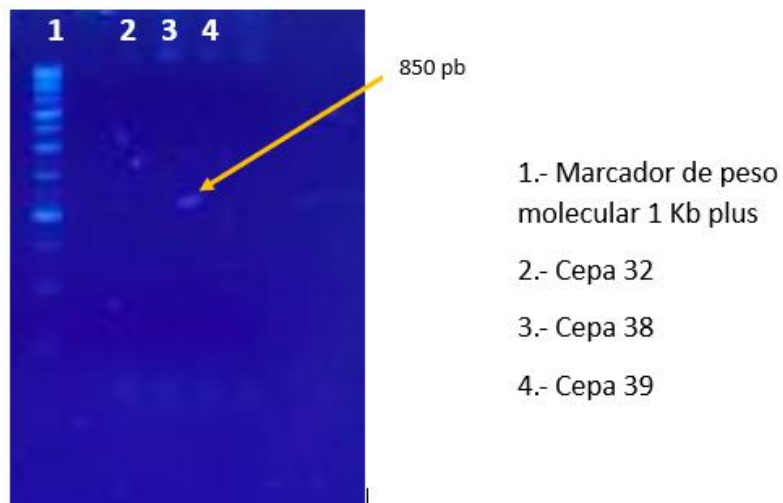
Una vez que se extrajo el ADN genómico de las cepas de *P. aeruginosa* de acuerdo a materiales y métodos, se realizó la detección por PCR de los genes que codifican para la resistencia a sulfonamidas: *Sul1*, *Sul2*, *Sul3* y *Sul4* (Figura 10 y tabla 13).

Los resultados indicaron la amplificación del gen *Sul1* y *Sul2* en la cepa 39 y su ausencia en las otras cepas probadas. El fragmento de amplificación para *Sul1* correspondió a 288 pb.



**Figura 10. Detección por PCR del gen *Sul1* en cepas de *P. aeruginosa*.**

En el caso del gen *Sul2* se obtuvo un amplicón de 850 pb, correspondiente con el tamaño esperado (Figura 11 y tabla 13).



**Figura 11. Detección por PCR del gen *Sul2* en cepas de *P. aeruginosa*.**

Para los genes *Sul3* y *Sul4* , no se mostró amplificación en las cepas probadas (Tabla 13).

**Tabla 13. Detección por PCR del gen *Sul1*, *Sul2*, *Sul3*, *Sul4* en cepas de *P. aeruginosa*.**

Cepa	<i>Sul1</i>	<i>Sul2</i>	<i>Sul3</i>	<i>Sul4</i>
32	-	-	-	-
38	-	-	-	-
39	+	+	-	-

### **6.3 Pruebas de resistencia a antibióticos comerciales en cepas de *B. subtilis*.**

Se realizaron pruebas de resistencia y sensibilidad a antibióticos comerciales a tres cepas de *B. subtilis*, las cuales pertenecen a la colección de microorganismos del Laboratorio de Microbiología 402-EMA6, las cuales en investigaciones previas realizadas se ha demostrado que producen metabolitos secundarios de naturaleza extracelular (Amaya *et.al.*, 2023), capaces de inhibir el desarrollo de hongos fitopatógenos, por lo que resultó interesante evaluar la actividad de su metabolitos contra las cepas de *P. aeruginosa* cuya multirresistencia fue evaluada en este proyecto de investigación, debido al desconocimiento de su fenotipo de resistencia a antibiótico, este fue determinado. Los resultados de las pruebas de resistencia a antibióticos comerciales de las cepas de *B. subtilis* en medio Tris G, muestran que las cepas *B. subtilis* son sensibles a la mayoría de ellos, todas las cepas mostraron ser resistentes a penicilina (PE) (Tabla 14).

**Tabla 14. Pruebas de resistencia a antibióticos de cepas de *B. subtilis* en medio TRIS G**

Antibiótico	Cepas de <i>B. subtilis</i>		
	49.1	49.2	49.3
Ampicilina (AM)	S 1 cm	R	R
Cefalotina (CF)	S 1 cm	R	R
Cefotaxima (CFX)	R	S 1 cm	S 1.5 cm
Tetraciclina (TE)	S 1 cm	R	S 2.3 cm
Dicloxacilina (DC)	S 1 cm	S 1 cm	R
Ciprofloxacino (CPF)	S 1 cm	S 1 cm	S 2.8 cm
Gentamicina (GE)	S 1 cm	S 1 cm	S 1.5 cm
Clindamicina (CLM)	S 1.3 cm	R	R
Eritromicina (E)	S 1 cm	R	R
Trimetoprim (SXT)	S	S	S

	1cm	1 cm	1 cm
Penicilina (PE)	R	R	R
Vancomicina (VA)	S	R	R
	1 cm		

R = Resistente  
S = Sensible  
I = Intermedia  
s/h = Sin halo de inhibición

En la figura 12; se observa claramente el efecto inhibitorio de la mayoría de antibióticos sobre el desarrollo de la cepa 49.1 (10 de 12 antibióticos), en el caso de la cepa 49.2 Y 49.3 se mostraron resistentes a 5 de 12 antibióticos.

