

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ESTUDIO DE ANTAGONISMO DE ACTINOBACTERIAS RARAS DE CUATRO
CIÉNEGAS, COAHUILA

POR


CYNTHIA DÁMARIS CORREA OVIEDO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

2023

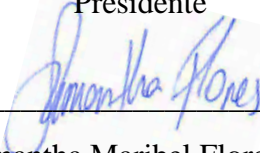
ESTUDIO DE ANTAGONISMO DE ACTINOBACTERIAS RARAS DE CUATRO
CIÉNEGAS, COAHUILA

Comité de Tesis



Dra. Susana De la Torre Zavala

Presidente



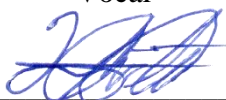
Dra. Samantha Maribel Flores Treviño

Secretaria



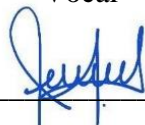
Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal

Vocal



Dr. Hamlet Avilés Arnaut

Vocal



Dra. María Julissa Ek Ramos

Vocal



SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

Dra. Katiushka Arévalo Nino

Subdirectora de Posgrado

ESTUDIO DE ANTAGONISMO DE ACTINOBACTERIAS RARAS DE CUATRO
CIÉNEGAS, COAHUILA

Dirección de Tesis



Dra. Susana De la Torre Zavala

Directora

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos y demás material contenido que sea objeto de producción de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

Financiamiento

Este trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica, PAICYT, UANL. Agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada a título de la estudiante de maestría Cynthia Dámaris Correa Oviedo con número de matrícula 1548211.

AGRADECIMIENTOS

A Carlos, por ser una gran fuente de apoyo, gracias por escucharme, reconfortarme y tu paciencia, sobre todo durante los días difíciles del posgrado.

A mis padres, por siempre estar presentes incitándome a proponerme nuevas metas y a seguir mis sueños, sin las bases que me brindaron no tendría los valores y carácter que me impulsan actualmente.

A mi directora de tesis, la Dra. Susana De la Torre, ya que sin su guía este proyecto no hubiera sido posible. Muchas gracias por su paciencia, sabias palabras y motivación, sobre todo en los momentos de crisis. Gracias por incitarme a intentar nuevas cosas y lograr superarme día con día no solo en el ámbito científico. Bajo su dirección e aprendido a hacer ciencia de corazón y a siempre dar lo mejor de mí.

Al Dr. Hamlet Avilés, por su sabiduría, paciencia, consejos y comida (como líder del team lombricientos). Muchísimas gracias por aceptarme hace unos años como su servicio social, gracias a eso conocí en el laboratorio una segunda familia.

A toda la gran familia del L9 (y ahora L5), gracias a ustedes todos los días en el laboratorio son reconfortantes. No pude haber conocido una mejor familia científica.

A mis hermanos favoritos: Mercedes Cortés y Josué Corona. Meche, los días sin ti en el laboratorio no serían lo mismo ya que contigo todos los días son más amenos, muchas gracias por siempre estar ahí para apoyarme, comprenderme y alimentarme durante mis momentos de crisis, sabes que eres una gran amiga, saranghae!!

Josué, gracias por tu gran amistad, por todos los divertidos momentos, por siempre escucharme, apoyarme y aconsejarme; te admiro mucho y te has convertido en una de mis personas favoritas, muchas gracias!!

A Lucía Aquino, por todos esos momentos de sonseras y risa que pasamos en el laboratorio, en respuesta a la nota pendiente: yo también te quiero, estúpida babosa.

Gracias a Karina López, Janneth Escudero y Carlos Álvarez que a pesar de la distancia o ausencia, de una u otra forma estuvieron durante mi maestría pasando momentos inolvidables, aprecio mucho la amistad de todos y tienen un espacio en mi corazón.

Gracias a todos mis chicos de servicio social que siempre fueron una gran fuente de apoyo en la realización de los experimentos.

Quiero agradecer especialmente a Marisol Cortés quien fue un gran apoyo en la realización de muchos experimentos, juntas pasamos por momentos de planeación, mucho trabajo, frustración y satisfacciones. Muchas gracias por siempre brindarme tu apoyo a pesar de los retos que surgieron durante los experimentos.

DEDICATORIAS

A Carlos por su infinita comprensión y apoyo.

*A mis padres por su amor incondicional
y fuerza para seguir mis metas.*

*A la Dra. Susana y el Dr. Hamlet por
adoptarme académicamente.*

*A todas aquellas personas que me apoyaron
con su amistad, paciencia y comprensión*

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	V
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	VII
RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	2
1. Resistencia a los antibióticos.....	2
1.1 Mecanismos de resistencia a los antibióticos	3
1.2 Importancia mundial y epidemiología de la resistencia antibióticos	6
2. <i>Acinetobacter baumannii</i>	11
3. <i>Staphylococcus spp.</i>	14
3.1 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	14
3.2 <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	15
3.3 <i>Staphylococcus cohnii</i>	15
3.4 <i>Staphylococcus aureus</i>	16
4. Actinobacterias productoras de antibióticos.....	18
4.1. Actinobacterias raras.....	23
5. Biodiversidad de Cuatro Ciénegas, Coahuila.....	28
JUSTIFICACIÓN	32
HIPÓTESIS	33
OBJETIVO DEL TRABAJO	34
MATERIAL Y MÉTODOS	35
1. Material biológico	35
1.1. Bacterias resistentes a antibióticos	35
1.2. Actinobacterias	35
2. Identificación de actinobacterias con actividad antimicrobiana.....	36

2.1 Ensayos de antagonismo por el método de doble capa.....	36
2.2 Ensayos de antagonismo por el método de estría perpendicular	36
3. Producción de metabolitos secundarios bioactivos	37
3.1 Producción de extracto orgánico.....	37
3.2 Producción de extracto liofilizado	37
3.3 Concentración de proteínas.....	37
4. Identificación de los compuestos bioactivos con actividad antimicrobiana.....	38
4.1 Extracto orgánico	38
4.2 Concentrado de proteínas.....	38
5. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM) de los extractos crudos y los compuestos bioactivos	39
6. Caracterización de actinobacterias con actividad antimicrobiana.....	40
6.1 Caracterización morfológica y fisiológica.....	40
6.2 Caracterización genómica de la cepa.....	40
7. Análisis estadístico	42
RESULTADOS.....	43
1. Obtención de un cepario de patógenos multidrogosresistentes	43
2. Determinación de la actividad antimicrobiana de las actinobacterias de Cuatro Ciénegas	45
2.1 Efecto del medio de cultivo en la actividad antimicrobiana	47
3. Producción de metabolitos secundarios bioactivos	49
4. Identificación de los compuestos bioactivos con actividad antimicrobiana.....	50
4.1. Extracto orgánico del aislado CH106	50
4.2. Extracto liofilizado y concentrado proteico del aislado CH606.....	52
5. Caracterización de actinobacterias con actividad antimicrobiana.....	55
5.1 Caracterización morfológica y fisiológica.....	55
5.1 Caracterización genómica.....	60
DISCUSIÓN	65
1. Elaboración y caracterización de un cepario de patógenos multifarmacorresistentes	65
2. Actinobacterias de Cuatro Ciénegas con actividad antagonista contra patógenos multirresistentes.....	66
3. Identificación de los compuestos bioactivos con actividad antimicrobiana.....	68

4. Caracterización de actinobacterias con actividad antimicrobiana.....	70
CONCLUSIONES.....	74
PERSPECTIVAS	76
BIBLIOGRAFÍA.....	77
MATERIAL SUPLEMENTARIO	102

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Categorías y agentes antimicrobianos para definir MDR, XDR y PDR para <i>A. baumannii</i>	11
Tabla 2. Categorías y agentes antimicrobianos para definir MDR, XDR y PDR para <i>Staphylococcus aureus</i>	17
Tabla 3. Antibióticos producidos por actinobacterias.....	19
Tabla 4. Péptidos antimicrobianos producidos por actinobacterias recomendados y aprobados para su venta comercial.....	21
Tabla 5. Clasificación de AMPs producidos por actinobacterias del género <i>Streptomyces</i>	22
Tabla 6. Ejemplos de actinobacterias raras con actividad antimicrobiana.....	26
Tabla 7. Antibióticos producidos por actinobacterias raras recomendados y aprobados para su venta comercial.....	26
Tabla 8. Concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto CH106.....	50
Tabla 9. Concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto CH606.....	52
Tabla 10. Caracterización fisiológica del aislado CH106.....	56
Tabla 11. Caracterización fisiológica del aislado CH606.....	58
Tabla 12. Información general del ensamblaje y anotación de los genomas.....	60
Tabla 13. Análisis de identidad promedio de nucleótidos.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de resistencia a antibióticos.....	4
Figura 2. Formas de transmisión de bacterias resistentes a los antibióticos en los centros de salud y en la comunidad.....	7
Figura 3. Clasificación de bacterias resistentes a los antibióticos.....	9
Figura 4. Umbral aproximado de biosfera rara en una muestra.....	23
Figura 5. Abundancia relativa de familias de actinobacterias raras reportadas en diferentes tipos de muestras.....	24
Figura 6. Familias de actinobacterias productoras de nuevos compuestos bioactivos.....	25
Figura 7. Aislamiento de actinobacterias en CCC.....	29
Figura 8. Reporte de abundancias relativas de microorganismos obtenidos mediante metagenomas de la poza Domos del Arqueano.....	30
Figura 9. Reporte de abundancias relativas de microorganismos obtenidos mediante metagenomas de la laguna intermedia de Churince.....	30
Figura 10. Perfil de resistencia de los aislados clínicos de <i>A. baumannii</i> y <i>Staphylococcus spp</i>	44
Figura 11. Actinobacterias con actividad antimicrobiana contra <i>A. baumannii</i> XDR y <i>Staphylococcus spp.</i> MDR.....	45
Figura 12. Actinobacterias evaluadas con actividad antimicrobiana.....	46
Figura 13. Efecto de los medios de cultivo en la actividad antimicrobiana.....	47
Figura 14. Actinos seleccionados por su actividad antimicrobiana contra <i>A. baumannii</i> XDR y <i>Staphylococcus spp.</i> MDR en distintos medios de cultivo.....	48
Figura 15. Actividad antimicrobiana de los metabolitos secundarios obtenidos a partir de cultivos líquidos.....	49

Figura 16. Ensayo de concentración mínima inhibitoria mediante dilución en placa extracto CH106.....	50
Figura 17. Cromatografía preparativa del extracto orgánico CH106.....	51
Figura 18. Ensayo de concentración mínima inhibitoria mediante dilución en placa extracto CH606.....	52
Figura 19. Efecto de la actividad proteasa y calor en la actividad antimicrobiana del concentrado proteico CH606.....	53
Figura 20. Separación del concentrado proteico por SDS-PAGE.....	54
Figura 21. Perfil de resistencia de los aislados de actinobacterias CH106 y CH606.....	55
Figura 22. Tinción Gram de actinobacterias con actividad antimicrobiana.....	55
Figura 23. Caracterización morfológica de CH106 en medios de cultivo.....	57
Figura 24. Caracterización morfológica de CH606 en medios de cultivo.....	59
Figura 25. BGCs encontrados en el genoma de CH106.....	61
Figura 26. BGCs encontrados en el genoma de CH606.....	62
Figura 27. Árbol filogenético basado en el gen 16S ARNr y en el método de máxima verosimilitud (ML), construido por el modelo evolutivo Tamura-Nei I+G con 1000 réplicas.....	63

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AMPs: Péptidos antimicrobianos

ANI: Identidad promedio de nucleótidos

ARN: Ácido ribonucleico

ARNr: Ácido ribonucleico ribosomal

ARNt: Ácido ribonucleico de transferencia

BGCs: Grupos de genes biosintéticos

BV-BRC: Centro de Recursos de Bioinformática Bacteriana y Viral

CCC: Cuatro Ciénegas, Coahuila

CDC: Centros para el Control y Prevención de Enfermedades

CDS: Secuencias codificantes

CIM: Concentración mínima inhibitoria

CLSI: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio

CONs: Staphylococos Coagulasa Negativo

DKP: lipopéptidos, 2,5- Diketopiperazinas

DMSO: Dimetilsulfóxido

ECDC: Centro Europeo para la prevención y Control de Enfermedades

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EMA: European Medicines Agency

FDA: Food and Drug Administration

GC: Guanina - Citocina

GLASS: Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System

ITU: Infecciones del tracto urinario

kDa: Kilodalton

MALDI-TOF: matrix assisted laser desorption ionization-time off light-mass spectrometry

mBar: Milibar

MDR: Multiple drug resistance

MHA: Mueller Hinton Agar

MHB: Caldo Mueller Hinton

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

NAV: Neumonía asociada a ventilador

NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica

NRPS: Péptido sintetasa no ribosomal

OMS: Organización Mundial de la Salud

ORF: Marco de lectura abierto

PATRIC: Centro de Integración de Recursos de Patosistemas

pb: Pares de bases

PBP's: Proteínas fijadoras de penicilina

PDR: Pandrug resistance

RAST: Anotación Rápida usando Tecnología de Subsistemas

rpm: Revoluciones por minuto

SDS: Dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

T1PKS: Policétido Sintasa Tipo I

T3PKS: Policétido Sintasa Tipo III

TEMED: Tetrametiletilendiamina

TLC: Cromatografía de capa fina

TRIP: Digestión con tripsina

UCI: Unidad de cuidados intensivos

XDR: Extensively drug- resistance

RESUMEN

En los últimos años la búsqueda de nuevos antibióticos ha sido imprescindible debido al aumento de infecciones causadas por bacterias resistentes a antibióticos. Por consiguiente, se ha estudiado el potencial que tienen las actinobacterias para producir metabolitos secundarios como los antibióticos. En este sentido, las actinobacterias raras son consideradas una fuente inexplorada de antibióticos. En Cuatro Ciénegas, Coahuila las actinobacterias representan menos del 0.1 % de la población microbiana, por lo que son consideradas como raras. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue identificar y caracterizar actinobacterias raras de Cuatro Ciénegas, Coahuila productoras de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana contra aislados clínicos multirresistentes a antibióticos.

Mediante ensayos de antagonismo se identificaron 87 aislados productores de compuestos antimicrobianos contra *A. baumannii* XDR y *Staphylococcus spp.* MDR. De estos, se seleccionaron los aislados *Streptomyces sp.*_CH106 y *Streptomyces sp.*_CH606 para la separación y caracterización de los compuestos bioactivos.

El extracto orgánico de *Streptomyces sp.*_CH106 mostró una CIM de 50 mg/ml para *A. baumannii* XDR y *S. aureus* 20-499 MDR, mientras que para *S. epidermidis* 17-1758 MDR fue de 25 mg/ml. Por otro lado, la CMI del extracto liofilizado de *Streptomyces sp.*_CH606 fue de 0.50 mg/ml para *A. baumannii* XDR y 0.25 mg/ml para *S. aureus* 20-499 MDR y *S. epidermidis* 17-1758 MDR. Además, observamos que la actividad inhibitoria de *Streptomyces sp.*_CH606 provino de al menos un compuesto antimicrobiano de naturaleza peptídica, el cual fue resistente a la actividad proteolítica de tripsina y termoestable a 95 °C.

El análisis del metabolismo secundario mostró que *Streptomyces sp.*_106 y *Streptomyces sp.*_606 codifican para 52 y 39 grupos de genes biosintéticos (BGCs) respectivamente, de estos > 80 % no tienen similitud significativa con bases de datos reportadas, lo que sugiere que ambos aislados podrían producir compuestos novedosos.

El conjunto de nuestros resultados reitera el potencial biotecnológico que poseen las actinobacterias de Cuatro Ciénegas, Coahuila para la producción de nuevas moléculas.

ABSTRACT

In recent times, the search for new antibiotics has been essential due to the increase in infections caused by antibiotic-resistant bacteria. Therefore, the potential of actinobacteria to produce secondary metabolites such as antibiotics has been studied. In this respect, rare actinobacteria are considered an unexplored source of antibiotics. In Cuatro Ciénegas, Coahuila, actinobacteria represent less than 0.1% of the total microbial population, so they can be considered as rare. Thus, the aim of this study was to identify and characterize rare actinobacteria from Cuatro Ciénegas, Coahuila that produce secondary metabolites with antimicrobial activity against multi-drug resistant clinical isolates.

Through antagonism assays against *A. baumannii* XDR and *Staphylococcus spp.* MDR, 87 antimicrobial-producing isolates were identified. Of these, the isolates *Streptomyces sp.*_CH106 and *Streptomyces sp.*_CH606 were selected for the separation and characterization of the bioactive compounds.

The organic extract of *Streptomyces sp.* _CH106 showed a MIC of 50 mg/ml for *A. baumannii* XDR and *S. aureus* 20-499 MDR, while for *S. epidermidis* 17-1758 MDR was 25 mg/ml. On the other hand, the MIC of the freeze-dried extract of *Streptomyces sp.*_CH606 was 0.50 mg/ml for *A. baumannii* XDR, and 0.25 mg/ml for both *S. aureus* 20-499 MDR and *S. epidermidis* 17-1758 MDR. In addition, we observe that the inhibitory activity of *Streptomyces sp.* _CH606 came from at least one antimicrobial compound of peptidic nature, which was resistant to trypsin proteolytic activity and heat-stable at 95 °C.

Secondary metabolism analysis showed that *Streptomyces sp.*_106's and *Streptomyces sp.*_606's genomes contain 52 and 39 biosynthetic gene groups (BGCs) respectively. More than 80 % of these BGCs do not show significant similarity with databases, suggesting that both isolates could produce novel compounds.

The above results reiterate the biotechnological potential of actinobacteria from Cuatro Ciénegas, Coahuila, for the production of new molecules.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones causadas por bacterias son comunes entre las comunidades y el ambiente intrahospitalario, pero en muchas ocasiones los tratamientos son ineficaces debido a que las bacterias presentan resistencia a uno o varios antibióticos. Las bacterias son capaces de adquirir resistencia de forma natural, sin embargo, la tasa de resistencia es baja y lenta en comparación con la resistencia adquirida la cual, en los últimos años se ha visto impulsada por factores como sistemas de salud deficientes, el cambio climático y el uso excesivo de antibióticos en la agricultura, ganadería y medicina. La crisis por la resistencia a antibióticos es alarmante y se estima que el número de muertes a causa de infecciones por bacterias resistentes aumente en los próximos años, aunado al limitado descubrimiento y desarrollo de nuevos antibióticos en los últimos años.