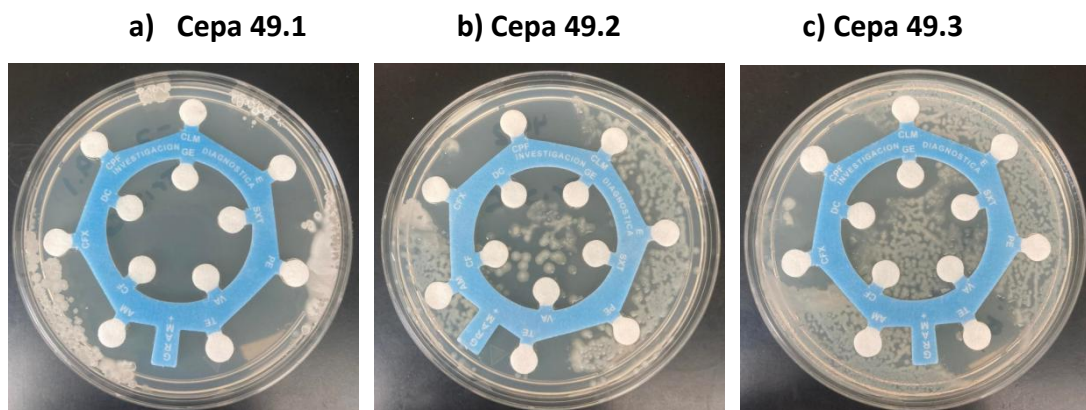


Figura 12. Pruebas de resistencia a antibióticos en cepas de *B. subtilis* en el medio Tris G.

En el caso de las pruebas realizadas en medio LB, los resultados indicaron variaciones en el fenotipo de resistencia a los antibióticos en las tres cepas de *B. subtilis*, todas las cepas fueron resistentes a tres antibióticos: Ampicilina (AM), Cefalotina (CF) y Penicilina (PE).

**Tabla 13. Pruebas de resistencia a antibióticos de cepas de *B. subtilis* en Medio LB**

Antibiótico	Cepas de <i>B. subtilis</i>		
	49.1	49.2	49.3
Ampicilina (AM)	R	R	R
Cefalotina (CF)	R	R	R
Cefotaxima (CFX)	R	R	S 1.5 cm
Tetraciclina (TE)	S 1 cm	S 1.3 cm	S 2.3 cm
Dicloxacilina (DC)	R	R	S 0.6 cm
Ciprofloxacino (CPF)	R	S 1.8 cm	S 1.2 cm
Gentamicina (GE)	S 1.5 cm	S 1.2 cm	S 0.6 cm
Clindamicina (CLM)	R	R	S 1.2 cm
Eritromicina (E)	S 1.6 cm	R	S 0.6 cm
Trimetoprim (SXT)	S 1.5 cm	S 1.2 cm	R

Penicilina (PE)	R	R	R
Vancomicina (VA)	S	R	R
	1 cm		

R = Resistente

S = Sensible

I = Intermedia

s/h = Sin halo de inhibición

En la figura 13; se muestra que la cepa 49.3 presentó una mayor resistencia ante los antibióticos expuestos (7 de 12 antibióticos) en comparación a las cepas 49.1 la cual demostró una resistencia de 5 de los 12 antibióticos empleados y finalmente en el caso de la cepa 49.2 demostró haber sido resistente a 4 de los 12 antibióticos.

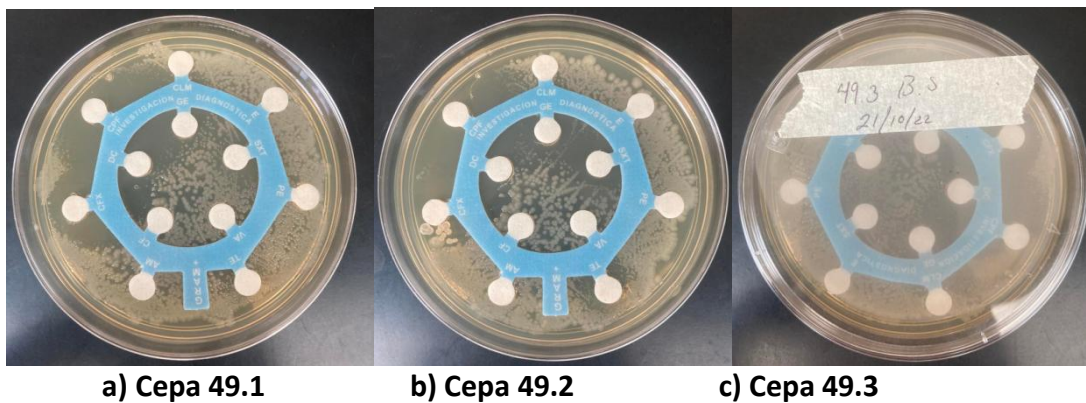


Figura 13. Pruebas de resistencia a antibióticos en cepas de *B. subtilis* en medio LB.

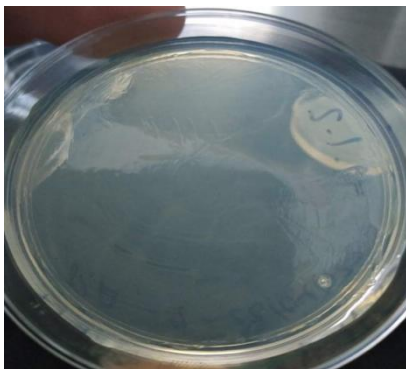
#### 6.4 Prueba de inhibición del ultrafiltrado que contiene los metabolitos de *B. subtilis* contra *P. aeruginosa*

En esta investigación resultó relevante determinar el efecto de los metabolitos extracelulares producidos por cepas de *B. subtilis* en cepas de *P. aeruginosa* (cepas 9 y 10) que como se muestra en esta investigación resultaron ser multirresistentes a antibióticos y comparar si estos metabolitos muestran una inhibición en su desarrollo y

que pudieran ser considerados como una alternativa al manejo de estos microorganismos. Los metabolitos extracelulares fueron recuperados de cultivos de cepas de *B. subtilis* mediante microfiltración en membranas de 0.22  $\mu$ l como es descrito en la sección de materiales y métodos. Los resultados indican que al realizar el ensayo de inhibición de cepas de *P. aeruginosa* con el microfiltrado de los metabolitos de cepas de *B. subtilis*, se observó un crecimiento de *P. aeruginosa* excepto en las áreas donde se aplicaron los metabolitos, observándose un área notable de inhibición en la región administrada como se muestra en la Figura 14 y 15.

En la figura 14; se observa el efecto de la adición de metabolitos en un cultivo de la cepa 10, los metabolitos probados pertenecientes a las cepas 49.1, 49.2 y 49.3, inhibieron el desarrollo de esta cepa en comparación con el control al cual no se le adicionaron metabolitos.

Metabolitos 49.2

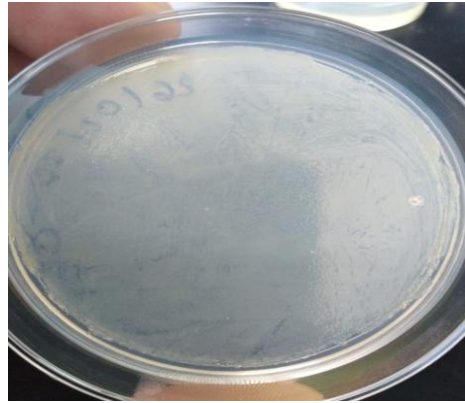
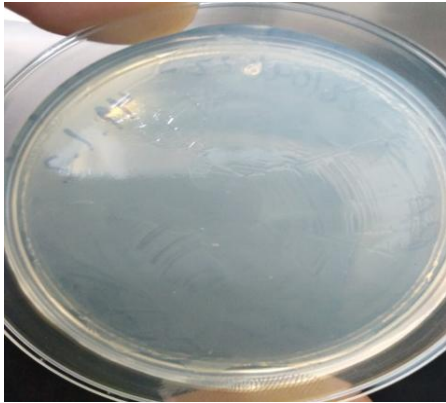


Metabolitos 49.1



Metabolitos 49.3

Control Positivo Cepa 10

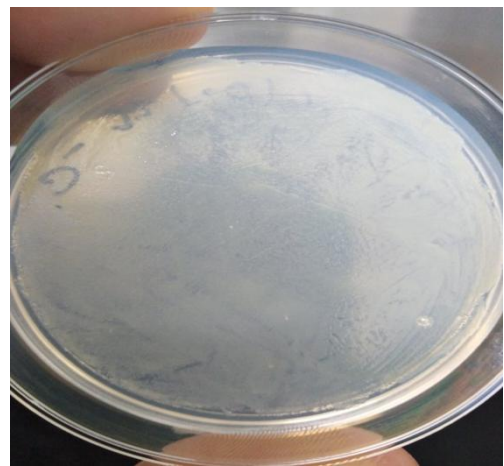
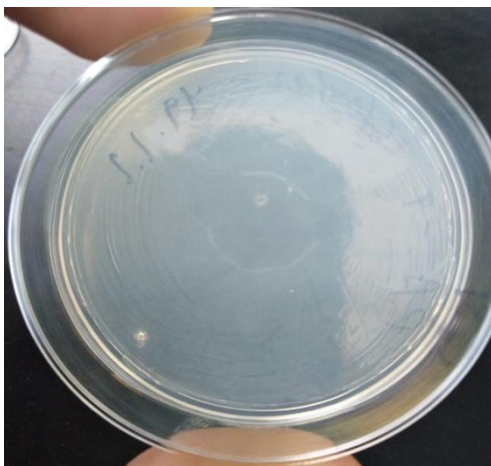


**Figura 14. Análisis del efecto antimicrobiano en cepas de *P. aeruginosa* de los metabolitos producidos por tres cepas de *B. subtilis* en la cepa 10.**

En la figura 15; se observa el efecto inhibitor de los metabolitos en el cultivo de la cepa 9 de *P. aeruginosa* ante los metabolitos de *B. subtilis*.

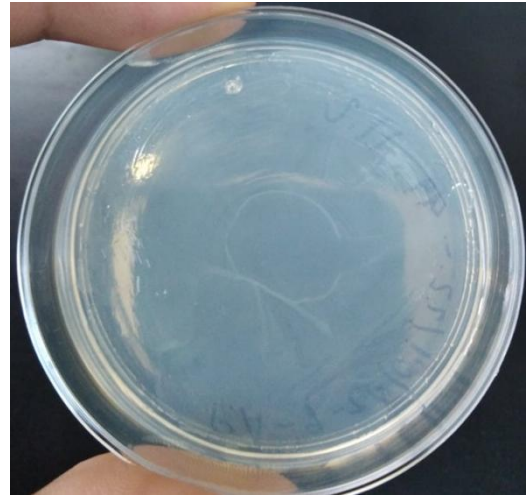
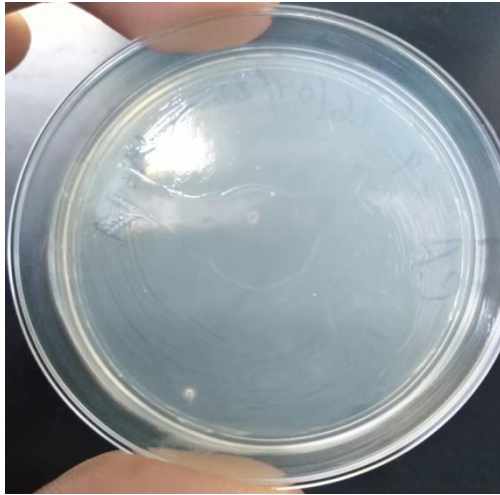
Metabolitos 49.1