En la búsqueda de nuevos antibióticos se ha estudiado el potencial de las actinobacterias como productoras de nuevas moléculas bioactivas. Las actinobacterias son excelentes productoras de metabolitos secundarios de interés biotecnológico y se sabe que el 65 % de los antibióticos utilizados actualmente para el tratamiento de enfermedades infecciosas son obtenidos de éstas, en donde más de 10 mil compuestos provienen del género *Streptomyces*. Sin embargo, el descubrimiento de nuevos antibióticos de actinobacterias también se ha visto limitado, por lo que se propone enfocarse en el estudio de géneros raros. Las actinobacterias raras son aquellas que han sido aisladas con menor frecuencia en ambientes inexplorados y con condiciones extremas. También estudios han reportado que presentan una alta diversidad de metabolitos secundarios que aún no han sido explorados, por lo que son un área prometedora de estudio en la búsqueda de nuevos antibióticos.

El valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila (CCC) cuenta con características físicas y químicas únicas. Estudios realizados en los últimos 20 años muestran que en CCC existen diversos géneros de actinobacterias raras que, debido al aislamiento geográfico y las condiciones extremas, muchas de las especies presentes son endémicas. Estas características hacen que las actinobacterias raras aisladas de CCC pudieran ser potenciales para la búsqueda de nuevos antibióticos contra bacterias multirresistentes.

ANTECEDENTES

1. Resistencia a los antibióticos

El descubrimiento de los antibióticos fue un punto clave en el tratamiento de un gran número de enfermedades infecciosas. En el año de 1930 hasta 1960 se descubrieron y desarrollaron un amplio número de antibióticos, entre ellos la penicilina, descubierta por Alexander Fleming y la estreptomicina, descubierta por Albert Schatz (MacLean & Millan, 2019). Sin embargo, las bacterias han desarrollado mecanismos de resistencia a múltiples antibióticos. La resistencia a antibióticos se puede definir como la “capacidad de un microorganismo de tolerar concentraciones de antibióticos clínicamente relevantes” (Celis *et al.*, 2017). Las bacterias pueden ser resistentes a varios o a todos los antibióticos y algunas únicamente son susceptibles a antibióticos potencialmente tóxicos para los humanos.

Los diferentes grupos de resistencia fueron propuestos por el Centro Europeo para la prevención y Control de Enfermedades (ECDC) y los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) en Estocolmo 2008 y en el transcurso de los años se han ido actualizando para grupos bacterianos específicos (Magiorakos *et al.*, 2012; Suramaiam & Girish, 2020). A continuación, se describen cada uno de los grupos propuestos:

MDR (multiple drug resistance): bacterias resistentes a más de un agente antimicrobiano y en ocasiones también suele utilizarse para describir a aquellas bacterias que son resistentes a tres o más clases de antimicrobianos. Existen bacterias que también son consideradas MDR cuando son resistentes a un agente antimicrobiano clave por su importancia epidemiológica, como es el caso de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) (Basak *et al.*, 2016; MacGowan, 2008).

XDR (extensively drug- resistance): bacterias extremadamente resistentes a los agentes antimicrobianos o extensamente resistentes. Los criterios para caracterizar a las bacterias XDR se basan en el número, clases o subclases de antimicrobianos a los que son resistentes y en la resistencia a uno o más agentes antimicrobianos clave. Anteriormente el término XDR se utilizó para definir aquellas cepas de *Mycobacterium tuberculosis* que eran resistentes a los antibióticos de primera línea (isoniazida y rifampicina) y al menos a

tres fármacos de segunda línea, sin embargo, actualmente el término XDR es utilizado para agrupar a las demás bacterias (Basak *et al.*, 2016).

PDR (pandrug resistance): bacterias resistentes a todos los agentes antimicrobianos aprobados, en ocasiones también suele utilizarse para describir a aquellas bacterias que son resistentes a todos los antimicrobianos utilizados de rutina o resistentes a todas las clases de antimicrobianos disponibles (Magiorakos *et al.*, 2012).

Las categorías de antibióticos que determinan si una bacteria es MDR, XDR o PDR y varía dependiendo la familia, género o especie y hasta la fecha no existe una categoría estándar que pueda ser utilizada. También las categorías están diseñadas para cada grupo de antibióticos relevantes desde el punto de vista terapéutico y aprobados por la US Food and Drug Administration (FDA) y la European Medicines Agency (EMA) (Chokshi *et al.*, 2019; Serra, 2017).

1.1 Mecanismos de resistencia a los antibióticos

La resistencia a antibióticos puede considerarse como un proceso natural de evolución bacteriana, sin embargo, en los últimos años esta resistencia se ha visto acelerada por diversos factores como la superpoblación, la propagación de la vida silvestre, sistemas deficientes de alcantarillado e higiene, la constante exposición a desinfectantes y por el uso excesivo e irresponsable de los antibióticos en la práctica clínica, en la agricultura y ganadería (Celis *et al.*, 2017; Subramaniam & Girish, 2020; Wang *et al.*, 2018).

En las bacterias podemos encontrar dos tipos de resistencia: la intrínseca y la adquirida. La resistencia intrínseca es aquella que probablemente se desarrolló como respuesta natural al ambiente y por lo tanto la resistencia forma parte de la estructura genética central de la bacteria, sin embargo, por lo regular el nivel de resistencia es bajo en comparación con la resistencia adquirida y normalmente está presente en bacterias oportunistas (Gastelo & Maguiña, 2018; Sánchez *et al.*, 2019). Por otro lado, la resistencia adquirida es aquella que se obtiene por la transferencia horizontal de genes, este tipo de resistencia es considerada como amenaza para la salud debido a que es variable y puede llevar al fracaso terapéutico cuando se utilizan antibióticos que supuestamente son eficaces contra un tipo específico de bacterias, pero no para aquellas cepas que adquirieron genes o plásmidos que les confieren resistencia (Serra, 2017; Wang *et al.*, 2018).

Los mecanismos de resistencia podemos dividirlos en dos: mecanismos genéticos de resistencia y en mecanismos bioquímicos de resistencia. La Figura 1 muestra algunos de los mecanismos genéticos y su relación con los mecanismos bioquímicos.

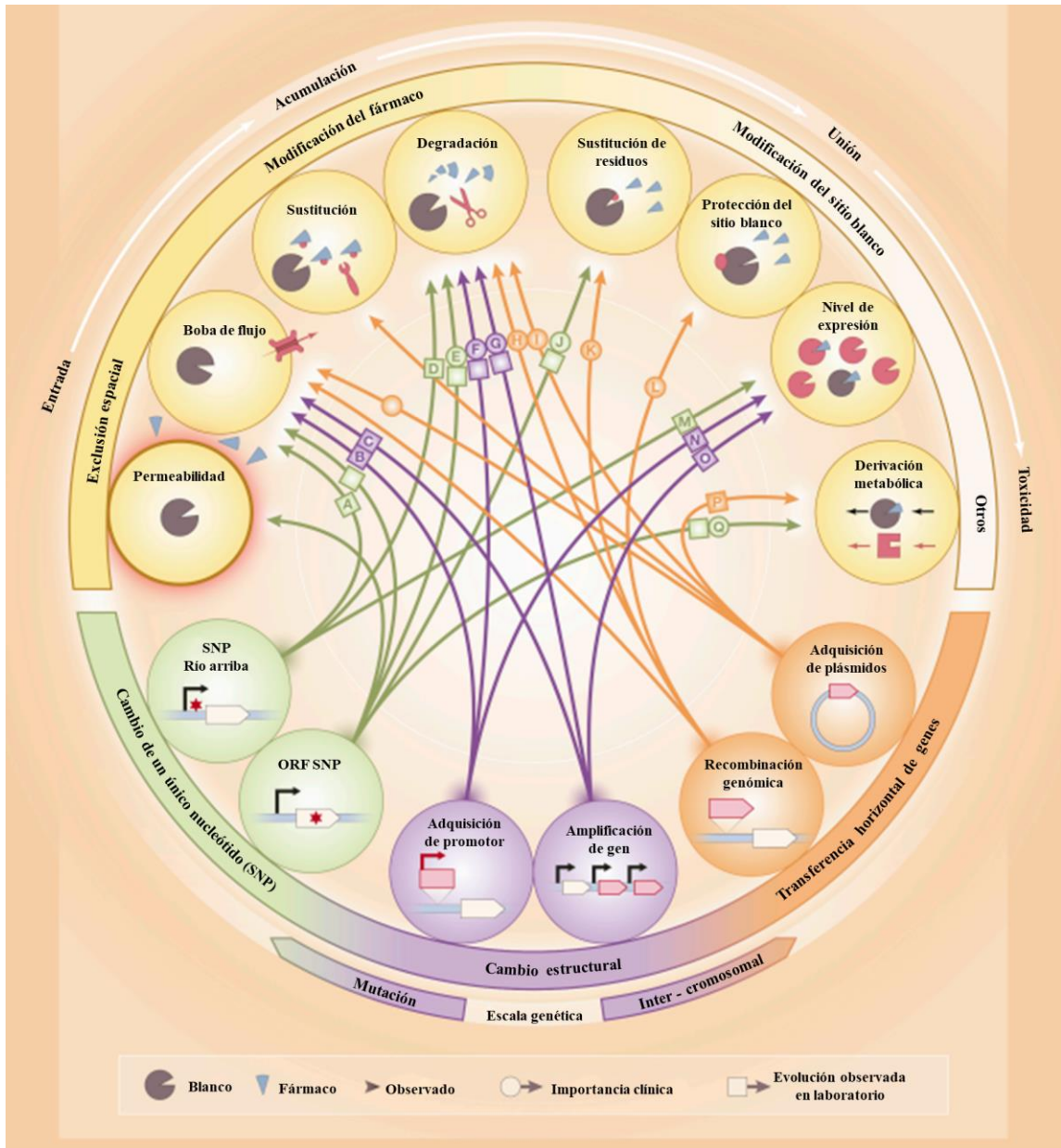


Figura 1. Mecanismos de resistencia a antibióticos (Imagen modificada y traducida del inglés de Yelin & Kishony, 2018).

1.1 Mecanismos genéticos de resistencia

Los mecanismos genéticos ocurren por cambios estructurales y fisiológicos en el material genético por transformación (transferencia de ADN libre extracelular procedente otras bacterias lisadas), transducción (transferencia de ADN cromosómico o plasmídico de una bacteria mediante bacteriófagos), transposición (movimientos de una sección de ADN que codifica para genes de resistencia a antibióticos) y conjugación (intercambio genético entre bacterias por contacto físico entre ellas) (Calderón & Aguilar, 2016; Serra, 2017). Estos mecanismos permiten la adquisición de plásmidos de resistencia a uno o varios antibióticos a la vez y a su vez pueden diseminarse fácilmente entre diferentes especies bacterianas (Munita & Arias, 2016).

También se pueden generar mutaciones cromosómicas al azar o por consecuencia de factores químicos o físicos, estas mutaciones pueden promover la expresión o las mutaciones en marcos de lectura abiertos (ORF) de genes implicados en la resistencia a antibióticos y después esta característica puede ser transmitida a las células hijas por transferencia vertical (Peterson & Kaur, 2018).

1.1.2. Mecanismos bioquímicos de resistencia

Los mecanismos bioquímicos son derivados de uno o varios mecanismos genéticos de resistencia y podemos dividirlos en cuatro:

- **Alteraciones en la permeabilidad:** son las primeras líneas de defensa en donde se previene la entrada o acumulación del antibiótico en la célula. Algunos ejemplos son los cambios en la permeabilidad de la membrana, la cual es común en bacterias Gram negativas, donde la membrana cuenta con una capa de lípidos impermeables de manera que las sustancias hidrofóbicas se quedan atrapadas en las porinas presentes en la membrana, mientras que en Gram positivas las porinas atrapan aquellos antibióticos de gran tamaño como la vancomicina o penicilina (Gastelo & Maguiña, 2018). Otro ejemplo son las bombas de eflujo, estas son capaces de expulsar de forma activa los antibióticos impidiendo su acumulación en el interior de la célula, algunos antibióticos expulsados mediante este mecanismo son los betalactámicos, quinolonas, tetraciclinas y cloranfenicoles (Peterson & Kaur, 2018).

- **Modificación de antibióticos:** los antibióticos pueden ser inactivados enzimáticamente, ya sea por la hidrólisis o por modificaciones no hidrolíticas como acetilaciones, metilaciones o fosforilaciones (como es el caso de las tetraciclinas, cloranfenicol y aminoglucósidos) (Munita & Arias, 2016). Un ejemplo común de inactivación enzimática son las betalactamasas, éstas hidrolizan la unión peptídica endocíclica del anillo beta lactámico, como consecuencia se genera la resistencia a antibióticos como las penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos (Morejón, 2013).
- **Modificaciones en el sitio blanco:** estas modificaciones reducen la afinidad de los antibióticos en los sitios de acción. Algunos ejemplos son girasas implicadas en la resistencia a quinolonas, las enzimas PBP's (proteínas fijadoras de penicilina) que permiten la síntesis y modificación del peptidoglicano, confiriendo resistencia a betalactámicos. Por último, existe la modificación del sitio activo en los ribosomas mediante metilaciones, confiriendo resistencia a los macrólidos como eritromicina y azitromicina (Calderón & Aguilar, 2016).
- **Otros:** existen otros mecanismos como las modificaciones por cambios metabólicos en donde las células son capaces de adquirir vías para la degradación de diversos antibióticos, otro mecanismo es la formación de biopelículas que impiden la penetración de los antibióticos y por lo regular están formadas por bacterias que previamente han desarrollado resistencia a los antibióticos por alguno de los mecanismos anteriormente mencionados (Ortega & Cerón, 2017).

1.2 Importancia mundial y epidemiología de la resistencia antibióticos

Desde 1945 se ha estudiado como las bacterias pueden adaptarse y multiplicarse en presencia de compuestos antimicrobianos (Celis *et al.*, 2017). Sin embargo, los primeros casos de relevancia clínica por resistencia a antibióticos fueron detectados hasta principios del año 1960 en bacterias entéricas pertenecientes a los géneros *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia*, pero fue hasta 1970 cuando la resistencia a antibióticos generó interés en la comunidad médica y científica, ya que se detectaron bacterias resistentes a ampicilina, tetraciclina y cloranfenicol en cepas de *Neisseria gonorrhoeae* y *Haemophilus influenzae* (Chokshi *et al.*, 2019). En la actualidad la resistencia a antibióticos se considera un gran problema a nivel mundial debido a que ésta reduce la efectividad del tratamiento de múltiples enfermedades y por consecuencia se aumentan los casos y tiempos de

hospitalización, generando un mayor riesgo de morbilidad y mortalidad, así como un aumento en los costos de atención médica (Hernando *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2018).

Las bacterias resistentes a antibióticos afectan tanto a países desarrollados y en desarrollo, como ya se mencionó, existen diversos factores que aceleran la resistencia antibióticos en especial el uso indebido en la práctica clínica y la ganadería (Figura 2).

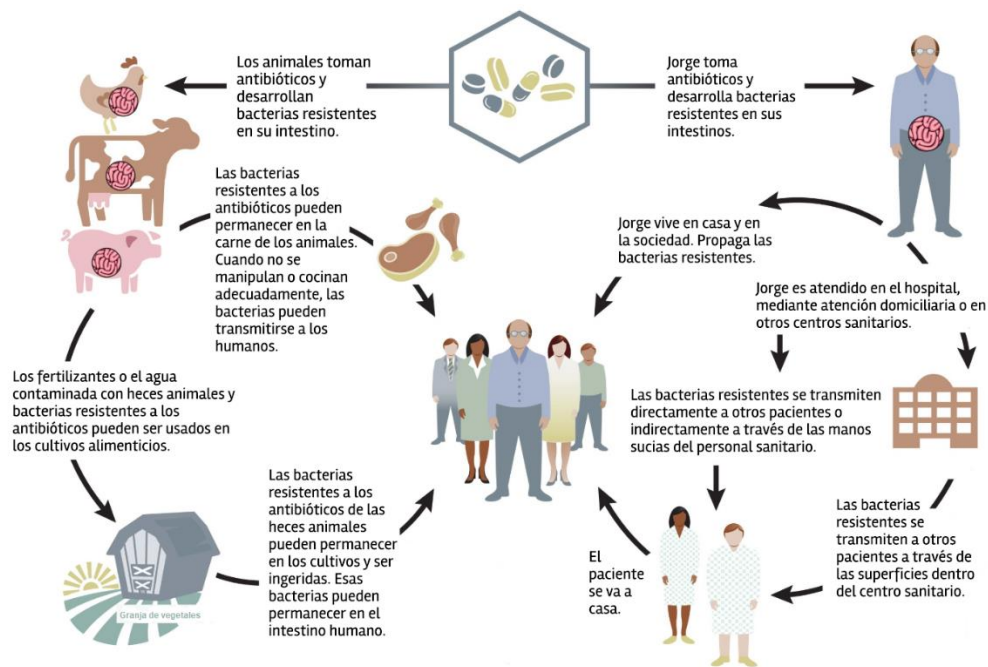


Figura 2. Formas de transmisión de bacterias resistentes a los antibióticos en los centros de salud y en la comunidad (Imagen modificada y traducida del inglés de Makvandi *et al.*, 2020).

En la industria ganadera los antibióticos son irresponsablemente utilizados como suplementos alimenticios y como control de enfermedades, se estima que para el año 2030 exista un aumento del 67 % en el uso de antibióticos en la ganadería en todos los países del mundo densamente poblados o en rápido desarrollo (Van Boeckel *et al.*, 2015). Por otro lado, diversos estudios han demostrado que en el 30 – 50 % de los casos clínicos la elección del tipo de antibiótico, así como el tiempo de administración son inapropiados, añadiendo otros factores impuestos por los pacientes como la interrupción del tratamiento o la automedicación los cuales promueven la resistencia a antibióticos (Read & Woods, 2014; Wang *et al.*, 2018). Además, la emergencia sanitaria que vivimos actualmente por

COVID -19 causada por el virus SARS – CoV-2 está agravando la resistencia a antibióticos, un estudio realizado en Estados Unidos de América reveló que el 72 % de los pacientes con COVID – 19 recibieron antibióticos incluso cuando no estaban clínicamente indicados (Strathdee *et al.*, 2020).