Control Positivo Cepa 9



Metabolitos 49.2

Metabolitos 49.3



**Figura 15. Análisis del efecto antimicrobiano en cepas de *P. aeruginosa* de los metabolitos producidos por tres cepas de *B. subtilis* en la cepa 9.**

## 7.- DISCUSIÓN

En los tiempos actuales, debido a la problemática mundial de resistencia antimicrobiana, la cual de acuerdo a diversos autores se ha convertido en una amenaza global que no sólo afectará a la salud humana, también a la animal e incluso alimentaria (Gagetti P *et al.*, 2020), por lo que las investigaciones a nivel mundial son de suma importancia con respecto a la búsqueda de nuevos antimicrobianos como alternativa al tratamiento de estos microorganismos. La resistencia a los antibióticos es cada vez más frecuente, además el tiempo invertido en la recepción de un tratamiento eficaz pueden afectar considerablemente el escenario de evolución de una infección ocasionada por este tipo de microorganismos, lo cual se asocia con peores resultados y mayores tasas de *mortalidad* en pacientes con infecciones de microorganismos multiresistentes a antibióticos.

*P. aeruginosa* es considerada una especie de suma relevancia en el ámbito intrahospitalario, esto debido a su alta resistencia a antibióticos y las complicaciones que esta puede ocasionar (Horcajada J *et al.*, 2019, Tuon F *et al.*, 2022). En este trabajo se realizó la caracterización del fenotipo de resistencia de cepas de *P. aeruginosa*, las cuales fueron aisladas del ambiente natural. En los experimentos de crecimiento y expresión del fenotipo de resistencia a antibiótico en diferentes condiciones nutricionales, se demostró que *P. aeruginosa* tiene un crecimiento adecuado en los diferentes medios de cultivo empleados y que estas bacterias han desarrollado la resistencia ante diversos antibióticos (al menos 8). En estudios recientes, se ha demostrado que la tolerancia y el desarrollo de estrategias contra los antibióticos son cada vez más frecuentes por parte de los microorganismos, ya sea por

la adaptación de estos mismos o debido al mal uso desmedido de los medicamentos (Zhao C *et al.*, 2019). En países con bajos recursos se han observado que la pobreza y la privación material pueden ser factores de riesgo importantes para la aparición y transmisión de la resistencia a los antimicrobianos, estos estudios evidencian que los peores indicadores socioeconómicos estuvieron asociados con las tasas más altas de resistencia a los antimicrobianos (Allel K *et al.*, 2020 ), además de implicar que el tiempo de tratamiento en los casos más graves, será mayor y más costoso por consecuencia (Sistanizad M *et al.*, 2013). Lo anterior afectaría de la siguiente forma: la adquisición del público en general de tratamientos costosos no sería posible y reduciría el grupo de personas que pueden acceder a ellos.

En estudios recientes se ha observado, que es necesario conocer la fisiología microbiana y composición de la estructura celular, por ejemplo de la pared celular bacteriana, para tener una idea clara de los elementos que participan en el fenómeno de resistencia (Chauhan J *et al.*, 2016).

Las Sulfonamidas son antibióticos ampliamente empleados en la medicina debido a sus propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y antifúngicas, además de ser utilizados frecuentemente en la ganadería (Zhao C *et al.*, 2019). En este trabajo se mostró que las cepas empleadas fueron resistentes a las sulfonamidas. Con respecto a la detección por PCR de los genes que codifican para la resistencia a sulfonamidas, se amplificaron los genes *Sul1* y *Sul2* en las cepas 38 y 39 de *P. aeruginosa*.

En los ensayos de resistencia a la exposición de las cepas de *P. aeruginosa* a los metabolitos producidos por cepas de *B. subtilis*, se encontró que en las zonas de aplicación de los metabolitos se inhibió el desarrollo de *P. aeruginosa*. La adición de los

metabolitos de origen microbiano causó además la pérdida del color característico de los pigmentos producidos por *P. aeruginosa*.

A nivel internacional se están realizando esfuerzos para generar conocimiento y prevenir o tratar infecciones que son causadas por *P. aeruginosa* (Moradali M *et al.*, 2017). Las investigaciones han demostrado que es necesario el desarrollo de nuevos antibióticos que sean eficientes contra esta bacteria (Pang Z *et al.*, 2019).

Algunos autores mencionan diversas alternativas para inhibir el desarrollo de esta bacterias por ejemplo el empleo de metabolitos, como se realizó en este trabajo, uso de moléculas con efecto quelante del hierro, uso de terapias con fagos, estas investigaciones suponen que el empleo de metabolitos puede contribuir a reducir los efectos de los factores de virulencia que poseen microorganismos como *P. aeruginosa*. Otras estrategias son: el desarrollo de nuevas vacunas y empleo de nanopartículas y péptidos antimicrobianos (Pang Z *et al.*, 2019). Sin embargo como medida de tratamiento, y el control de las infecciones causadas sólo se usa la terapia combinada de fármacos.

Por lo anterior es necesario seguir investigando las bacterias resistentes a los antibióticos, ya que el entendimiento de la resistencia en este tipo de bacterias es el punto de partida para enfrentarlas, por ejemplo conocer sus mecanismos de infección, elementos moleculares implicados en la interacción con el huésped y por último los medicamentos necesarios a emplear en su tratamiento terapéutico (Lister P *et al.*, 2009).

La principal causa de la resistencia a los antibióticos es el uso excesivo de estos mismos, lo cual influye en la reducción de la eficacia de los tratamientos, para un

manejo integral de la resistencia a antimicrobianos es de vital importancia un cambio en la cultura de su uso.

## 8.- CONCLUSIONES

La resistencia a los antibióticos es un problema preocupante a nivel mundial en la actualidad, que puede desembocar en una crisis de salud, en el presente trabajo se evidenció el fenotipo de multiresistencia a antibióticos de cepas aisladas de ambientes naturales, por lo menos a ocho antibióticos probados, lo cual es de suma relevancia ya que se tiene principalmente información de cepas obtenidas del ámbito intrahospitalario. Esto pone de manifiesto la necesidad del desarrollo de antimicrobianos efectivos.

Por técnicas moleculares como PCR se demostró la presencia de los genes *Sul 1* y *Sul2* que codifican para la resistencia a sulfonamidas, en la cepa 39.

En esta investigación se realizaron pruebas a la exposición de metabolitos producidos por cepas de *B. subtilis* en la inhibición del desarrollo de cepas de *P. aeruginosa*, confirmando que las bacterias *B. subtilis* producen metabolitos que son liberados al medio de cultivo provocando un efecto antagónico, estos metabolitos se encuentran presentes en el microfiltrado libre de células y evitan el crecimiento de otras bacterias, por lo que representan una alternativa de tratamiento en cepas de *P. aeruginosa*.

## 9.- BIBLIOGRAFÍA

Ahmadi, K., Hashemian, A. M., Bolvardi, E., & Hosseini, P. K. (2016). Vancomycin-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa* in the Cases of Trauma. *Medical archives (Sarajevo, Bosnia and Herzegovina)*, 70(1), 57–60. <https://doi.org/10.5455/medarh.2016.70.57-60>

Allel, K., García, P., Labarca, J., Munita, J. M., Rendic, M., Grupo Colaborativo de Resistencia Bacteriana, & Undurraga, E. A. (2020). Socioeconomic factors associated with antimicrobial resistance of *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli* in Chilean hospitals (2008-2017). *Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health*, 44, e30. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.30>

Azam, M. W., & Khan, A. U. (2019). Updates on the pathogenicity status of *P. aeruginosa*. *Drug discovery today*, 24(1), 350–359. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.07.003>

Barbieri, J. T., & Sun, J. (n.d.). *P. aeruginosa* ExoS and ExoT. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 79–92. doi:10.1007/s10254-004-0031-7

Baquero, F., Martínez, J. L., F Lanza, V., Rodríguez-Beltrán, J., Galán, J. C., San Millán, A., Cantón, R., & Coque, T. M. (2021). Evolutionary Pathways and Trajectories in Antibiotic Resistance. *Clinical microbiology reviews*, 34(4), e0005019. <https://doi.org/10.1128/CMR.00050-19>

Bolívar-Vargas AF, Torres-Caycedo MI, Sánchez-Neira Y. Biofilms de *P. aeruginosa* como mecanismos de resistencia y tolerancia a antibióticos. Revisión narrativa. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del Cauca*. 2021;23(2):47-57. <https://doi.org/10.47373/rfcs.2021.v232.1780>

Cady, K. C., Bondy-Denomy, J., Heussler, G. E., Davidson, A. R., & O'Toole, G. A. (2012). The CRISPR/Cas adaptive immune system of *P. aeruginosa* mediates resistance to naturally occurring and engineered phages. *Journal of bacteriology*, 194(21), 5728–5738. <https://doi.org/10.1128/JB.01184-12>

Cady, N. C., McKean, K. A., Behnke, J., Kubec, R., Mosier, A. P., Kasper, S. H., Burz, D. S., & Musah, R. A. (2012). Inhibition of biofilm formation, quorum sensing and infection in *P. aeruginosa* by natural products-inspired organosulfur compounds. *PloS one*, 7(6), e38492. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038492>

Cezard, C., Farvacques, N., & Sonnet, P. (2014). *Chemistry and Biology of Pyoverdines, Pseudomonas Primary Siderophores*. *Current Medicinal Chemistry*, 22(2), 165–186. doi:10.2174/0929867321666141011194624

Chauhan, J., Cardinale, S., Fang, L., Huang, J., Kwasny, S. M., Pennington, M. R., Basi, K., diTargiani, R., Capacio, B. R., MacKerell, A. D., Jr, Opperman, T. J., Fletcher, S., & de Leeuw, E. P. (2016). Towards Development of Small Molecule Lipid II Inhibitors as Novel Antibiotics. *PloS one*, 11(10), e0164515. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164515>

Chávez-Jacobo, Víctor M., and Víctor M. Chávez-Jacobo. "La Batalla Contra Las Superbacterias: No Más Antimicrobianos, No Hay ESKAPE." TIP. Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas, vol. 23, 2020, [www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-888X2020000100201&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-888X2020000100201&script=sci_arttext), <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.202>.

Curran, C. S., Bolig, T., & Torabi-Parizi, P. (2018). Mechanisms and Targeted Therapies for *P. aeruginosa* Lung Infection. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 197(6), 708–727. <https://doi.org/10.1164/rccm.201705-1043SO>

Da Silva, J. B., Jr, Espinal, M., & Ramón-Pardo, P. (2020). Resistencia a los antimicrobianos: tiempo para la acción. *Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health*, 44, e122. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.122>

De Kievit, T. R., Parkins, M. D., Gillis, R. J., Srikumar, R., Ceri, H., Poole, K., Iglewski, B. H., & Storey, D. G. (2001). Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *P. aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(6), 1761–1770. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.6.1761-1770.2001>

De Oliveira, D. M. P., Forde, B. M., Kidd, T. J., Harris, P. N. A., Schembri, M. A., Beatson, S. A., Paterson, D. L., & Walker, M. J. (2020). Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clinical microbiology reviews*, 33(3), e00181-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00181-19>

De Sousa, T., Hébraud, M., Dapkevicius, M., Maltez, L., Pereira, J. E., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Igrejas, G., & Poeta, P. (2021). Genomic and Metabolic Characteristics of the Pathogenicity in *P. aeruginosa*. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 12892. <https://doi.org/10.3390/ijms222312892>