La OMS estima que en los últimos años las enfermedades causadas por bacterias resistentes a antibióticos fueron responsables de más de 700,000 muertes anuales en todo el mundo, de ellas 230,000 causadas únicamente por *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente (Da Silva *et al.*, 2020). Por lo tanto, con el propósito de monitorear la resistencia a antibióticos a nivel mundial desde el 2015 la Organización Mundial de la Salud (OMS) puso en marcha el Sistema de Vigilancia del uso y la resistencia a los antimicrobianos (GLASS por sus siglas en inglés: Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System) y en el 2017 la OMS publicó la lista de patógenos prioritarios resistentes a antibióticos cuyo propósito es incentivar y acelerar la investigación de nuevos antibióticos (Miranda *et al.*, 2020; Shrivastava *et al.*, 2018).

Los patógenos enlistados se dividieron con base 3 prioridades:

- **Prioridad 1 – crítica:** conformada por *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenémicos.
- **Prioridad 2 – elevada:** un ejemplo de este grupo es *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y vancomicina.
- **Prioridad 3 – media:** un ejemplo de este grupo es *Streptococcus pneumoniae* no sensible a penicilina.

En el 2017 también se reportó un metaanálisis de 77 bases de datos internacionales, donde se presentó una lista de prioridad para la búsqueda de nuevos antibióticos contra bacterias multirresistentes (Figura 3). La clasificación se realizó bajo 10 criterios diferentes: tratabilidad, mortalidad, sobre carga de la atención de la salud y la comunidad, tendencia de resistencia en los últimos 10 años, prevalencia de la resistencia, transmisibilidad, canalización y capacidad de prevención en el ámbito de la atención a la salud y comunitario. Los resultados mostraron gran similitud con la lista reportada por la OMS, debido a que las bacterias Gram negativas como *A. baumannii* encabezaron la lista de prioridad (Tacconelli *et al.*, 2018).

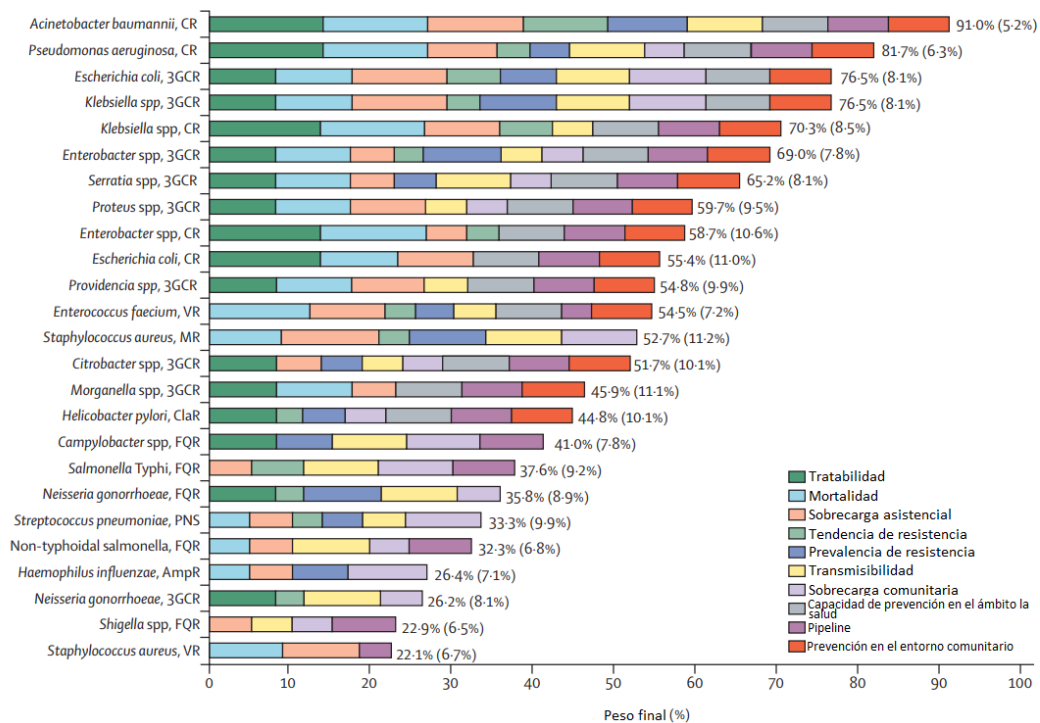


Figura 3. Clasificación de bacterias resistentes a los antibióticos. CR: resistente a carbapenémicos, 3GCR: resistente a cefalosporinas de tercera generación, VR: resistente a vancomicina, MR: resistente a meticilina, ClaR: resistente a claritromicina, FQR: resistente a fluoroquinolonas, PNS: no susceptible a penicilina, AmpR: resistente a ampicilina (Imagen modificada y traducida del inglés de Tacconelli *et al.*, 2018).

En México, en el año 2018 el gobierno mexicano publicó un acuerdo en donde se establecía la Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos y en el mismo año, se creó la Red Temática de Investigación y Vigilancia de la Farmacorresistencia como iniciativa no gubernamental (Garza *et al.*, 2020). Gracias a esta red se han podido recopilar datos de resistencia a antibióticos de más de 47 centros clínicos de 20 estados de la república, tras el análisis de 22,943 cepas procedentes de heces, orina, sangre y otros tejidos se logró identificar cual era la prevalencia de resistencia para cada bacteria patógena con relevancia clínica. Los datos obtenidos mostraron que las bacterias Gram positivas con mayor prevalencia y resistencia fueron *Enterococcus faecalis* (con > 65% de los aislados resistentes a tetraciclina y el 5 % resistente a vancomicina y linezolid) y *S. aureus* (con > 66 % de resistencia a eritromicina y > 44 % para oxacilina), mientras que para las bacterias Gram negativas con mayor prevalencia y resistencia fueron *Escherichia coli* (con 100 % de resistencia a ampicilina y > 30 % a cefalosporinas),

Klebsiella sp. (> 50 % resistencia a cefalosporinas y trimetoprim-sulfametoxazol), *P. aeruginosa* (> 40 % resistencia a carbapenémicos) y *A. baumannii* (> 50 % resistencia a ciprofloxacino y meropenem , > 44 % a gentamicina) (Garza *et al.*, 2020, 2019).

Otros estudios prevén que para el año 2050 las infecciones por bacterias resistentes a antibióticos causaran más de 20 millones de muertes al año, así como grandes pérdidas económicas de más de 100 billones de dólares al año en atención médica para tratar dichas enfermedades, por lo que es necesario la búsqueda de nuevos antibióticos que hagan frente aún a aquellas bacterias que sean consideradas MDR, XDR o PDR (Strathdee *et al.*, 2020; Subramaniam & Girish, 2020).

2. *Acinetobacter baumannii*

A. baumannii fue aislada por primera vez a partir de muestras de suelo por el bacteriólogo Beijerinck en 1911 (Peleg *et al.*, 2008). *A. baumannii* es un patógeno oportunista, cocobacilo, gramnegativo, aerobio, no fermentativo, su temperatura óptima es de 37 °C, pero es capaz de crecer en un rango de 20°C – 44°C (Asif *et al.*, 2018). *A. baumannii* se encuentra ampliamente distribuida en suelo, agua, vegetales, animales, aguas residuales, en el ser humano y hasta en superficies inertes, es capaz de sobrevivir a pH extremos y también cuenta con una amplia gama de mecanismos de resistencia a antibióticos (Asif *et al.*, 2018). En los últimos 15 años la persistencia y el aumento en la tasa de resistencia a antibióticos han convertido a *A. baumannii* en uno de los principales patógenos causantes de infecciones adquiridas en el hospital y en la comunidad a nivel mundial.

Las cepas de *A. baumannii* resistentes a antibióticos se clasifican en MDR, XDR y PDR con base a nueve grupos de agentes antimicrobianos, como se muestra en la Tabla 1. Diversos informes mostraron que en hospitales de Europa, Norteamérica, Suramérica y Asia era común aislar cepas de *A. baumannii* MDR, XDR y PDR, las cuales a menudo estas se propagan entre ciudades y países causando brotes (Hamidian & Nigro, 2019; Pérez *et al.*, 2007). En hospitales es común encontrar a *A. baumannii* en superficies inertes como paredes, puertas, trapeadores, dispositivos electrónicos y dispositivos médicos, prevalece en áreas de pacientes con quemaduras, heridas de piel, cuidados intensivos y hasta en salas generales de hospitales (Galac *et al.*, 2020; Moubareck & Halat, 2020).

Tabla 1. Categorías y agentes antimicrobianos para definir MDR, XDR y PDR para *A. baumannii*. (Traducido del inglés de Magiorakos *et al.*, 2012).

Categoría de agente antimicrobiano	Agente antimicrobiano
Aminoglucósidos	Gentamicina
	Tobramicina
	Amikacina
	Netilmicina
Carbapenémicos antipseudomonadales	Imipenem
	Meropenem
	Doripenem
Fluoroquinolonas antipseudomonadales	Ciprofloxacino
	Levofloxacino

Penicilinas antipseudomonadales + inhibidores de β -lactamasas	Piperacilina – tazobactam
	Ticarciclina – ácido clavulánico
Cefalosporinas de espectro extendido	Cefotaxima
	Ceftriaxona
	Ceftazidima
	Cefepime
Inhibidores de la vía folato	Trimetoprima – sulfametoxazol
Penicilina + inhibidores de β – lactamasas	Ampicilina – sulbactam
Polimixinas	Colistina
	Polimixina B
Tetraciclinas	Tetraciclina
	Doxiciclina
	Minociclina

MDR: no susceptible a ≥ 1 agente en ≥ 3 categorías de antimicrobianos.

XDR: no susceptible a ≥ 1 agente excepto en ≤ 2 categorías.

PDR: no susceptible a todos los agentes antimicrobianos de la lista.

A. baumannii es responsable de un gran número de infecciones entre ellas:

- **Infecciones respiratorias:** en América latina el 80 % de los pacientes con neumonía asociada a ventilador (NAV) presentaban cepas de *A. baumannii* MDR y una tasa de muerte mayor al 50 % de los casos. Mientras que en hospitales de Europa se han identificado pacientes con infecciones respiratorias causadas por *A. baumannii* XDR y PDR con tasas de resistencia a los principales antibióticos recetados como los carbapenémicos (tasa de 100 % de resistencia) y colistina (tasa de 50 % de resistencia) (Maragakis & Perl, 2008; Moubareck & Halat, 2020).
- **Infecciones del torrente sanguíneo:** la tasa de mortalidad por infecciones sanguíneas causadas por *A. baumannii* es > 40 %. También *A. baumannii* es responsable del 68 % de las bacteriemias en pacientes con cáncer, del 13 % de las infecciones de torrente sanguíneo en pacientes sometidos a neurocirugía y del 42 % en pacientes en unidad de cuidados intensivos (UCI), mostrando porcentajes de resistencia a ampicilina, piperacilina (100 %), carbapenémicos (90 %), meropenem (33 %) y ciprofloxacino (44 %) (Moubareck & Halat, 2020).

- **Infecciones en piel y tejidos blandos:** *A. baumannii* está presente en pacientes con quemaduras graves, heridas de piel y traumatismos. Estudios realizados en América del Sur mostraron que en el 21 % de las infecciones de piel estaba presente *A. baumannii* y que el 40 % de las cepas aisladas eran resistentes a carbapenémicos (De Carvalho *et al.*, 2012; Moubareck & Halat, 2020). Otro estudio realizado en China mostró que el 14 % de las infecciones en traumatismos eran causados por *A. baumannii*, mientras que en Estados Unidos un centro médico militar mostró que el 52 % de las heridas causadas en combate estaban infectadas con *A. baumannii* (Hamidian & Nigro, 2019).
- **Infecciones del tracto urinario (ITU):** *A. baumannii* es capaz de causar infecciones en el tracto urinario especialmente en pacientes con catéteres uterinos permanentes. En Corea del Sur el 55 % de las ITU fueron causadas por *A. baumannii* en pacientes de UCI, en donde el 19 % de los aislados fueron resistentes a imipenem, 25 % a meropenem y 17 % a colistina (Moubareck & Halat, 2020).

Las cepas de *A. baumannii* son intrínsecamente resistentes a diversos antibióticos como las amino penicilinas y las cefalosporinas (primera y segunda generación), pero también es capaz de adquirir resistencia a otros antibióticos como los β – lactámicos, tetraciclinas, fluoroquinolonas, aminoglucósidos, macrólidos y polimixinas, mediante varios de los mecanismos previamente descritos, especialmente aquellos relacionados con la alteración en la permeabilidad, la modificación de antibióticos y las modificaciones del sitio blanco.

Debido a la alta prevalencia en hospitales y la fácil adquisición de resistencia a antibióticos en el año 2017 la OMS clasificó a *A. baumannii* como un patógeno de prioridad crítica para el cual que se necesitan con urgencia nuevos antibióticos (Miranda *et al.*, 2020; Shrivastava *et al.*, 2018).

3. *Staphylococcus spp.*

Los estafilococos forman parte de la microbiota normal humana, son abundantes en la piel y en las membranas mucosas, sin embargo, en los últimos años debido a las malas prácticas médicas y a los cambios en las poblaciones, este grupo de bacterias ha generado resistencia a diversos antibióticos. En la actualidad las cepas del género *Staphylococcus* son consideradas como patógenos importantes asociados a infecciones nosocomiales (Jiang *et al.*, 2019).

El género *Staphylococcus* son bacterias con morfología de cocos, grampositiva, catalasa positiva y su temperatura óptima de crecimiento es de 30 – 40 °C (Guo *et al.*, 2020). *S. aureus* fue la primera especie descrita por el cirujano Alexander Ogston en 1880, quién observó que los cocos agrupados en forma de racimos eran la causa de abscesos en pacientes con heridas quirúrgicas y los llamó *Staphylococcus* (Otto, 2004). En la actualidad los estafilococos son considerados como patógenos oportunistas causantes del 30 % de las infecciones nosocomiales en pacientes inmunodeprimidos, neonatos y pacientes con implantes permanentes o cuerpos poliméricos (Xu *et al.*, 2018). Las principales infecciones causadas por estafilococos son de piel, tejidos blandos, torrente sanguíneo, endocarditis infecciosa, osteomielitis, bacteriemia y neumonía mortal (França *et al.*, 2021). El 80 – 90 % de los estafilococos aislados de infecciones nosocomiales son estafilococos coagulasa negativos (CoNS por sus siglas en inglés: Coagulase-negative staphylococci) resistentes a meticilina, las infecciones por CoNS son complicadas de tratar debido a las altas tasas de resistencia a múltiples antimicrobianos (Acheek *et al.*, 2018; Shrestha *et al.*, 2017). Existen más de 40 especies identificadas de CoNS, entre las más importantes son *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* y *Staphylococcus cohnii* (Nasaj *et al.*, 2020).

3.1 *Staphylococcus epidermidis*

Las infecciones por *S. epidermidis* han aumentado desde 1980 y estudios realizados en Europa y Asia muestran que las infecciones causadas por *S. epidermidis* han sido mayor que las provocadas por *S. aureus* (Abu *et al.*, 2020). *S. epidermidis* es responsable del 13 % de las infecciones por endocarditis de válvulas protésicas, 38 % de formación de abscesos intracardíacos y del 24 % de mortalidad a causa de estas infecciones. También

S. epidermidis es responsable del 4.8 % de sepsis en recién nacidos en los primeros 28 días a 4 semanas de vida (Xu *et al.*, 2020). En Norteamérica las cepas de *S. epidermidis* resistentes a antibióticos son responsables de más de 100 mil casos de infecciones hospitalarias con un 10 % de tasa de mortalidad por año (Papan *et al.*, 2021). Las cepas de *S. epidermidis* cuentan con diversos genes cromosómicos y plasmídicos que les confieren resistencia a antibióticos como las tetraciclinas, aminoglucósidos, cefalosporinas, fluoroquinolonas, penicilinas y macrólidos (Chabi & Momtaz, 2019; Espadilha *et al.*, 2019).

3.2 *Staphylococcus haemolyticus*

S. haemolyticus es el segundo agente patógeno aislado con mayor frecuencia en infecciones en la sangre y sepsis causada por CoNS, además es el CoNS con mayor resistencia a antibióticos (Teeraputon *et al.*, 2017). Estudios clínicos han mostrado que el 75 % de los aislados de *S. haemolyticus* mostraban multiresistencia a antibióticos como las cefalosporinas, penicilinas, macrólidos, tetraciclinas, quinolonas y aminoglucósidos (Czekaj *et al.*, 2015; Teeraputon *et al.*, 2017). Estudios mostraron que en Asia y África del Norte el 37 – 41 % de las infecciones por CoNS eran causadas por cepas de *S. haemolyticus*, de las cuales ~ 80 % mostraban resistencia a meticilina (Dziri *et al.*, 2016; Manoharan *et al.*, 2021). En hospitales *S. haemolyticus* también juega un papel importante ya que es responsable de la diseminación de genes de resistencia, contribuyendo a la aparición de cepas epidémicas de otros estafilococos como *S. aureus* (Barros *et al.*, 2012).

3.3 *Staphylococcus cohnii*

S. cohnii está presente en áreas de cuidados intensivos, neonatos, pediatría y áreas generales, es responsable del 8 % de las infecciones asociadas a catéter, piel, tejidos blandos, meningitis, artritis séptica, infecciones urinarias y colecistitis, también se ha relacionado con múltiples abscesos cerebrales en la enfermedad de Weber – Christian (Chen *et al.*, 2015; Motta *et al.*, 2020) *S. cohnii* cuenta con diversos mecanismos de resistencia a antibióticos, en hospitales de Europa y Asia se observaron que el 90 % de las cepas aisladas de *S. cohnii* de UCI eran resistentes a meticilina y que al menos el 43 % de los aislados presentaban multiresistencia a otros antibióticos (Han *et al.*, 2017; Lienen *et al.*, 2021). Otros estudios mostraron que aislados clínicos de *S. cohnii* presentaban altas

tazas de resistencia a ceftriaxona (86 % de los aislados), gentamicina y eritromicina (80 %), levofloxacino y ampicilina (73 %), entre otros antibióticos como amikacina, piperacilina – tazobactam y amoxicilina, ácido clavulánico, y linezolid, mostrando que las cepas de *S. cohnii* pueden considerarse como reservorio peligroso de genes de resistencia a antibióticos (Garza *et al.*, 2011; Mendoza *et al.*, 2017).