Dhruw, C., Husain, K., Kumar, V., & Sonawane, V. C. (2020). Novel xylanase producing *B. strain X2*: molecular phylogenetic analysis and its application for production of xylooligosaccharides. *3 Biotech*, 10(8), 328. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02322-1>

Díaz, M., Bach, T., González Anta, G., Agaras, B., Wibberg, D., Noguera, F., Canciani, W., & Valverde, C. (2022). Agronomic efficiency and genome mining analysis of the wheat-biostimulant rhizospheric bacterium *Pseudomonas pergaminensis* sp. nov. strain 1008T. *Frontiers in plant science*, 13, 894985. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.894985>

Dogan, B., & Boor, K. J. (2003). Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. *Applied and environmental microbiology*, 69(1), 130–138. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.130-138.2003>

Eberl, L., Winson, M. K., Sternberg, C., Stewart, G. S., Christiansen, G., Chhabra, S. R., Bycroft, B., Williams, P., Molin, S., & Givskov, M. (1996). Involvement of N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia*

liquefaciens. *Molecular microbiology*, 20(1), 127–136. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1996.tb02495.x>

Everett, M. J., Davies, D. T., Leiris, S., Sprynski, N., Llanos, A., Castandet, J. M., Lozano, C., LaRock, C. N., LaRock, D. L., Corsica, G., Docquier, J. D., Pallin, T. D., Cridland, A., Blench, T., Zalacain, M., & Lemonnier, M. (2023). Chemical Optimization of Selective *P. aeruginosa* LasB Elastase Inhibitors and Their Impact on LasB-Mediated Activation of IL-1 $\beta$  in Cellular and Animal Infection Models. *ACS infectious diseases*, 9(2), 270–282. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00418>

Fernández KJ, Chanci IC, Wilches L, Cardona JA. Caracterización de los metabolitos de bacterias ácido lácticas y efecto inhibitor de las bacteriocinas en microorganismos patógenos en alimentos: revisión sistemática de la literatura, 2008-2012. *Revista Biosalud* 2014; 13 (1): 45-61.

Gagetti, P., Pasteran, F., Ceriana, P., Prieto, M., Cipolla, L., Tuduri, E., Bruinsma, N., Galas, M., Ramón-Pardo, P., en representación del Programa Latinoamericano de Control de Calidad en Bacteriología y Resistencia a los Antimicrobianos (LA-EQAS), & Corso, A. (2020). Evolución del desempeño de Laboratorios de Referencia de América Latina en la detección de mecanismos de resistencia a los antimicrobianos [Evolution of the performance of Latin America Reference Laboratories in the detection of mechanisms of antimicrobial resistanceEvolução do desempenho dos Laboratórios de Referência na América Latina na detecção de mecanismos de resistência antimicrobiana]. *Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health*, 44, e42. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.42>

Garboza, F., Frontado, R., Noguera, N., Ávila, H., Ojeda, L., Ramírez, N., Triana, J., & Triana, F. (2011). Uso de medios alternativos a base de hidrolizado de caseína y extracto de *Aspergillus niger* y su efecto sobre la expresión genética de una cepa de *Escherichia coli*. *Boletín Sociedad Venezolana de Microbiología*, 31(2), 138–143. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562011000200010](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562011000200010)

Goldberg, J. B., Hancock, R. E., Parales, R. E., Loper, J., & Cornelis, P. (2008). *Pseudomonas* 2007. *Journal of bacteriology*, 190(8), 2649–2662. <https://doi.org/10.1128/JB.01950-07>

Golpasha, I. D., Mousavi, S. F., Owlia, P., Siadat, S. D., & Irani, S. (2015). Immunization with 3-oxododecanoyl-L-homoserine lactone-rPcrV conjugate enhances survival of mice against lethal burn infections caused by *P. aeruginosa*. *Bosnian journal of basic medical sciences*, 15(2), 15–24. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2015.292>

Gómez Álvarez, C. A., Leal Castro, A. L., Pérez de Gonzalez, M. D. J., & Navarrete Jiménez, M. L. (2005). Mecanismos de resistencia en *P. aeruginosa*: entendiendo a un peligroso enemigo. *Revista de la Facultad de Medicina*, 53(1), 27-34.

Goveas, L. C., Selvaraj, R., Vinayagam, R., Alsaiari, A. A., Alharthi, N. S., & Sajankila, S. P. (2022). Nitrogen dependence of rhamnolipid mediated degradation of petroleum crude oil by indigenous *Pseudomonas* sp. WD23 in seawater. *Chemosphere*, 304, 135235. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135235>

Griffith, S. J., Nathan, C., Selander, R. K., Chamberlin, W., Gordon, S., Kabins, S., & Weinstein, R. A. (1989). The epidemiology of *P. aeruginosa* in oncology patients in a general hospital. *The Journal of infectious diseases*, 160(6), 1030–1036. <https://doi.org/10.1093/infdis/160.6.1030>

Gutiérrez Cárdenas, O. G., Navarro Ibarra, L. F., Loeza Lara, P. D., Río Rodríguez, O. G. D., & Jiménez Mejía, R. (2017). Perfiles de resistencia a antibióticos y metales pesados en *P. aeruginosa* potencialmente patógenas aisladas de agua de uso agrícola. *Nova scientia*, 9(19), 97-112.

Hooper D, Wolfson J. Mecanismos de resistencia bacteriana a las quinolonas. 2ª ed. Washington: Sociedad Americana de Microbiología; 1993.

Horcajada, J. P., Montero, M., Oliver, A., Sorlí, L., Luque, S., Gómez-Zorrilla, S., Benito, N., & Grau, S. (2019). Epidemiology and Treatment of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *P. aeruginosa* Infections. *Clinical microbiology reviews*, 32(4), e00031-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00031-19>

Hunter, S., Williams, N., McDougal, R., Scott, P., & Garbelotto, M. (2018). Evidence for rapid adaptive evolution of tolerance to chemical treatments in *Phytophthora* species and its practical implications. *PloS one*, 13(12), e0208961. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208961>

Ivanova, A. A., Mullaeva, S. A., Sazonova, O. I., Petrikov, K. V., & Vetrova, A. A. (2022). Current research on simultaneous oxidation of aliphatic and aromatic hydrocarbons by bacteria of genus *Pseudomonas*. *Folia microbiologica*, 10.1007/s12223-022-00966-5. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s12223-022-00966-5>

Jain, M., Ramirez, D., Seshadri, R., Cullina, J. F., Powers, C. A., Schulert, G. S., Bar-Meir, M., Sullivan, C. L., McColley, S. A., & Hauser, A. R. (2004). Type III secretion phenotypes of *P. aeruginosa* strains change during infection of individuals with cystic fibrosis. *Journal of clinical microbiology*, 42(11), 5229–5237. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.11.5229-5237.2004>

Jurado-Martín, I., Sainz-Mejías, M., & McClean, S. (2021). *P. aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *International journal of molecular sciences*, 22(6), 3128. <https://doi.org/10.3390/ijms22063128>

Justo, S., Churasacari, T., Elis, C., & Guerra, A. (2016). EFECTO ANTIBIÓTICO DE PIOCIANINA DE *P. AERUGINOSA* SOBRE *ESCHERICHIA COLI* Y *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*. *Revista de Ciencias*, 10. [https://doi.org/10.31381/revista\\_ciencias.v10i0.585](https://doi.org/10.31381/revista_ciencias.v10i0.585)

Kang, D., & Kirienko, N. V. (2018). Interdependence between iron acquisition and biofilm formation in *P. aeruginosa*. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*, 56(7), 449–457. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-8114-3>

Khan, F., Pham, DTN y Kim, YM. Estrategias alternativas para la aplicación de antibióticos aminoglucósidos contra las bacterias patógenas humanas formadoras de

biopelículas. *Appl Microbiol Biotechnol* 104 , 1955-1976 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10360-1>

Köhler, T., Curty, L. K., Barja, F., van Delden, C., & Pechère, J. C. (2000). Swarming of *P. aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *Journal of bacteriology*, 182(21), 5990–5996. <https://doi.org/10.1128/JB.182.21.5990-5996.2000>

Kung, V. L., Ozer, E. A., & Hauser, A. R. (2010). The accessory genome of *P. aeruginosa*. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 74(4), 621–641. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00027-10>

Lau, C. H., Hughes, D., & Poole, K. (2014). MexY-promoted aminoglycoside resistance in *P. aeruginosa*: involvement of a putative proximal binding pocket in aminoglycoside recognition. *mBio*, 5(2), e01068. <https://doi.org/10.1128/mBio.01068-14>

Lister, P. D., Wolter, D. J., & Hanson, N. D. (2009). Antibacterial-resistant *P. aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical microbiology reviews*, 22(4), 582–610. <https://doi.org/10.1128/CMR.00040-09>

Malhotra, S., Hayes, D., Jr, & Wozniak, D. J. (2019). Cystic Fibrosis and *P. aeruginosa*: the Host-Microbe Interface. *Clinical microbiology reviews*, 32(3), e00138-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00138-18>

Maughan, H., & Van der Auwera, G. (2011). B. taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 11(5), 789–797. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.02.001>

Mielko, K. A., Jabłoński, S. J., Milczewska, J., Sands, D., Łukaszewicz, M., & Młynarz, P. (2019). Metabolomic studies of *P. aeruginosa*. *World journal of microbiology & biotechnology*, 35(11), 178. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2739-1>

Moradali, M. F., Ghods, S., & Rehm, B. H. (2017). *P. aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 39. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00039>

Moreno M, C., González E, R., & Beltrán, C. (2009). Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *Revista de Otorrinolaringología Y Cirugía de Cabeza Y Cuello*, 69(2), 185–192. <https://doi.org/10.4067/S0718-48162009000200014>

Morin, C. D., Déziel, E., Gauthier, J., Levesque, R. C., & Lau, G. W. (2021). An Organ System-Based Synopsis of *P. aeruginosa* Virulence. *Virulence*, 12(1), 1469–1507. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1926408>

Mulcahy, L. R., Isabella, V. M., & Lewis, K. (2014). *P. aeruginosa* biofilms in disease. *Microbial ecology*, 68(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0297-x>

Nicolau, C. J., & Oliver, A. (2010). Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28, 19–28. doi:10.1016/s0213-005x(10)70004-5

Ochoa, S. A., López-Montiel, F., Escalona, G., Cruz-Córdova, A., Dávila, L. B., López-Martínez, B., ... & Xicohtencatl-Cortes, J. (2013). Características patogénicas de cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 70(2), 136-150.

Oluwabusola, E. T., Katermeran, N. P., Poh, W. H., Goh, T. M. B., Tan, L. T., Diyaolu, O., Tabudravu, J., Ebel, R., Rice, S. A., & Jaspars, M. (2022). Inhibition of the Quorum Sensing System, Elastase Production and Biofilm Formation in *P. aeruginosa* by Psammaphin A and Bisaprasin. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(5), 1721. <https://doi.org/10.3390/molecules27051721>

Oni, F. E., Esmaeel, Q., Onyeka, J. T., Adeleke, R., Jacquard, C., Clement, C., Gross, H., Ait Barka, E., & Höfte, M. (2022). *Pseudomonas* Lipopeptide-Mediated Biocontrol: Chemotaxonomy and Biological Activity. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(2), 372. <https://doi.org/10.3390/molecules27020372>

Ortiz, A. C., Beltrán, G. R. A., Noriega, F. H. R., & Oviedo, J. L. C. (2007). Resistencia antimicrobiana de *P. aeruginosa* en un hospital de enseñanza del norte de México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 27(2), 44-48.