3.4 *Staphylococcus aureus*

S. aureus es una bacteria oportunista presente en > 30 % de todos los seres humanos en el sistema respiratorio y piel. También es responsable de infecciones nosocomiales, así como de infecciones adquiridas en la comunidad por el consumo de alimentos mal desinfectados, además, se ha visto que *S. aureus* puede ser transmitido por cucarachas generando brotes infecciosos principalmente en áreas de cocina de escuelas y hospitales (Abdolmaleki *et al.*, 2019; Craft *et al.*, 2019; Yilmaz & Aslants, 2017). *S. aureus* es causante de enfermedades gastrointestinales provocando vomito, náuseas, diarrea y choque tóxico. También es capaz de causar infecciones en piel, tejidos blandos, neumonía mortal y bacteriemia, con una tasa de mortalidad de hasta el 25 % (Bassetti *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2020).

Desde el 2017 la OMS clasificó a *S. aureus* como patógeno de prioridad elevada para la búsqueda de nuevos antibióticos como tratamiento contra cepas MDR, XDR y PDR (Tabla 2). Los reportes de la OMS muestran que, en todo el mundo, el 80 % de las cepas de *S. aureus* aisladas, son resistentes al menos a meticilina (Zhen *et al.*, 2020). En Estados Unidos se estimó que *S. aureus* provocó más de 119 mil infecciones sanguíneas y más de 19 mil muertes asociadas en el año 2017 (Kourtis *et al.*, 2019). En México, aislados clínicos de *S. aureus* de 47 centros médicos mostraron que el 21 % de las cepas presentaban resistencia a meticilina, también se detectó la resistencia a otros antibióticos como linezolid, rifampicina y gentamicina (Garza *et al.*, 2020, 2019). En la actualidad cepas de *Staphylococcus* MDR y XDR son una amenaza a la salud mundial debido a que existen pocas opciones de tratamiento disponibles, dicha amenaza resalta la necesidad urgente en la búsqueda de nuevos antibióticos (Xie *et al.*, 2018).

Tabla 2. Categorías y agentes antimicrobianos para definir MDR, XDR y PDR para *Staphylococcus aureus* (Traducido del inglés de Magiorakos *et al.*, 2012).

Categoría de agente antimicrobiano	Agente antimicrobiano
Aminoglucósidos	Gentamicina
Ansamidas	Rifampicina
Cefalosporinas anti - MRSA	Cettarolina
Anti – β – lactamasas de estafilococos (o cefamicinas)	Oxacilina (o cefoxitina)
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacino Moxifloxacino
Inhibidores de la vía folato	Trimetoprima – sulfametoxazol
Fucidanes	Ácido fusídico
Glucopéptidos	Vancomicina Teicoplanina Telavacina
Gliciliclinas	Tigeciclina
Lincosamidas	Clindamicina
Lipopéptidos	Daptomicina
Macrólidos	Eritromicina
Oxazolidinonas	Linezolid
Fenicoles	Cloranfenicol
Ácidos fosfónicos	Fosfomicina
Streptograminas	Quinupristina – dalfopristina
Tetraciclinas	Tetraciclina Doxiciclina Minociclina

MDR: uno o más criterios pueden aplicarse. a) cepas MRSA siempre se consideran MDR en virtud de ser MRSA. b) no susceptible a ≥ 1 agente en ≥ 3 categorías de antimicrobianos.

XDR: no susceptible a ≥ 1 agente excepto en ≤ 2 categorías.

PDR: no susceptible a todos los agentes antimicrobianos de la lista.

La oxacilina o cefoxitina representan a todos los demás agentes β – lactámicos, la resistencia a cualquiera de estos dos antibióticos predice como no susceptible a todas las categorías de β – lactámicos con excepción de las cefalosporinas anti MRSA.

4. Actinobacterias productoras de antibióticos

Las actinobacterias son productoras de un gran número de productos naturales bioactivos derivados de microorganismos por lo que es interesante estudiar su potencial biotecnológico. Las actinobacterias son bacterias pertenecientes al phylum *Actinomycetota*, son bacilos grampositivos, la mayoría de ellas son aeróbicas, formadoras de esporas y filamentos, están presentes en hábitats marinos y terrestres (Alam & Jha, 2020; Ananda *et al.*, 2016; Dimri *et al.* 2020). Las actinobacterias cuentan con diversos grupos de genes biosintéticos (BGC por sus siglas en inglés: biosynthetic gene cluster) que les permiten la producción de una variedad de metabolitos secundarios, ya se estima que cada cepa es capaz de producir de 10 a 20 metabolitos diferentes como antibióticos, antifúngicos, anticancerígenos y enzimas que pueden ser de gran importancia en la industria farmacéutica (Manivasagan *et al.*, 2014; Martinez *et al.*, 2017; Salwan & Sharma, 2020). Actualmente, más del 65 % de los antibióticos utilizados en el área médica son producidos por actinobacterias y se han descubierto más de 10 mil compuestos bioactivos producidos especialmente por género *Streptomyces* (Lee *et al.*, 2018). La Tabla 3 muestra algunos de los antibióticos producidos por actinobacterias.

Tabla 3. Antibióticos producidos por actinobacterias (Modificado y traducido del inglés de Alam & Jha, 2020).

Antibiótico	Actinomiceto productor	Clase química	Mecanismo de acción
Abisomicinas	<i>Verrucosipora</i> AB-18-032	Policétido policíclico	Inhibidor de la vía PABA (por sus siglas en inglés: Para-aminobenzoic acid)
Ácido clavulánico	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	Cefalosporina C	
Bekanamicina	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Aminoglucósido	Inhibidor de la síntesis de proteínas
Biapenem	<i>Streptomyces cattleya</i>	Carbapenémico	Inhibidor de la síntesis de pared celular
Carbomicina	<i>Streptomyces halstedii</i>	Macrólido	
Cloranfenicol	<i>Streptomyces venezuelae</i>	Acetamida	Inhibidor de la síntesis de proteínas
Clortetraciclina	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Tetraciclinas	
Clindamicina	<i>Streptomyces sp.</i>	Galactooctopiranosido	
Daptomicina	<i>Streptomyces roseosporus</i>	Lipopéptido	Actividad bactericida por modificación de membrana
Eritromicina	<i>Streptomyces erythre</i>	Macrólido	Inhibición de la síntesis de proteínas
Ertapenem	<i>S. cattleya</i>	Tienamicina	Inhibición de la síntesis de pared celular
Fracimina	<i>Streptomyces fradiae</i>	Aminoglucósido	
Gentamicina	<i>Micromonospora purpurea</i>	Aminoglucósido	Inhibición de la síntesis de proteínas
Griseina	<i>Streptomyces griseus</i>	Hexapéptido cíclico	Inhibición de la síntesis de serina-t-RNA
Kanamicina	<i>S. kanamyceticus</i>	Aminoglucósido	
Lincomicina	<i>Streptomyces lincolnensis</i>	Galactooctopiranosido	Inhibición de la síntesis de proteínas
Micromonosporina	<i>Micromonospora sp</i>	Macrólido lactámico	
Miglustat	<i>Streptomyces lavendulae</i>	Nojirimicina	Inhibición de la glucosilceramida sintasa

Tabla 3. (Continuación)

Neomicina	<i>S. fradiae</i>	Aminogluósido	Inhibición de la síntesis de proteínas
Novobiocina	<i>Streptomyces niveus</i> <i>S. spheroides</i>	Aminocoumarina	Inhibición de la síntesis de ADN
Rifampicina	<i>Actinoplanes sp</i>	Glicólípido	Inhibición de la RNA polimerasa
Estreptomina	<i>Streptomyces griseus</i>	Aminogluósido	Inhibición de la síntesis de proteínas
Tigeciclina	<i>Saccharopolyspora</i>	Clortetraciclina	
Vancomicina	<i>Amycolatopsis orientalis</i>	Glucopéptido	Inhibición de la síntesis de pared celular

Un gran número de los antibióticos producidos por las actinobacterias son de origen peptídico y se conocen como péptidos antimicrobianos (AMPs por sus siglas en inglés: antimicrobial peptides). Los AMPs son oligopéptidos conformados por 5 o hasta 100 aminoácidos, sin embargo, los de mayor interés son aquellos conformados por 30 aminoácidos ya que presentan nuevos mecanismos de acción, así como una mayor tolerancia a generar resistencia por bacterias patógenas (Buda *et al.*, 2020; Roque *et al.*, 2021). Los AMPs producidos por las actinobacterias se clasifican en 8 clases diferentes: lipopéptidos, 2,5- Diketopiperazinas (DKP), péptidos diméricos, péptidos de nucleosidilo, péptidos que contienen tioamida, tiopéptidos, péptidos lazo o péptidos lariat y péptidos cíclicos típicos (Zhao *et al.*, 2018). En la Tabla 4. vemos algunos de los AMPs probados por la FDA y recomendados por la OMS para el tratamiento de infecciones por bacterias patógenas y en la Tabla 5. podemos ver algunos de los AMPs descubiertos que son producidos por el género *Streptomyces*.

Tabla 4. Péptidos antimicrobianos producidos por actinobacterias recomendados y aprobados para su venta comercial (Modificado y traducido del inglés de Zhao *et al.*, 2018).

Nombre	Productor	Objetivo	Estado actual
Viomicina	<i>Streptomyces puniceus</i>	Anti-tuberculosis	Vendido comercialmente
Capreomicina	<i>Streptomyces capreolus</i>	Anti-tuberculosis	
Tuberactinomicina	<i>Streptomyces griseoverticillatus</i>	Anti-tuberculosis	Recomendado por la OMS
Vancomicina	<i>A. orientalis</i>	<i>S. aureus</i> MRSA	
Teicoplanina	<i>Actinoplanes teichomyceticus</i>	Bacterias Gram positivas	Aprobado por la FDA
Daptomicina	<i>S. roseosporus</i>	Bacterias Gram positivas	

Tabla 5. Clasificación de AMPs producidos por actinobacterias del género *Streptomyces* (Modificado y traducido del inglés de Joseph *et al.*, 2021).

Clasificación	Nombre	Productor	
Lipopéptidos	Eudistamida B	<i>Streptomyces sp.</i>	
	Kettapeptina		
	Oliomicina A & B		
	Pipalamicina		
	Skilamicina A, B y C		
	Svetamicinas A, C, G		
	Turnagainolida C		
	Ulleungamida A		
	Marfomicinas A – F		<i>Streptomyces drozdowiczii</i>
	Mannopeptidomicina		<i>Streptomyces hydroscopicus</i>
2,5 – DKPs	Glicinocinas A-D	<i>Streptomyces viridochromeges</i>	
	Laspartomicina C		
	Naseazina A, B y C	<i>Streptomyces sp.</i>	
	Pyrocoll		
Sansanmicina B y C			
Cloroptosina	<i>Streptomyces alboflavus</i>		
Tiopéptidos	Thioholgamidas A y B	<i>Streptomyces malaysiense</i>	
	Globimicina	<i>Streptomyces globisporum</i>	
	Goadsporina	<i>Streptomyces sp.</i>	
Val- geninthiocina			
Péptidos lazo	Achromosina	<i>Streptomyces achromogenes</i>	
	Chaxapeptina	<i>Streptomyces leeuwenhoekii</i>	
	Lassomicina	<i>Streptomyces sp.</i>	
	Streptomonomici		
	Sviceucina	<i>Streptomyces sviceus</i>	
Péptidos cíclicos típicos	Ambobactina	<i>Streptomyces ambofaciens</i>	
	Curacomicina	<i>Streptomyces curacoii</i>	
	Glomecidina	<i>Streptomyces lewendulae</i>	
	Desotamida B, E y F	<i>Streptomyces sp.</i>	
	Wollamidas A y B		

A pesar del alto potencial que tienen las actinobacterias para producir antibióticos, las posibilidades de descubrir nuevos metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana son cada vez más difíciles debido a los métodos de selección y aislamiento de cepas de actinobacterias, por ende, es necesario explorar nuevos sitios y buscar protocolos para el aislamiento y selección de otros géneros de actinobacterias menos estudiados (Sharma *et al.*, 2019). Las especies raras de actinobacterias son difíciles de aislar y cultivar, sin embargo, estas podrían representar fuentes únicas de nuevos compuestos biológicamente activos.

4.1. Actinobacterias raras

Las actinobacterias raras son aquellas cepas de actinobacterias que son aisladas con menor frecuencia que las cepas comunes (*Streptomyces spp.*) y forman parte de la biosfera rara, aunque en realidad estas no sean raras en el medio ambiente (Amin *et al.*, 2020). De acuerdo con Lynch y Neufeld (2015), el conjunto de taxones microbiano-viables que se encuentran en una muestra ambiental en un tiempo específico se consideran como biosfera rara y este término está sujeto a umbrales de abundancia relativa de 0.1 % (Figura 4). En ocasiones el término de actinobacterias raras también se utiliza para hacer referencia a aquellos géneros de actinobacterias que no son *Streptomyces* (Benhadi *et al.*, 2019).

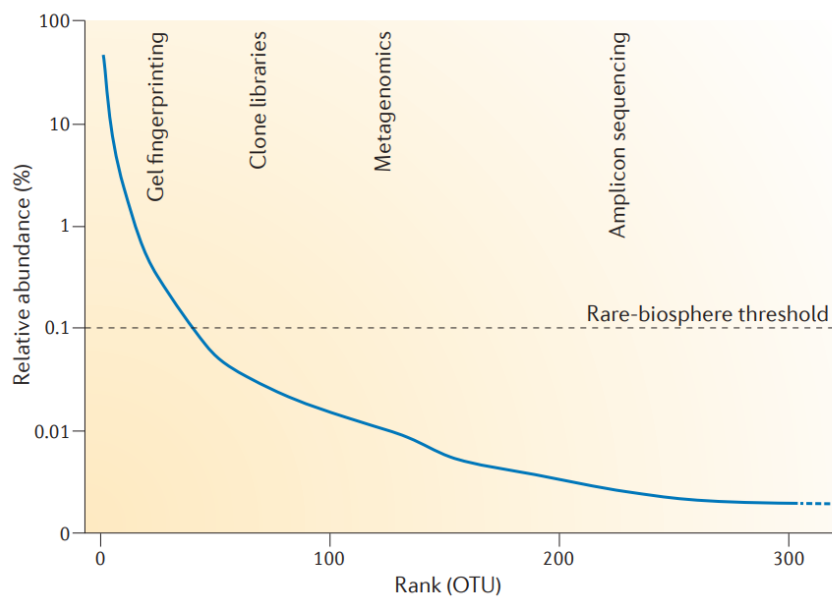


Figura 4. Umbral aproximado de biosfera rara en una muestra. Las abundancias relativas menores a 0.1 % son consideradas como biosfera rara (Lynch & Neufeld, 2015).

Los primeros informes sobre el aislamiento de actinobacterias raras son del año 1970 en donde se aislaron 11 géneros diferentes, después en el 2005 se logró el aislamiento de 100 géneros nuevos y en 2010 se reportó el aislamiento de otras 220 cepas de actinobacterias raras (Subramani & Sipkema, 2019).

En los últimos años el avance en las técnicas metagenómicas ha permitido conocer la presencia de actinobacterias raras, inclusive aquellas que no se han cultivado previamente, mostrando familias de actinobacterias como *Pseudonocardaceae*, *Nocardaceae*, *Micromonosporaceae*, *Streptosporangiaceae* y *Thermomonosporaceae* (Figura 5) (Hui *et al.*, 2021; Jose *et al.*, 2021). Los estudios metagenómicos han brindado información de las posibles características fisiológicas, químicas y estructurales, permitiendo el diseño de nuevos medios de aislamiento selectivos para actinobacterias raras (Bundale *et al.*, 2018; Tiwari & Gupta, 2012). Para el aislamiento de actinobacterias se utilizan diversos enfoques algunos de ellos son el uso de medios de cultivo con bajos nutrientes, pretratamientos químicos (uso de fenol, antibióticos, SDS, entre otros), físicos (altas o bajas temperaturas, uso de perlas de vidrio, centrifugación, etc.), tiempos y temperaturas de incubación (Tiwari & Gupta, 2012). El uso de estos enfoques ha permitido el aislamiento de 177 nuevas especies, 33 familias (3 de ellas nuevas) y 29 géneros nuevos de actinobacterias en los últimos 10 años (Subramani & Sipkema, 2019).

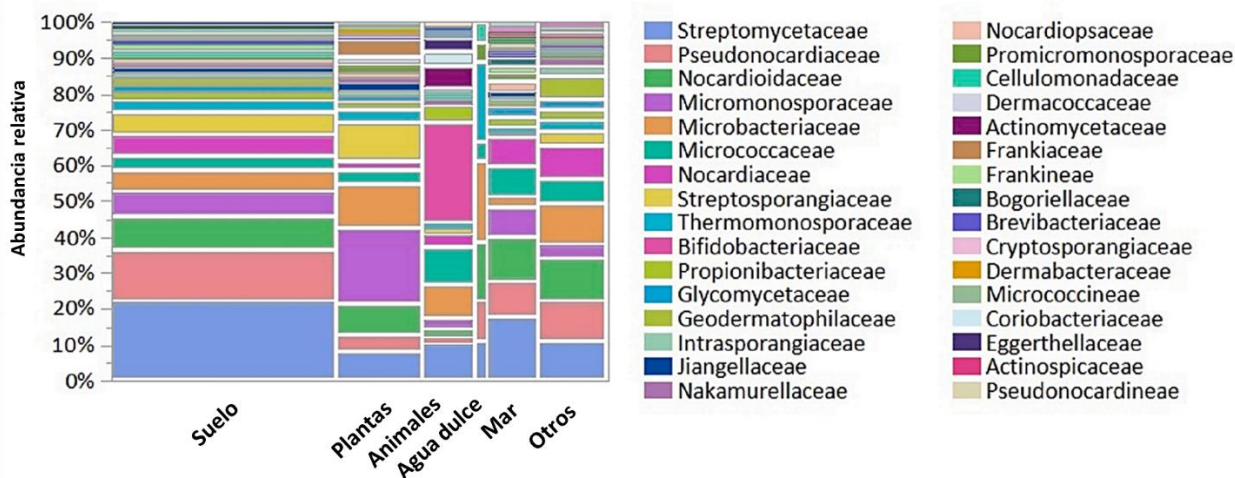


Figura 5. Abundancia relativa de familias de actinobacterias raras reportadas en diferentes tipos de muestras (Imagen modificada y traducida del inglés de Jose *et al.*, 2021).

Las actinobacterias son productoras de nuevos compuestos antimicrobianos, hasta el año 2017 se habían reportaron 267 nuevos compuestos bioactivos producidos principalmente por actinobacterias pertenecientes a las familias *Nocardiaceae*, *Pseudonocardineae*, *Micromonosporaceae*, *Streptosporangiaceae* y *Thermomonosporaceae* (Figura 6). Así como 58 géneros diferentes de actinobacterias, entre ellos *Salinispora*, *Verrucosispora*, *Nocardiopsis*, *Actiinoalloteichus*, *Marinispora* y *Micromonospora* (Amin *et al.*, 2020; Jose *et al.*, 2021; Subramani & Spikman, 2019).

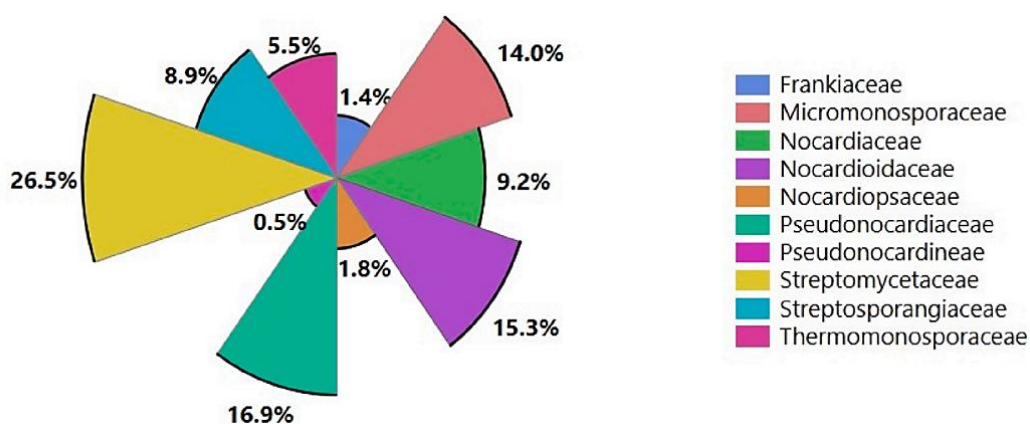


Figura 6. Familias de actinobacterias productoras de nuevos compuestos bioactivos (Jose *et al.*, 2021).

Estudios reportados muestran que los antimicrobianos producidos por las actinobacterias raras cuentan con actividad contra un gran número de bacterias patógenas grampositivas y negativas e inclusive contra levaduras de importancia clínica como *Candida albicans* (Tabla 6.) (Adam *et al.*, 2018; Long *et al.*, 2019; Hui *et al.*, 2021). Además, actualmente ya existen diversos antibióticos que han sido aprobados para su uso y venta comercial para el tratamiento de infecciones (Tabla 7).

Tabla 6. Ejemplos de actinobacterias raras con actividad antimicrobiana (Modificado y traducido del inglés de Núñez & Barrientos, 2018).

Nombre	Actividad antagónica
<i>Arthrobacter sp</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter johnsonii</i> , <i>Xanthomonas oryzae</i> , <i>Candida sp.</i> , <i>Cryptococcus sp.</i> , <i>Enterococcus faecium</i> .
<i>Brevibacterium sp</i>	<i>S. aureus</i> , <i>Candida albicans</i>
<i>Demetria sp</i>	<i>S. aureus</i>
<i>Gordonia sp</i>	<i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i>
<i>Gordonia terrae</i>	<i>E. coli</i> , <i>M. luteus</i> , <i>P. mirabilis</i>
<i>Janibacter sp.</i>	<i>S. aureus</i>
<i>Janibacter thuringensis</i>	<i>C. albicans</i>
<i>Kocuria sp</i>	<i>Salmonella paratyphi</i> , <i>Salmonella enteritidis</i>
<i>Lapillicoccus sp.</i>	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>
<i>Leifsonia soli</i>	<i>E. coli</i>
<i>Micromonospora sp.</i>	<i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>X. oryzae</i>
<i>Nesterenkonia sp.</i>	<i>C. albicans</i>
<i>Nocardioides sp</i>	<i>S. aureus</i>
<i>Rhodococcus sp</i>	<i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Candida sp.</i> , <i>Cryptococcus sp.</i>
<i>Rhodococcus fascians</i>	<i>E. coli</i> , <i>M. luteus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>P. mirabilis</i>
<i>Terrabacter lapilli</i>	<i>S. paratyphi</i> , <i>S. enteritidis</i>

Tabla 7. Antibióticos producidos por actinobacterias raras recomendados y aprobados para su venta comercial (Modificado y traducido del inglés de Subramani, & Sipkema, 2019).

Nombre	Clase	Productor	Actividad
Dalbancina	Glucopéptido	<i>Nonomuria sp</i>	Bacterias grampositivas
Fidaxomicina	Tiacumicina	<i>Dactylosporangium aurantiacum</i>	
Oritavancina			
Telavancina	Glucopéptidos	<i>A. orientalis</i>	
Vancomicina			
Telithromicina	Macrólido	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	Bacterias grampositivas y negativas

Estos resultados muestran que existe un alto potencial y diversidad de compuestos antimicrobianos producidos por las actinobacterias raras que no han sido analizados, por lo que los géneros raros representan un área de estudio prometedora para la búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos.

5. Biodiversidad de Cuatro Ciénegas, Coahuila

Las actinobacterias raras han sido aisladas de sedimentos marinos, agua de mar, manglares y también de hábitats terrestres, se ha visto que los entornos inexplorados y extremos son fuentes de actinobacterias raras (Subramani & Sipkema, 2019).

El valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila (CCC) se encuentra ubicado en medio del desierto de Chihuahua, en el norte de México a más de 730 metros sobre el nivel del mar y cerca de la Sierra de San Marcos; en él, existen un gran número de pozas naturales, lagunas y ríos que son considerados como área de Protección de Flora y Fauna. Las condiciones ambientales de CCC son áridas debido a la alta variabilidad de precipitación anual, que en general representa sólo el 8 %, mientras que la temperatura varía a lo largo de los años con fríos extremos durante el invierno y calor extremo durante el verano, debido a esto la mayoría de las pozas naturales están conformadas por aguas subterráneas profundas con influencia magmática (Souza *et al.*, 2018, 2012). Por otro lado, las condiciones químicas de las pozas de CCC son inusuales ya que son pobres en nutrientes y presentan un gran desbalance estequiométrico en nutrientes como el carbono, nitrógeno y el fósforo, en donde las proporciones de estos últimos puede ser 157:1 (Falcón *et al.*, 2007; López *et al.*, 2013).

En los últimos 20 años se ha estudiado la diversidad procariota presente en CCC y por medio de estudios evolutivos se ha visto que CCC cuenta con un gran número de especies endémicas. Debido al aislamiento geográfico, condiciones de temperatura, pH y nutrientes las comunidades bacterianas se han desarrollado a niveles de especiación inusual al resto del planeta e inclusive las comunidades en una poza son completamente diferentes a las que existen en otra, aún a escasos metros de distancia (Arocha *et al.*, 2017; Bonilla *et al.*, 2012; Cerritos *et al.*, 2008; Escalante *et al.*, 2009).

La diversidad microbiana de actinobacterias fue demostrada por Arocha y colaboradores (2017), quienes a partir de 6 puntos de muestreo reportaron el aislamiento de 350 actinobacterias con morfologías y características nutricionales diferentes (Figura 7 B y C). Además, la secuenciación del gen 16 S de 105 aislados mostró la presencia de 11 géneros de actinobacterias diferentes, entre ellos, algunos géneros raros como *Nocardia*, *Nocardiopsis*, *Arthrobacter* y *Micrococcus* (Figura 7 A). También, tras realizar el análisis

filogenético se encontró que un gran número de estos aislados se agrupaban en clados únicos sugiriendo un endemismo. Años después, Álvarez (2021) reportó el aislamiento de 98 actinobacterias utilizando 5 medios con distintas fuentes de nutrientes, así como diferentes pretratamientos y condiciones de crecimiento como $\text{pH} \leq 7$ y ≥ 8 .

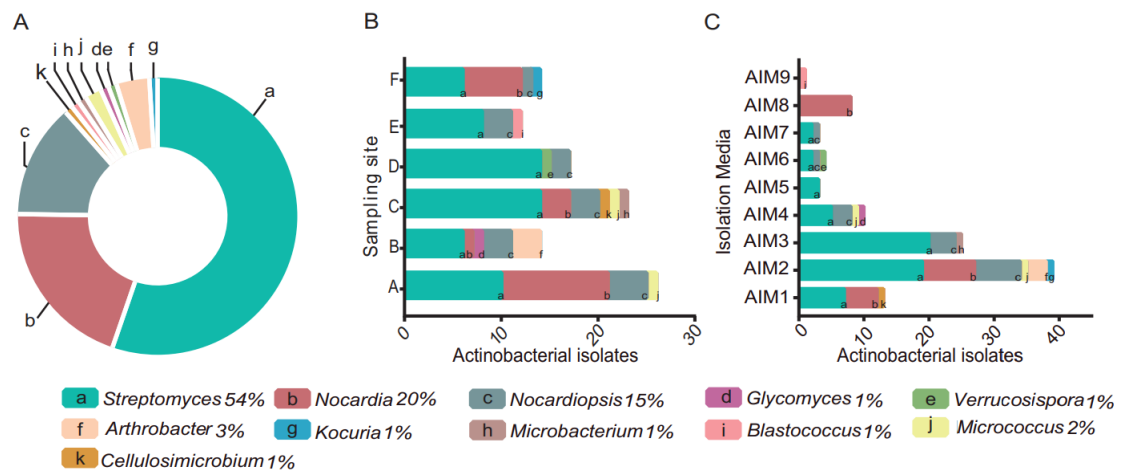


Figura 7. Aislamiento de actinobacterias en CCC. (A) Gráfica pastel con porcentajes de géneros de actinobacterias aisladas de la laguna intermedia de la poza Churince. (B) Número de actinobacterias aisladas según los sitios de muestreo. (C) Número de actinobacterias aisladas según los medios de cultivo utilizados. (Imagen y texto traducido del inglés de Arocha *et al.*, 2017).

Estudios de metagenomas previamente reportados mostraron que en la poza Doms del Arqueano (Figura 8) y la laguna intermedia de Churince (Figura 9) las actinobacterias se encontraban en una abundancia relativa menor al 0.1 % e inclusive en algunos casos la abundancia relativa llegaba a ser menor de 0.01 % considerándose como biosfera ultra rara (De Anda *et al.*, 2018; Espinosa *et al.*, 2022). Estos reportes muestran de forma general que las actinobacterias presentes en CCC son raras.

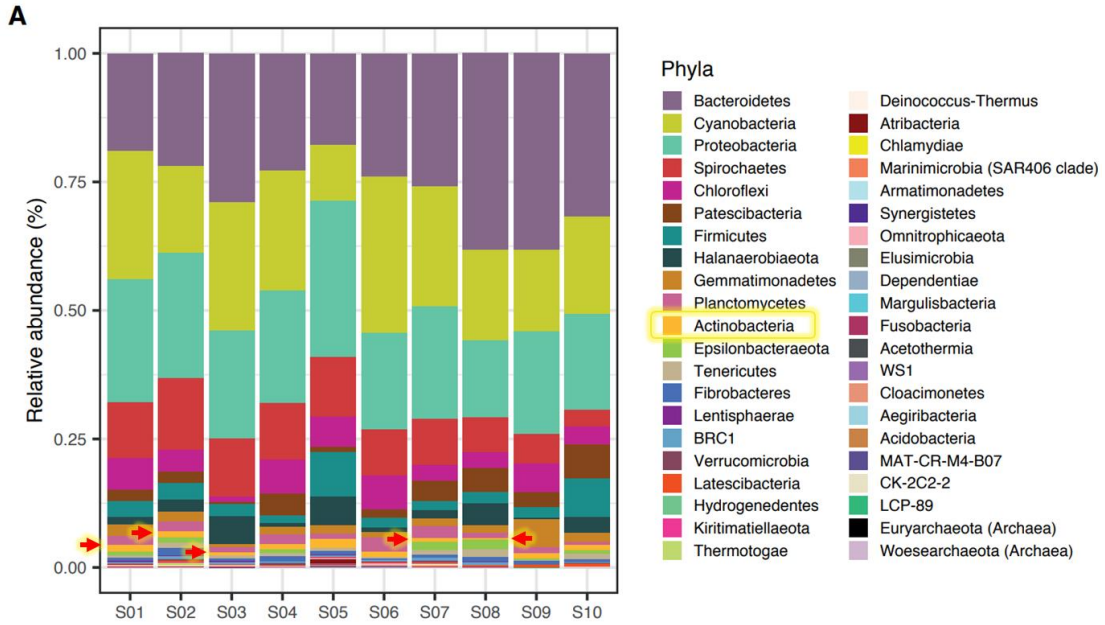


Figura 8. Reporte de abundancias relativas de microorganismos obtenidos mediante metagenomas de la poza Domos del Arqueano. Las flechas en color rojo y amarillo indican las actinobacterias encontradas (Imagen modificada de Espinosa *et al.*, 2022)

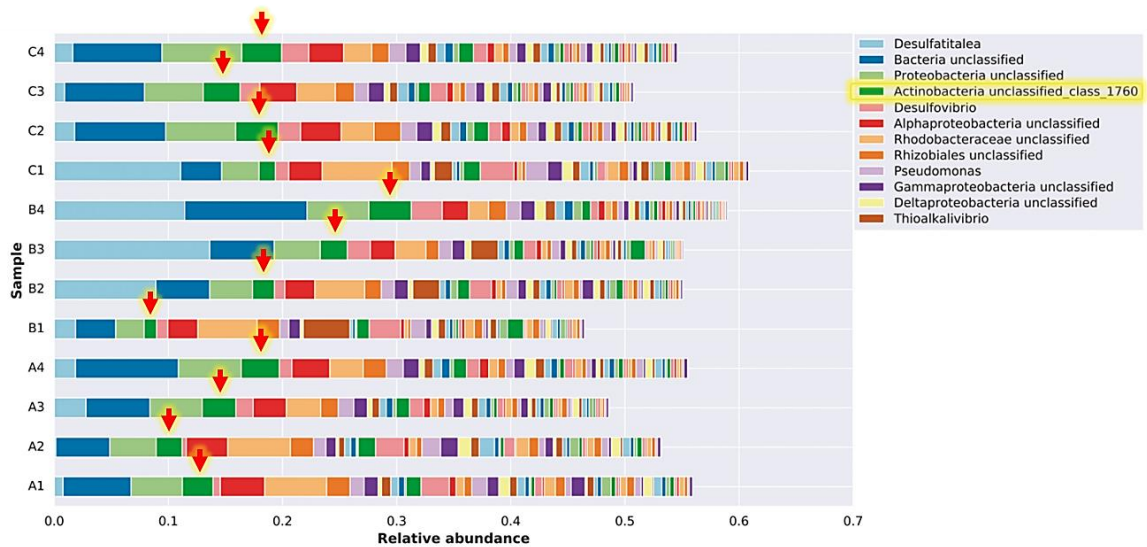


Figura 9. Reporte de abundancias relativas de microorganismos obtenidos mediante metagenomas de la laguna intermedia de Churince. Las flechas en color rojo y amarillo indican las actinobacterias encontradas (Imagen modificada de De Anda *et al.*, 2018)

Además, ensayos de antagonismo han demostrado que las actinobacterias aisladas de CCC son capaces de producir metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana. El estudio reportado por Arocha (2018) mostró que 69 aislados de actinobacterias de 139 analizados mostraron actividad contra al menos uno de los aislados de *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 y *C. albicans*. Todos estos resultados y las características ambientales propias de CCC hacen que sea un lugar único y con alto potencial para la búsqueda de actinobacterias raras productoras de nuevas moléculas bioactivas con actividad antimicrobiana.

JUSTIFICACIÓN

Las bacterias resistentes a antibióticos son responsables de más de 700 mil muertes al año en todo el mundo y se estima que para el año 2050 causaran más de 20 millones de muertes al año. La OMS ha incentivado la búsqueda de nuevos compuestos con el propósito de frenar la crisis de resistencia que se vive actualmente, sin embargo, el desarrollo de nuevos antibióticos se ha visto limitado por diversos factores, entre ellos el descubrimiento de nuevas moléculas con actividad antimicrobiana.

Por otra parte, las actinobacterias son productoras de un gran número de productos naturales bioactivos con potencial biotecnológico como los antibióticos y se ha visto que las actinobacterias raras son fuentes únicas de nuevos compuestos antimicrobianos ya que suelen ser aislados en entornos inexplorados y de condiciones extremas.

El valle de CCC se caracteriza por ser un ambiente poco explorado con condiciones climáticas extremas y muy pocos nutrientes, lo que hace que sea un sitio potencial para la búsqueda de actinobacterias raras productoras de distintos compuestos antimicrobianos.

HIPÓTESIS

Las actinobacterias raras aisladas de Cuatro Ciénegas, Coahuila son productoras de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas multirresistentes a antibióticos.

OBJETIVO DEL TRABAJO

Objetivo General

Identificar y caracterizar actinobacterias raras productoras de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana contra aislados clínicos de *Acinetobacter baumannii* y *Staphylococcus spp.* multirresistentes a antibióticos.

Objetivos específicos:

- Caracterizar el perfil de resistencia de aislados clínicos de *A. baumannii*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. cohnii* del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González.
- Identificar actinobacterias raras con actividad antimicrobiana contra aislados clínicos multirresistentes a antibióticos.
- Separar las fracciones y caracterizar los compuestos bioactivos a partir de extractos orgánicos producidos de un cultivo del microorganismo antagonista.
- Identificar y caracterizar las actinobacterias raras productoras de metabolitos antimicrobianos.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material biológico

1.1. Bacterias resistentes a antibióticos

Las cepas de *A. baumannii*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. cohnii* se obtuvieron a partir de aislados clínicos procedentes del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González. Las cepas fueron identificadas por MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption ionization-time off light-mass spectrometry), para ello se colocó una colonia del cultivo bacteriano sobre una placa de metal pulido, se añadió 1 µl de ácido fórmico al 70 %, se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente se añadió 1 µl de la solución matriz con ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico para dejar secar a temperatura ambiente. La placa se colocó en el equipo para vaporizar e ionizar las muestras y los resultados obtenidos fueron comparados con perfiles de referencia para la identificación de cada uno de los aislados. Para los perfiles de resistencia se utilizaron diferentes tipos de antibióticos (Tabla S1) y se determinaron mediante VITEK® MS de bioMérieux utilizando las tarjetas para el análisis de susceptibilidad antimicrobiana para bacterias Gram negativas y positivas. Los resultados se confirmaron utilizando la técnica de Kirby-Bauer de difusión por disco en placa de Petri y todos los resultados se compararon con los puntos de corte establecidos por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) en el manual M100: Estándares de desempeño para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (CLSI, 2021).