Overhage, J., Bains, M., Brazas, M. D., & Hancock, R. E. (2008). Swarming of *P. aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. *Journal of bacteriology*, 190(8), 2671–2679. <https://doi.org/10.1128/JB.01659-07>

Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *P. aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology advances*, 37(1), 177–192. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>

Parkins, M. D., Somayaji, R., & Waters, V. J. (2018). Epidemiology, Biology, and Impact of Clonal *P. aeruginosa* Infections in Cystic Fibrosis. *Clinical microbiology reviews*, 31(4), e00019-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00019-18>

Paz-Zarza, V. M., Mangwani-Mordani, S., Martínez-Maldonado, A., Álvarez-Hernández, D., Solano-Gálvez, S. G., & Vázquez-López, R. (2019). *P. aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista chilena de infectología*, 36(2), 180-189.

Picazo, J. J., Cantón, R., Elías, J., Sánchez, G., Luisa, M., Luis, G.-L., Martínez, M., Rodríguez-Avial, C., & Vila, J. (2000). Procedimientos en Microbiología Clínica. Seimc.org.

Pourmand M., Sadighian H., Naderi M. (2015). Relation between expression of the las quorum-sensing system in clinical isolates of *P. aeruginosa* and expression of efflux pump and ampC. *J. Med. Bacteriol.* 2, 32–40. Available online at:

<http://tums.ac.ir/1393/04/18/Sadighian.pdf-mpourmand-2014-07-09-06-33.pdf>  
[Google Scholar]

Qin, S., Xiao, W., Zhou, C., Pu, Q., Deng, X., Lan, L., Liang, H., Song, X., & Wu, M. (2022). *P. aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal transduction and targeted therapy*, 7(1), 199. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01056-1>

Sainz-Mejías, M., Jurado-Martín, I., & McClean, S. (2020). Understanding *P. aeruginosa*-Host Interactions: The Ongoing Quest for an Efficacious Vaccine. *Cells*, 9(12), 2617. <https://doi.org/10.3390/cells9122617>

Samaras, A., Nikolaidis, M., Antequera-Gómez, M. L., Cámara-Almirón, J., Romero, D., Moschakis, T., Amoutzias, G. D., & Karaoglanidis, G. S. (2021). Whole Genome Sequencing and Root Colonization Studies Reveal Novel Insights in the Biocontrol Potential and Growth Promotion by *B. subtilis* MBI 600 on Cucumber. *Frontiers in microbiology*, 11, 600393. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.600393>

Sistanizad, M., Kouchek, M., Miri, M., Goharani, R., Solouki, M., Ayazkhoo, L., Foroumand, M., & Mokhtari, M. (2013). Carbapenem Restriction and its Effect on Bacterial Resistance in an Intensive Care unit of a Teaching Hospital. *Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR*, 12(3), 503–509.

Thi, M., Wibowo, D., & Rehm, B. (2020). *P. aeruginosa* Biofilms. *International journal of molecular sciences*, 21(22), 8671. <https://doi.org/10.3390/ijms21228671>

Tuon, F. F., Dantas, L. R., Suss, P. H., & Tasca Ribeiro, V. S. (2022). Pathogenesis of the *P. aeruginosa* Biofilm: A Review. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 11(3), 300. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030300>

Vadakkan, K., Choudhury, A. A., Gunasekaran, R., Hemapriya, J., & Vijayanand, S. (2018). Quorum sensing intervened bacterial signaling: Pursuit of its cognizance and repression. *Journal, genetic engineering & biotechnology*, 16(2), 239–252. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.07.001>

Verhoeve, V. I., Brammer, J. A., Driscoll, T. P., Kambouris, A. R., Rasko, D. A., Cross, A. S., & Gillespie, J. J. (2022). Genome sequencing of *P. aeruginosa* strain M2 illuminates traits of an opportunistic pathogen of burn wounds. *G3 (Bethesda, Md.)*, 12(5), jkac073. <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkac073>

Vila, J., Alvarez-Martínez, M. J., Buesa, J., & Castillo, J. (2009). Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales [Microbiological diagnosis of gastrointestinal infections]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 27(7), 406–411. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.009>

Winstanley, C., O'Brien, S., & Brockhurst, M. A. (2016). *P. aeruginosa* evolutionary adaptation and diversification in cystic fibrosis chronic lung infections. *Trends in microbiology*, 24(5), 327-337.

Yeung, A. T., Torfs, E. C., Jamshidi, F., Bains, M., Wiegand, I., Hancock, R. E., & Overhage, J. (2009). Swarming of *P. aeruginosa* is controlled by a broad spectrum of transcriptional regulators, including MetR. *Journal of bacteriology*, *191*(18), 5592-5602.

Yoon, E. J., & Jeong, S. H. (2021). Mobile Carbapenemase Genes in *P. aeruginosa*. *Frontiers in microbiology*, *12*, 614058. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.614058>

Zhao, C., Rakesh, K. P., Ravidar, L., Fang, W. Y., & Qin, H. L. (2019). Pharmaceutical and medicinal significance of sulfur (SVI)-Containing motifs for drug discovery: A critical review. *European journal of medicinal chemistry*, *162*, 679–734. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.11.017>