1.2. Actinobacterias

Las actinobacterias utilizadas en este trabajo procedieron del cepario del laboratorio 9 del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de Nuevo León (Tabla S3). Todos los aislados se encontraban almacenados a -20°C y fueron reactivados en medio ISP2 [Por litro]: 5 g extracto de levadura, 10 g extracto de malta, 4 g dextrosa, 25 g sales marinas Kent, 20 g agar bacteriológico) adicionado con ácido nalidíxico (50 µg/ml) y nistatina (50 µg/ml), las placas se incubaron a 27 °C por 5 días en incubadora marca ShellLab modelo GI7.

2. Identificación de actinobacterias con actividad antimicrobiana

2.1 Ensayos de antagonismo por el método de doble capa

Las actinobacterias se cultivaron en medio ISP2, ISP4 ([Por litro]: 10 g almidón; 1 g K_2HPO_4 , 1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g NaCl, 1 g $(NH_4)_2SO_4$, 1 g $CaCO_3$, 0.001 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.001 g $MnCl_2 \cdot 7H_2O$, 0.001 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 18 g agar bacteriológico), ISP6 ([Por litro]: 15 g peptona de carne, 5 g bacto peptona, 1 g extracto de levadura, 0.05 g citrato de amonio férrico, 1 g K_2HPO_4 , 0.080 g $Na_2S_2O_3$, 18 g agar bacteriológico), ISP7 ([Por litro]: 1 g L-asparagina, 0.5 g L-tirosina, 0.5 g K_2HPO_4 , 0.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g NaCl, 1.360 mg $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.027 mg $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.040 mg $CoCl_2$, 0.024 mg $Na_2MoO_4 \cdot 7H_2O$, 0.020 mg $ZnCl_2$, 2.850 mg H_3BO_3 , 1.800 mg $MgCl_2 \cdot 4H_2O$, 1.770 mg $C_4H_4Na_2O_6$, 15 ml glicerol (100 %), 20 g agar bacteriológico) y se incubaron a 27 °C por 5 – 10 días. Posteriormente de cada placa de ISP 2, ISP 4, ISP 6 y ISP 7 se tomaron 3 sacabocados con crecimiento uniforme y se transfirieron a placas nuevas del mismo medio correspondiente (ISP 2, ISP 4, ISP 6 y ISP 7). Las placas se incubaron a 27 °C por 10 días y posteriormente a cada placa se le añadió 12.5 ml de medio Mueller Hinton Agar (MHA) ([Por litro]: 300 g infusión de carne, 17.5 g peptona ácida de caseína, 1.5 g de almidón, 15 g agar bacteriológico) inoculado con 3×10^6 UFC/ml de *A. baumannii*. Como control positivo se utilizaron sensidiscos con 10 µg de colistina y como negativo se utilizó una placa con el medio previamente inoculado. Todas las placas se incubaron a 37 °C por 18 horas y posteriormente se realizaron las fotografías y mediciones correspondientes.

2.2 Ensayos de antagonismo por el método de estría perpendicular

Las actinobacterias se cultivaron en medio O-IPS2 ([Por litro]: 5 g peptona bacteriológica, 3 g extracto de levadura, 3 g maltosa, 10 g dextrosa, 20 g agar bacteriológico, 25 g sales marinas Kent) y se incubaron a 27 °C por 5 – 10 días hasta su completa esporulación. Posteriormente cada cultivo se inoculó en placas con medio ISP2, ISP4, ISP6 e ISP7 en forma de línea perpendicular colocando 10 µl de solución de esporas (0.1 g de esporas en 1 ml de Tween 20 % estéril). Las placas se incubaron a 27 °C durante 10 días, después se les añadió 15 ml de medio MHA y con la ayuda de un isopo estéril se inocularon en línea horizontal las cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. cohnii* previamente cultivadas (hasta alcanzar 1.5×10^8 UFC/ml). Como control positivo se utilizaron

sensidiscos con 30 µg de vancomicina y como controles negativos líneas horizontales de cada una de las cepas en MHA, finalmente las placas se incubaron a 37 °C por 18 horas.

3. Producción de metabolitos secundarios bioactivos

Las actinobacterias con actividad antimicrobiana se cultivaron en medio O-ISP2 a 27 °C por 7 días, posteriormente se tomaron sacabocados de 6 mm y se colocaron en matraces con 150 y 840 ml de medio ISP2 líquido. Los cultivos se incubaron a 125 rpm a 27 °C durante 10 días, se centrifugaron a 4000 rpm por 20 minutos para después transferir el sobrenadante a un frasco estéril.

3.1 Producción de extracto orgánico

Al sobrenadante previamente obtenido se le añadió acetato de etilo en una relación 1:1 y después se incubó a 150 rpm por 2 días. Posteriormente se recuperó la fase orgánica y se concentró en rota evaporador marca Yamato modelo RE801 a 225 hPa, a 42 °C y 20 rpm. El extracto resultante se depositó en un vial y se dejó a 60 °C hasta la completa evaporación del solvente restante.

3.2 Producción de extracto liofilizado

El sobrenadante obtenido se colocó en viales para liofilizadora, se congelaron utilizando hielo seco-acetona y se liofilizaron utilizando un equipo marca Labconco™ modelo FreeZone™ bajo las condiciones de 0.040 mBar con una temperatura de vacío de -50 °C durante 8 horas, los viales liofilizados se almacenaron a temperatura ambiente hasta su posterior uso.

3.3 Concentración de proteínas

El sobrenadante previo se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm durante 5 minutos y se pasó a través de un filtro de jeringa de 0.45 µm. Posteriormente se realizó la concentración de proteínas utilizando un filtro de centrifuga Amicon™ Ultra marca Millipore® de 3kDa. Se colocaron 12 ml de sobrenadante filtrado y se centrifugó a 3,580 rpm durante 40 minutos a temperatura ambiente (20 – 25 °C), después se recuperó el concentrado de proteínas y se transfirió a un tubo eppendorf nuevo, este pasó se repitió varias veces hasta conseguir el volumen de concentrado deseado. Finalmente, el concentrado proteico se almaceno a -20 °C.

4. Identificación de los compuestos bioactivos con actividad antimicrobiana

4.1 Extracto orgánico

Los extractos se resuspendieron en dimetilsulfóxido (DMSO) y agua MiliQ para obtener una concentración final de 100 mg/ml. La identificación parcial de los compuestos activos se realizó mediante cromatografía de capa fina (TLC), para ello se colocaron 10 µl de los extractos en una placa de sílica gel 60 G F₂₅₄ (20 x 20 cm) y se eluyeron utilizando una combinación de acetato de etilo – metanol en una relación 80:20 durante 45 minutos. La placa se observó bajo luz visible y luz ultravioleta. Posteriormente se realizó una bioautografía, colocando 15 ml de medio MHA inoculado con 1.5 X10⁸ UFC/ml del cultivo bacteriano y se incubó a 37 °C por 18 horas.

4.2 Concentrado de proteínas

4.2.1 Cuantificación de proteínas

La determinación de la concentración de proteínas se realizó mediante la técnica de Bradford, utilizando el reactivo de Bradford marca Sigma-Aldrich®. El protocolo que se siguió fue el establecido por proveedor para ensayos con placas de 96 pozos: en una placa de 96 se colocaron 5 µl del concentrado proteico, después se añadieron 250 µl del reactivo de Bradford, se mezcló por ~ 30 segundos y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente la placa se leyó a 595 nm utilizando un espectrofotómetro modelo Synergy 2 marca Biotek® y el resultado se comparó con los resultados obtenidos tras la curva de calibración con albumina de suero bovino (0.1 – 1.4 mg/ml).

4.2.2 Efecto de la actividad de proteasa y calor, en la actividad antimicrobiana

Para evaluar el efecto de las proteasas, el concentrado proteico se sometió a la digestión por tripsina 1mM. Se tomó un 1 ml de concentrado, se añadieron 2.98 ml de tripsina y se incubó a 37 °C durante 2 horas. Posteriormente el volumen se dividió en dos tubos, uno de ellos se calentó a 95 °C por 5 minutos en baño maría modelo WiseBath® marca Wisd® y el otro tubo se mantuvo a temperatura ambiente. Mientras que, para el efecto de la temperatura, el concentrado se calentó a 95 °C por 5 minutos en baño maría. De cada tratamiento se tomaron 10 µl y se transfirieron a discos de papel filtro estériles para después colocarse en placas con MHA previamente inoculadas a partir de un cultivo bacteriano con 1.5 X10⁸ UFC/ml. Todas las placas se incubaron a 37 °C por 18 horas.

4.2.3 Separación de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)

La separación se llevó a cabo en condiciones desnaturalizantes por el método de Tris - Glicina. Las muestras fueron disueltas en 10 µl del buffer de muestra (1 ml Tris - Glicina 0.5 M pH 6.8, 0.8 ml glicerol 100 %, 1.6 ml SDS 10 %, 0.4 ml de azul de bromofenol 1 %, 0.4 ml de 2-Mercaptoetanol y 3 ml agua destilada) para lograr una relación 1:1, después fueron calentadas a 95 °C por 15 minutos y se cargaron 10 µl en la cámara de electroforesis que contenía previamente los geles de poliacrilamida (gel separador 13 % (2.5 ml Tris – HCl 1.5 M pH 8.5, 0.1 ml SDS 10 %, 4.3 ml bisacrilamida 30 % , 0.05 ml APS 10 % , 0.005 ml TEMED y 3.045 ml agua destilada) y gel concentrador 3 % (2.5 ml Tris – HCl 5 M pH 6.8, 0.1 ml SDS 10 %, 1 ml bisacrilamida 30 %, 0.1 ml APS 10 %, 0.005 ml TEMED y 6.295 ml agua destilada)). Los geles se corrieron con buffer de Tris – Glicina pH 8.3 y a 70 V, 0.01 A por ~ 1.2 horas. Una vez que la muestra alcanzó el gel separador las condiciones de corrida se modificaron a 90 V, 0.02 A por ~ 2.5 horas. El gel se colocó en la solución fijadora (10 ml ácido acético, 50 ml metanol 100 %, 40 ml agua destilada) por 1 hora y después se transfirió a la solución de coloración (40 ml metanol, 10 ml ácido acético, 1 g azul de coomassie G-250 y 50 ml agua destilada) durante 24 – 48 horas. Por último, el gel se colocó en la solución descolorante (5 ml metanol 100 %, 7 ml ácido acético y 88 ml agua destilada) por 2 a 3 días.

5. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM) de los extractos crudos y los compuestos bioactivos

La CIM se determinó siguiendo la metodología previamente reportada por Ruangpan (2004) con modificaciones. En una placa de 96 pozos se colocaron 180 µl de caldo Mueller Hinton (MHB), 10 µl de cultivo bacteriano a una concentración de 1×10^6 UCF/ml, 10 µl de los extractos crudos a diferentes concentraciones (100 mg/ml – 0.05 mg/ml) y como control positivo para *A. baumannii*, *S. aureus* y *S. epidermidis* se utilizaron gentamicina (4 µg/ml), rifampicina (1 µg/ml) y tetraciclina (4 µg/ml) respectivamente. Las placas se incubaron a 37 °C por 18 a 48 horas y posteriormente se leyeron a 260 nm utilizando un espectrofotómetro de placas. Posteriormente a las placas se les añadió 20 µl de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) 5 mg/ml, se incubaron a 37 °C por 2 horas y se reportó el cambio colorimétrico.

6. Caracterización de actinobacterias con actividad antimicrobiana

6.1 Caracterización morfológica y fisiológica

La morfología microscópica de las actinobacterias se determinó a partir de un cultivo en ISP2, para ello se realizaron tinciones Gram y posteriormente se observaron utilizando un microscopio óptico de campo claro marca Olympus modelo BX53F a una magnificación total de 1000 X.

Para la caracterización fisiológica las actinobacterias se cultivaron en distintos medios con diferentes fuentes de carbono y nitrógeno. Los medios utilizados fueron: ISP1 ([Por litro]: 5 g caseína hidrolizada, 3 g extracto de levadura y 20 g de agar bacteriológico), ISP2, ISP3 ([Por litro]: 20 g avena, 0.001 g $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, 0.001 g MnCl_2 , 0.001 g ZnSO_4 , 18 g agar bacteriológico), ISP4, ISP5 ([Por litro]: 1 g L- asparagina, 1 g K_2HPO_4 , 0.001 g FeSO_4 , 0.001 g MnCl_2 , 0.001 g ZnSO_4 , 18 g agar bacteriológico), ISP6, ISP7, M1 ([Por litro]: 5 g manitol, 10 ml glicerol al 100 %, 10 ml stock de sales ([Por litro]: 10 g L-asparagina, 10 g K_2HPO_4 , 4 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 15 g de agar bacteriológico), M3 ([Por litro]: 8 g peptona bacteriológica, 1 g almidón, 15 g agar bacteriológico), Quitina ([Por litro]: 10 g quitina coloidal, 25 g sales marinas Kent, 16 g agar bacteriológico) y SFM ([Por litro]: 20 g manitol, 20 g harina de soya, 25 g sales marinas Kent, 20 g agar bacteriológico). Para el uso de fuentes de carbono se utilizó el medio ISP9 ([Por litro: 5.65 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 2.54 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.38 g KH_2PO_4 , 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 ml sales traza Pridham & Gottlieb ([Por litro]: 7.9 g $\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 6.4 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1.5 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.1 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) adicionado con arabinosa, dextrosa, dulcitol, fructuosa, galactosa, inositol, lactosa, manitol, ramnosa, sacarosa o xilosa al 10 %. Las placas se incubaron a 27 °C por 15 días, cada día se tomaron fotografías y se describió la morfología colonial.

6.2 Caracterización genómica de la cepa

6.2.1 Purificación del ADN

La extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico se realizó utilizando el método de fenol – cloroformo. Las actinobacterias se cultivaron en medio ISP2 por 3 días, después, con la ayuda de un bisturí estéril se recuperó la biomasa y se colocó en tubos de centrifuga, se añadió 2 ml de sacarosa 20 % y se centrifugaron a 12, 000 rpm durante 5

minutos. Para la lisis se añadieron perlas de vidrio de 0.1 mm estériles, 500 µl de buffer de lisis QTP ([Por litro]: 40 ml Triton X-100, 100 ml SDS al 20%, 20 ml NaCl 5 M, 10 ml Tris 2 M pH 8, 7 ml EDTA 500 Mm pH 8, aforado a 1 l con agua Mili Q) y 500 µl de fenol – cloroformo. Los tubos llevaron a disrruptor MagNalyzer marca Roche a 5000 rpm por 2 minutos, posteriormente se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se añadieron 400 µl de fenol – cloroformo para después volver a centrifugar a 12000 rpm por 10 minutos y se realizó un segundo lavado con cloroformo. La precipitación del ADN se realizó con etanol absoluto y acetato de sodio 3 M en una relación 1:2, los tubos se incubaron por una noche a – 20 °C y posteriormente se realizaron dos lavados con etanol 70 %. Finalmente, la pastilla de ADN fue resuspendida en agua Mili Q y se revisó la pureza mediante NanoDrop marca Thermo Scientific modelo 2000, mientras que la integridad se observó por medio de un gel de agarosa al 1 %.

6.2.2 Secuenciación

Las muestras de ADN se enviaron a la empresa Novogene para el servicio de secuenciación de genoma completo por la plataforma Illumina NovaSeq 6000 con un extremo emparejado de 150 pb y una profundidad de ≥ 100 x.

6.2.3 Ensamble

Una vez obtenidos los datos se revisó la calidad de las secuencias utilizando el programa FastQ (versión 0.11.9) (Andrews, 2010), se realizó el recorte con el programa Trim-galore (versión 0.6.7) (Krueger, 2015) y se hizo el ensamblado del genoma con MegaHit (versión 1.0) (Li *et al.*, 2015).

6.2.4. Anotación

La anotación de los genomas se realizó mediante el Centro de Recursos de Bioinformática Bacteriana y Viral (BV-BRC por sus siglas en inglés), utilizando las herramientas de la Anotación Rápida usando Tecnología de Subsistemas (RAST por sus siglas en inglés) (Olson *et al.*, 2022) y las herramientas del Centro de Integración de Recursos de Patosistemas (PATRIC por sus siglas en inglés) (Wattam *et al.*, 2017) utilizando como nivel taxonómico el género *Streptomyces*. La búsqueda específica de grupos de genes

biosintéticos (BGCs) se realizó mediante la herramienta antiSMASH (versión 6.0) (Blin *et al.*, 2021) utilizando los parámetros ya establecidos por defecto.

6.2.5 Reconstrucción filogenética

Para el análisis filogenético se extrajo el gen 16s ARNr y se realizó un alineamiento en conjunto con otras secuencias de actinobacterias de CCC previamente obtenidas por Álvarez (2021) y Arocha (2018), también se añadieron secuencias del 16s ARNr de referencia de diferentes géneros de actinobacterias obtenidas de la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI). Para el alineamiento se utilizó el programa MEGA11 (Tamura *et al.*, 2021), la herramienta Muscle (Edgar, 2004) y posteriormente se realizó un árbol filogenético basado en el método de máxima verosimilitud construido utilizando modelo evolutivo Tamura-Nei I + G con 1000 réplicas de bootstrapping. Finalmente, el formato del árbol se editó utilizando la herramienta iTOL (versión 6) (Letunic, 2021).

6.2.6 Identidad promedio de nucleótidos (ANI)

El análisis ANI de los genomas se realizó utilizando el programa bioinformático en línea de Atlas de Genomas Microbianos (MiGA por sus siglas en inglés) (Rodríguez *et al.*, 2018) y la herramienta TypeMat (Rodríguez *et al.*, 2020). Se utilizaron los parámetros ya establecidos por defecto y se añadieron los genomas previamente ensamblados.

7. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron por medio de pruebas ANOVA de una vía y las comparaciones múltiples se realizaron por medio de pruebas Tukey con un nivel de confianza del 95 % utilizando los programas estadísticos de Minitab (versión 17.1) y GraphPad Prism (versión 8.0).

RESULTADOS

1. Obtención de un cepario de patógenos multidrogorresistentes

Los espectros de masas observados para cada uno de los aislados clínicos mostraron que estos se trataban de *A. baumannii*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. cohnii*.

La caracterización de resistencia a antibióticos mostró que los aislados contaban con diferentes perfiles (Tabla S1), sin embargo, para la clasificación de resistencia se decidió considerar únicamente aquellos antibióticos relevantes para cada género (Tabla 1 y Tabla 2). Con base a esto, *A. baumannii* fue resistente a 14 antibióticos de 7 categorías de antimicrobianos (carbapenémicos, fluoroquinolonas, penicilinas + inhibidores de betalactamasas, cefalosporinas de espectro extendido, aminoglucósidos, inhibidores de la vía folato y tetraciclinas). Por otro lado, fue susceptible a ampicilina – sulbactam, colistina, polimixina B y gentamicina, clasificados en 3 categorías diferentes (penicilinas + inhibidores de betalactamasas, polimixinas y aminoglucósidos) (Figura 10). Estos resultados clasificaron a *A. baumannii* con fármaco resistencia extendida o XDR.

Todos los aislados de *Staphylococcus* mostraron ser resistentes al menos 4 antibióticos en 4 categorías diferentes y susceptibles a 3 antibióticos en 3 categorías (Figura 10). Estos perfiles clasificaron a todos los *Staphylococcus* con múltiple fármaco resistencia o MDR.

Ambos aislados de *S. aureus* mostraron ser resistentes a cefalosporinas de espectro extendido, fluoroquinolonas, lincomicina y macrólidos. También ambos mostraron susceptibilidad a 9 antibióticos de las categorías de aminoglucósidos, inhibidores de la vía folato, tetraciclinas, glicopéptidos, tigeciclinas, lipopéptidos y oxazolidones.

S. epidermidis 17-1758 mostró resistencia a 10 antibióticos de las categorías de aminoglucósidos, inhibidores de la vía folato, tetraciclinas, cefalosporinas de espectro extendido, fluoroquinolonas, rifamicinas, lincomicina, lipopéptidos, macrólidos y oxazolidones. Además, mostró susceptibilidad a 4 antibióticos de las categorías de glicopéptidos y tigeciclinas. Por otro lado, el aislado de *S. epidermidis* 16-1928 fue resistente a 5 antibióticos de las categorías de cefalosporinas de espectro extendido, fluoroquinolonas, lincomicina, lipopéptidos y macrólidos. Mientras que fue susceptible a 9 antibióticos en 7 categorías diferentes.

S. haemolyticus mostró resistencia a 11 antibióticos de las categorías de aminoglucósidos, inhibidores de la vía folato, tetraciclinas, rifamicinas, cefalosporinas de espectro extendido, fluoroquinolonas, lincomicina, lipopéptidos, macrólidos y oxazolidones. Asimismo, mostró susceptibilidad a 3 antibióticos de las categorías de glicopéptidos y tigeclinas.

Por último, *S. cohnii* presentó resistencia a 7 antibióticos de las categorías de aminoglucósidos, rifamicinas, cefalosporinas de espectro extendido, fluoroquinolonas, lincomicina, macrólidos y oxazolidones. Mientras que fue susceptible a 6 antibióticos de 4 categorías.

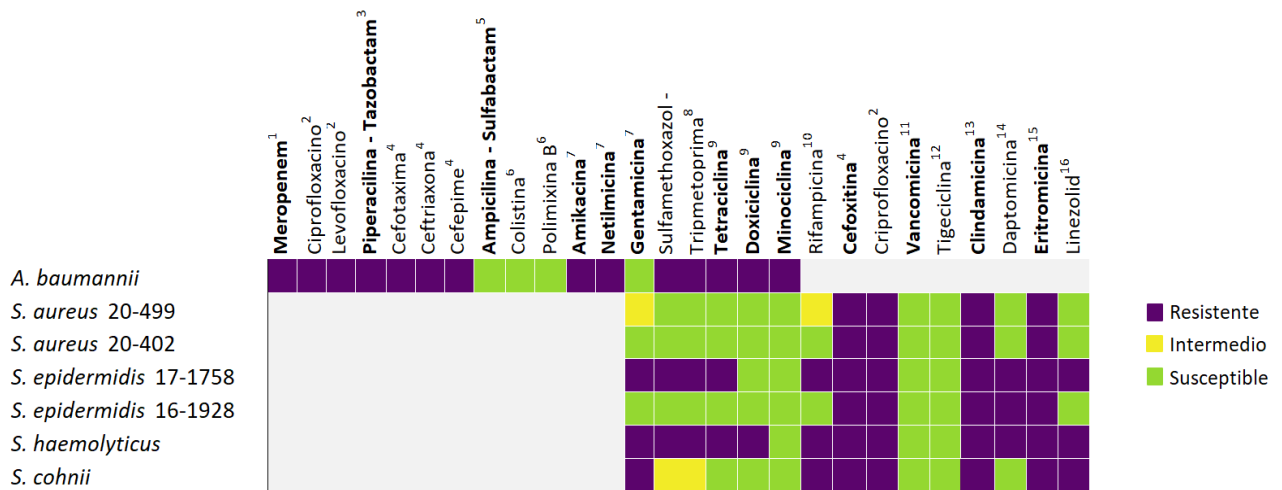


Figura 10. Perfil de resistencia de los aislados clínicos de *A. baumannii* y *Staphylococcus spp.* Categorías de antibióticos: ¹ Carbapenémicos, ² Fluoroquinolonas, ³ Penicilinas + inhibidores Beta-lactamasas, ⁴ Cefalosporinas espectro extendido, ⁵ Penicilinas + inhibidores Beta-lactamasa, ⁶ Polimixinas, ⁷ Aminoglucósidos, ⁸ Inhibidores de la vía Folato, ⁹ Tetraciclinas, ¹⁰ Rifamicinas, ¹¹ Glicopéptidos, ¹² Tigeciclinas, ¹³ Lincomicina, ¹⁴ Lipopéptidos, ¹⁵ Macrólidos, ¹⁶ Oxazolidones.

2. Determinación de la actividad antimicrobiana de las actinobacterias de Cuatro Ciénegas

Los resultados obtenidos tras la evaluación de la actividad antimicrobiana mostraron que el 41 % de los 214 aislados de actinobacterias presentaron actividad inhibitoria (Tabla S3). En donde, 15 actinobacterias contaron con actividad contra *A. baumannii* XDR, 37 contra *S. aureus* 20-499 MDR y *S. aureus* 20-402 MDR, 85 contra *S. epidermidis* 17-1758 MDR, 57 contra *S. epidermidis* 16-1998 MDR, 45 contra *S. haemolyticus* y 62 contra *S. cohnii* MDR (Figura 11).

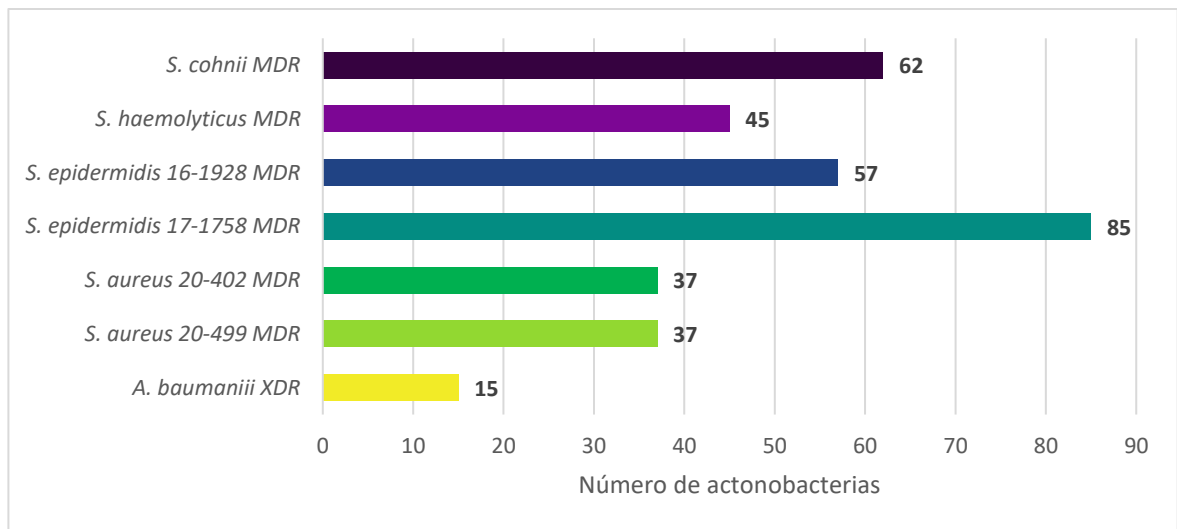


Figura 11. Actinobacterias con actividad antimicrobiana contra *A. baumannii* XDR y *Staphylococcus spp.* MDR.

Los aislados de actinobacterias presentaron actividad contra uno o más aislados clínicos. En la Figura 12 (A) observamos que 5 actinobacterias mostraron actividad únicamente contra *A. baumannii* XDR, 80 contra uno o más aislados de *Staphylococcus spp.* MDR y 10 contra ambos grupos de bacterias farmacorresistentes.

Analizando la actividad contra los aislados de *Staphylococcus* MDR observamos que todos fueron inhibidos por 33 actinobacterias, 50 mostraron actividad únicamente contra *Staphylococcus* coagulasa negativos, 9 contra ambos aislados de *S. epidermidis* MDR y 14 únicamente contra *S. epidermidis* 17-1758 MDR (Figura 12 B).

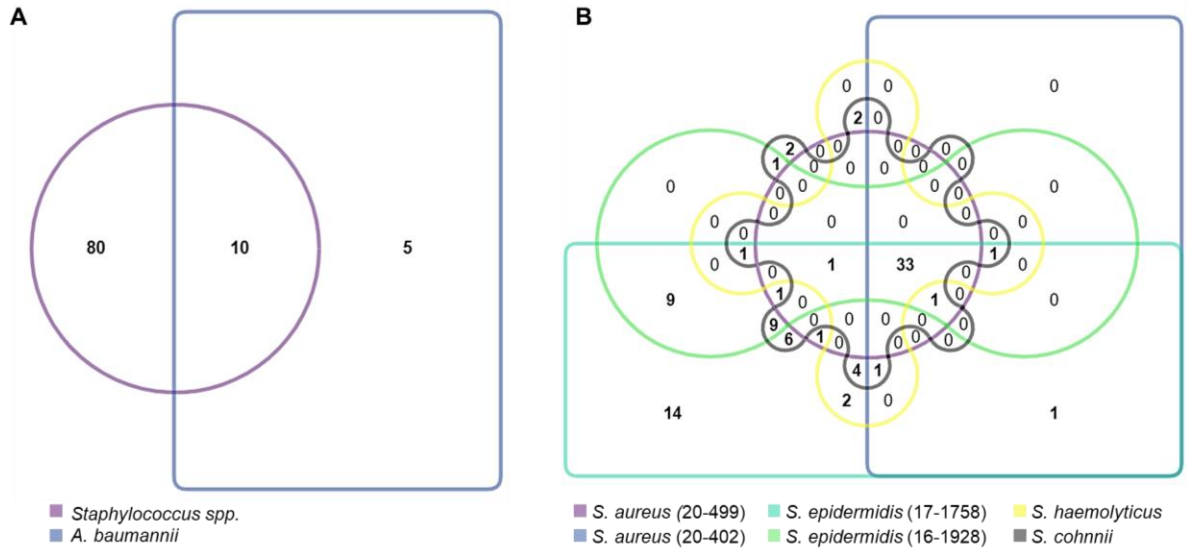


Figura 12. Actinobacterias evaluadas con actividad antimicrobiana. A) Aislados con actividad contra *A. baumannii* XDR y *Staphylococcus spp.* MDR. B) Aislados con actividad contra *S. epidermidis* 17-1758 MDR, *S. epidermidis* 16-1928 MDR, *S. aureus* 20-402 MDR, *S. aureus* 20-499 MDR, *S. haemolyticus* MDR y *S. cohnii* MDR.

2.1 Efecto del medio de cultivo en la actividad antimicrobiana

Con relación a los distintos medios de cultivo utilizados, las actinobacterias evaluadas en el medio ISP2 mostraron una mayor actividad antimicrobiana contra *A. baumannii* XDR, *S. aureus* 20-499 MDR, *S. aureus* 20-402 MDR y *S. haemolyticus* MDR. Mientras que para *S. epidermidis* 17-1758 MDR y *S. cohnii* se observó una mayor inhibición en el medio ISP6. Por otro lado, el medio que presentó una menor actividad contra todos los aislados de *Staphylococcus* MDR fue ISP7 y contra *A. baumannii* XDR fue el medio ISP4 al no mostrar ninguna actividad en todos los actinos evaluados (Figura 13).

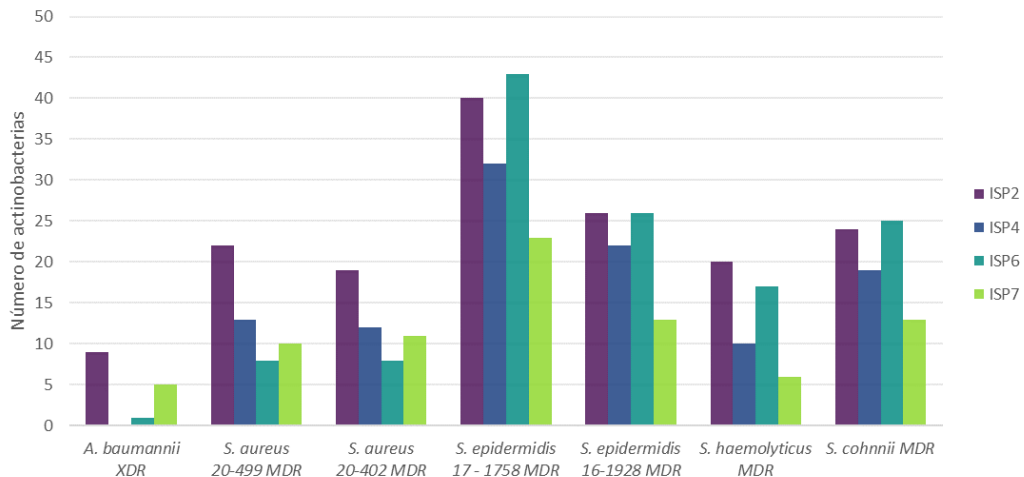


Figura 13. Efecto de los medios de cultivo en la actividad antimicrobiana.

Debido a su extensa capacidad antimicrobiana se seleccionaron 10 actinobacterias que mostraron actividad inhibitoria contra *A. baumannii* XDR y *Staphylococcus spp.* MDR en los 4 diferentes medios de cultivo (Figura 14). Observamos que la actividad antimicrobiana se ve altamente influenciada por el medio de cultivo seleccionado. En el caso del aislado PR51 observamos inhibición contra todos los patógenos en el medio ISP2, sin embargo, al utilizar los medios ISP4, ISP6 e ISP7 se observó una pérdida de la actividad contra *A. baumannii* XDR y contra *S. haemolyticus* MDR. Para los aislados CH106, CH606 y CH641 la mayor actividad de inhibición se observó en el medio ISP2, mientras que la menor actividad se reportó en el medio ISP4 para CH106 y el medio ISP7 para CH606. Para el aislado CH230 la actividad fue mayor en los medios ISP2 e ISP7, mientras que el medio ISP4 mostró una menor actividad contra todos los patógenos

evaluados. Por el contrario, para los aislados CH617, CH619, CH620 y CH653 la mayor actividad de inhibición contra los *S. aureus* MDR, *S. epidermidis* MDR y *S. haemolyticus* MDR se presentó únicamente en el medio ISP7. De igual forma, únicamente en este último medio el aislado CH610 mostró actividad contra *A. baumannii* XDR, mientras que la inhibición de *S. cohnii* MDR fue únicamente en ISP6.

Al comparar nuestros resultados contra el control biológico (*Streptomyces coelicolor*) observamos que las actinobacterias aisladas de CCC y probadas en este trabajo, son capaces de producir compuestos antimicrobianos a partir de diferentes medios de cultivo y no requieren de un medio específico para la producción de estos, a diferencia de *S. coelicolor* quien solo mostró actividad inhibitoria en el medio ISP2 (Figura 14 A).

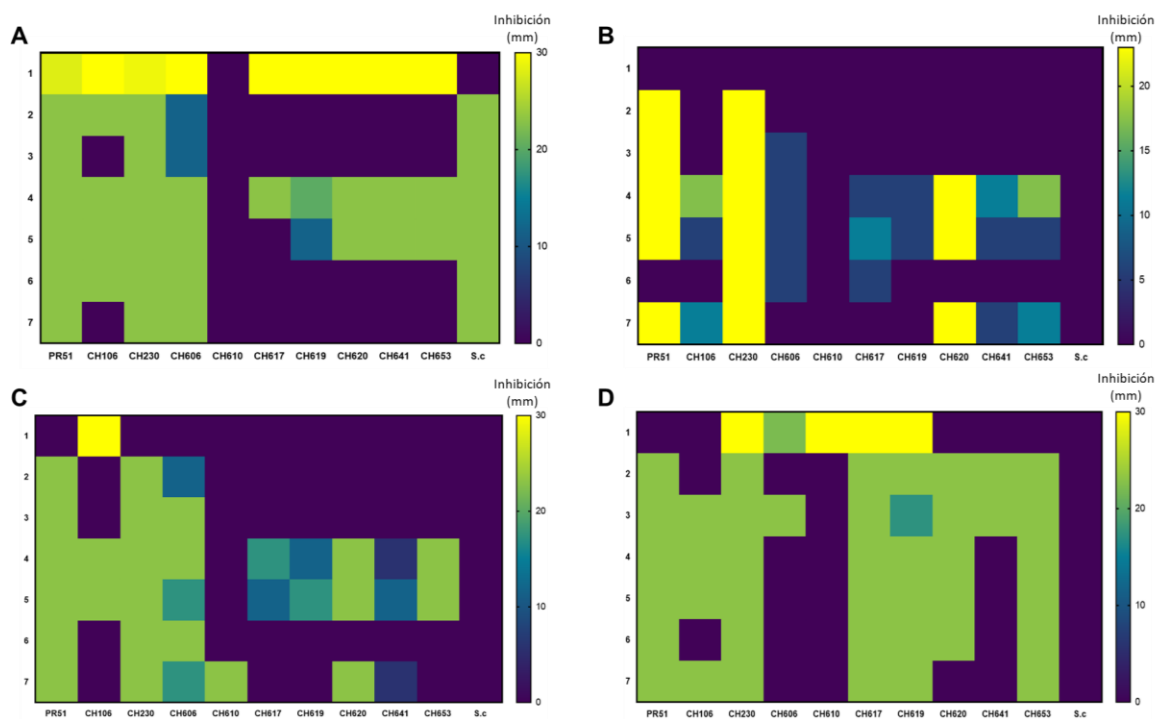


Figura 14. Actinos seleccionados por su actividad antimicrobiana contra *A. baumannii* XDR y *Staphylococcus spp.* MDR en distintos medios de cultivo. Evaluación de antagonismo en medio ISP2 (A), ISP4 (B), ISP6 (C) e ISP7 (D). 1: *A. baumannii* XDR, 2: *S. aureus* 20-499 MDR, 3: *S. aureus* 20-402 MDR, 4: *S. epidermidis* 17-1758 MDR, 5: *S. epidermidis* 16-1928 MDR, 6: *S. haemolyticus* MDR y 7: *S. cohnii* MDR. S.c: *Streptomyces coelicolor*.

3. Producción de metabolitos secundarios bioactivos

Las diez cepas de actinobacterias seleccionadas se cultivaron en medio líquido para la producción de metabolitos, sin embargo, únicamente el sobrenadante de cinco aislados mostró actividad antimicrobiana contra al menos uno de los patógenos evaluados (Figura 15). Los aislados CH106, CH606 y CH619 presentaron actividad contra los tres patógenos; de estos, CH606 mostró la mayor inhibición contra *A. baumannii* XDR y *S. aureus* 20-499 MDR en comparación con los otros aislados, mientras que CH619 inhibió en mayor proporción a *S. epidermidis* 17-1758 MDR. A diferencia del aislado CH619, los aislados CH106 y CH606 mostraron una buena actividad tras ser cultivados en medio ISP2, por lo que fueron seleccionados para los ensayos posteriores.

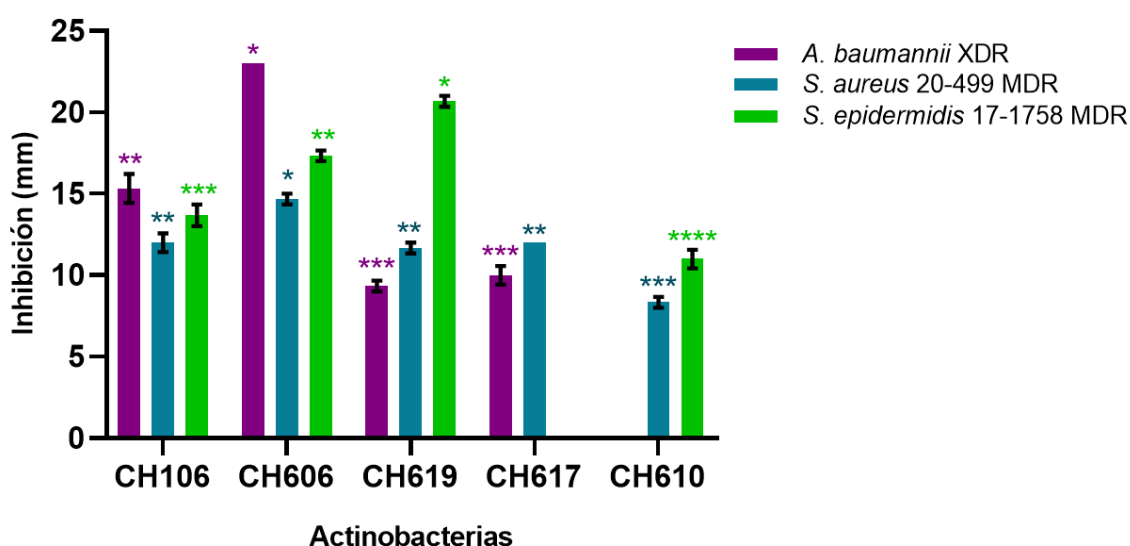


Figura 15. Actividad antimicrobiana de los metabolitos secundarios obtenidos a partir de cultivos líquidos. Los aislados CH106 y CH606 se cultivaron en ISP2, mientras que los aislados CH619, CH617 y CH610 procedían de ISP7. Las barras de error indican la media \pm ESM de tres experimentos independientes. Los símbolos * representa significancia estadística de cada bacteria determinada por ANOVA ($p < 0.05$) y pruebas Tukey ($p < 0.05$).

4. Identificación de los compuestos bioactivos con actividad antimicrobiana

4.1. Extracto orgánico del aislado CH106

La producción del extracto etílico mostró un rendimiento de 0.214 g/L. En cuanto a la actividad antimicrobiana evaluada mediante dilución en placa (Figura 16), la concentración mínima inhibitoria del extracto CH106 fue de 50 mg/ml para *A. baumannii* XDR, *A. baumannii* ATCC 15308 y *S. aureus* 20-499 MDR (Tabla 8). Por otro lado, para *S. epidermidis* 17-1758 MDR y *S. aureus* ATCC BAA-44 fue de 25 mg/ml.

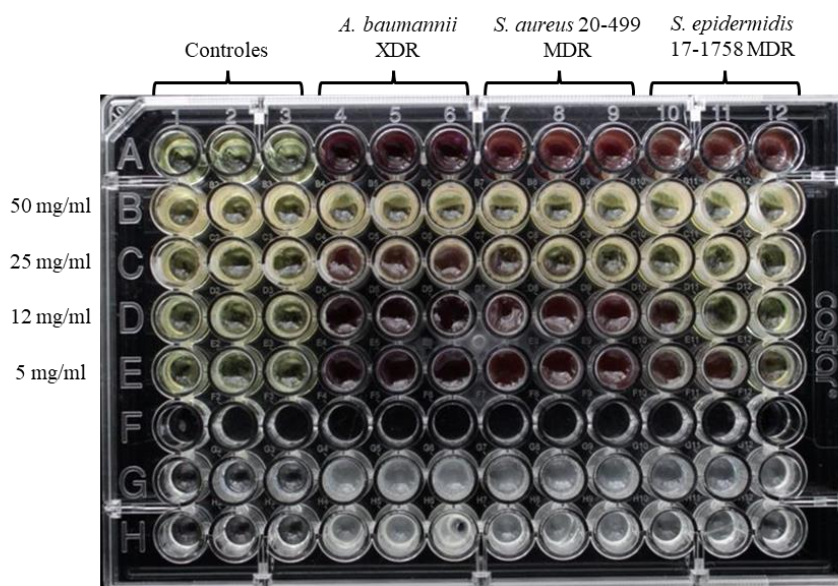


Figura 16. Ensayo de concentración mínima inhibitoria mediante dilución en placa extracto CH106.

Tabla 8. Concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto CH106.

Bacteria	CMI (mg/ml)	Control (µg/ml)
<i>A. baumannii</i> XDR	50	4*
<i>S. aureus</i> 20-499 MDR	50	1**
<i>S. epidermidis</i> 17-1758 MDR	25	4***
<i>A. baumannii</i> ATCC 15308	50	4*
<i>S. aureus</i> ATCC BAA-44	25	1**

*Gentamicina, **Rifampicina y *** Tetraciclina.

Con respecto a la identificación parcial de los compuestos activos mediante TLC, la observación bajo luz ultravioleta mostró la presencia de tres manchas con factores de retención de 1, 0.9 y 0.5 (Figura 17 A). Tras la realización de la bioautografía se observó que la mancha con factor de retención de 0.5 presentaba actividad antimicrobiana contra *S. aureus* 20-499 MDR y *S. epidermidis* 17-1758 MDR (Figura 17 B y C), sin embargo, no se observó actividad contra *A. baumannii* XDR.

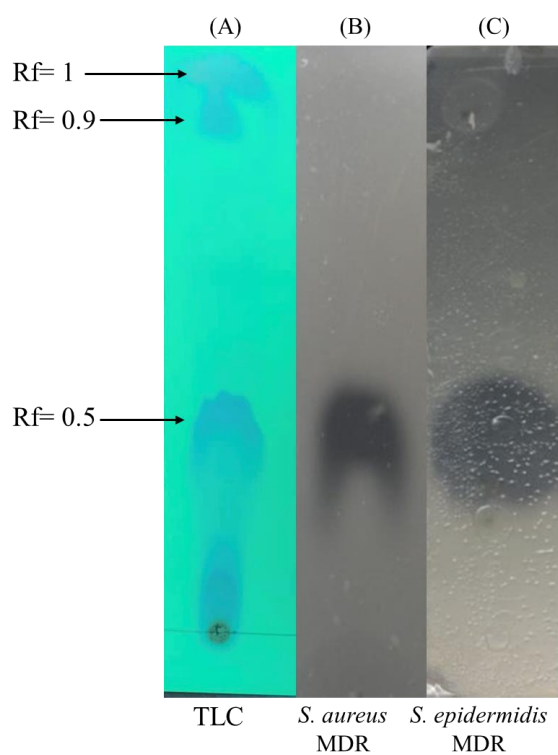


Figura 17. Cromatografía preparativa del extracto orgánico CH106. A) Cromatografía de capa fina observada bajo luz ultravioleta. B) Bioautografía realizada para *S. aureus* 20-499 MDR. C) Bioautografía realizada para *S. epidermidis* 17-1758 MDR.

4.2. Extracto liofilizado y concentrado proteico del aislado CH606

4.2.1. Extracto liofilizado

La producción del extracto a partir del sobrenadante liofilizado mostró un rendimiento de 29 g/L. En cuanto a la actividad antimicrobiana, la concentración mínima inhibitoria del extracto CH606 fue de 0.5 mg/ml para *A. baumannii* XDR y *A. baumannii* ATCC 15308 (Figura 18 y Tabla 9). Mientras que para *S. aureus* 20-499 MDR, *S. epidermidis* 17-1758 MDR y *S. aureus* ATCC BAA-44 fue de 0.25 mg/ml.

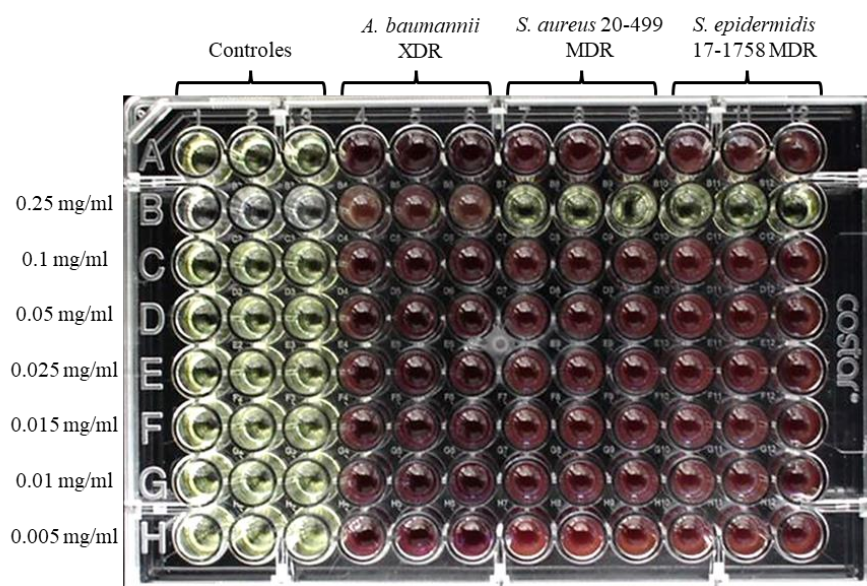


Figura 18. Ensayo de concentración mínima inhibitoria mediante dilución en placa extracto CH606.

Tabla 9. Concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto CH606.

Bacteria	CMI (mg/ml)	Control (µg/ml)
<i>A. baumannii</i> XDR	0.5	4
<i>S. aureus</i> 20-499 MDR	0.25	1
<i>S. epidermidis</i> 17-1758 MDR	0.25	4
<i>A. baumannii</i> ATCC 15308	0.5	4
<i>S. aureus</i> ATCC BAA-44	0.25	1

*Gentamicina, **Rifampicina y *** Tetraciclina.

4.2.2. Concentrado proteico

La cuantificación del concentrado proteico mediante la técnica de Bradford fue de 1.65 mg/ml. Tras la evaluación del efecto de la actividad de proteasa observamos que la actividad inhibitoria del concentrado proteico disminuyó significativamente con respecto a la del concentrado sin tratar en todos los aislados clínicos (Figura 19), sin embargo, la actividad no fue completamente reducida. Por otro lado, tras el tratamiento con calor a 95°C por 5 minutos observamos que la actividad antimicrobiana se mantenía sin diferencias con respecto a la del control contra todos los aislados.

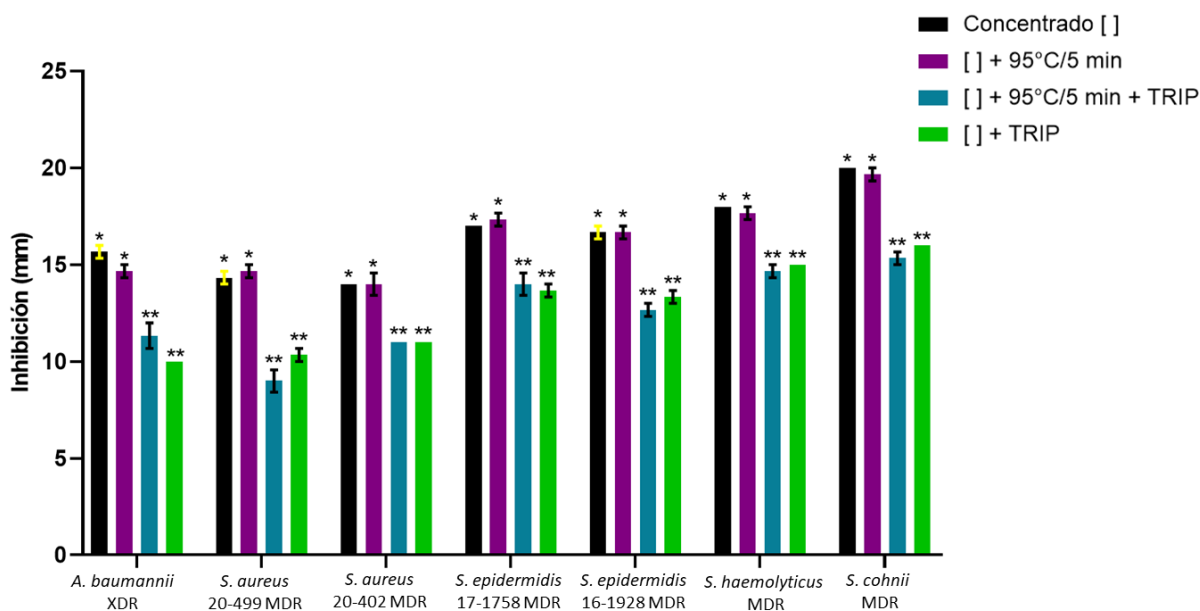


Figura 19. Efecto de la actividad proteasa y calor en la actividad antimicrobiana del concentrado proteico CH606. Las barras de error indican la media \pm ESM de tres experimentos independientes. Los símbolos * representa significancia estadística de cada bacteria determinada por ANOVA ($p < 0.05$) y pruebas Tukey ($p < 0.05$).

La separación del concentrado mediante SDS-PAGE mostró un perfil electroforético con la presencia de múltiples bandas con diferentes pesos moleculares, las cuales con base al marcador fueron desde los 11 kDa hasta más de 100 kDa (Figura 20). En las tres muestras analizadas, las principales bandas observadas fueron de aproximadamente 80 kDa, 60 kDa y 40 kDa.

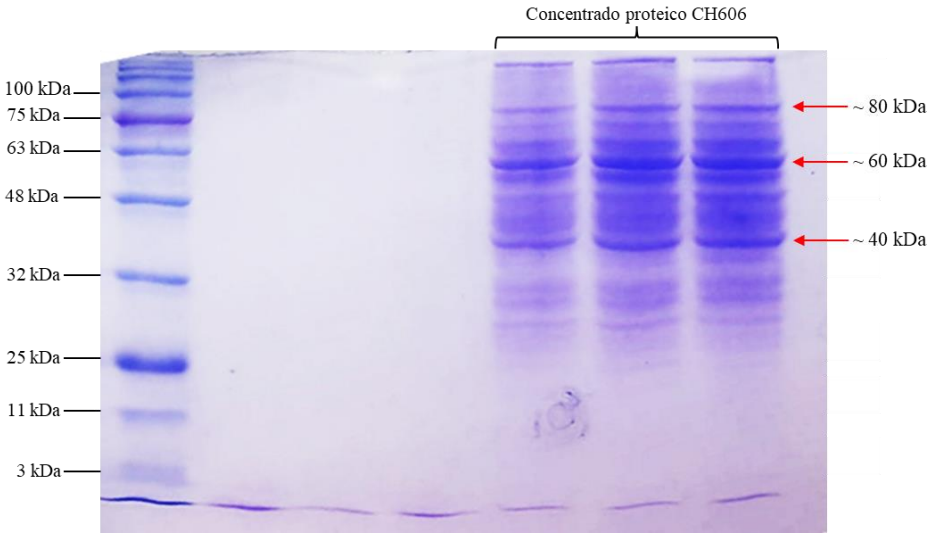


Figura 20. Separación del concentrado proteico por SDS-PAGE.

5. Caracterización de actinobacterias con actividad antimicrobiana

5.1 Caracterización morfológica y fisiológica

La identificación y caracterización de los aislados CH106 y CH606 se realizó mediante el perfil de resistencia a antibióticos, morfología, fisiología y molecularmente. Con respecto a la resistencia a antibióticos, los resultados mostraron que el aislado CH106 es resistente a 16 antibióticos de 12 categorías diferentes, mientras que el aislado CH606 fue resistente 14 antibióticos en 8 categorías (Figura 21). Ambos aislados presentaron similitudes al ser resistentes a los fenicoles, cefalosporinas, carbapenémicos, penicilinas, polimixinas y quinolonas. También ambos aislados mostraron ser susceptibles a los glicopéptidos y nitrofuranos como la vancomicina y la nitrofurantoína respectivamente.

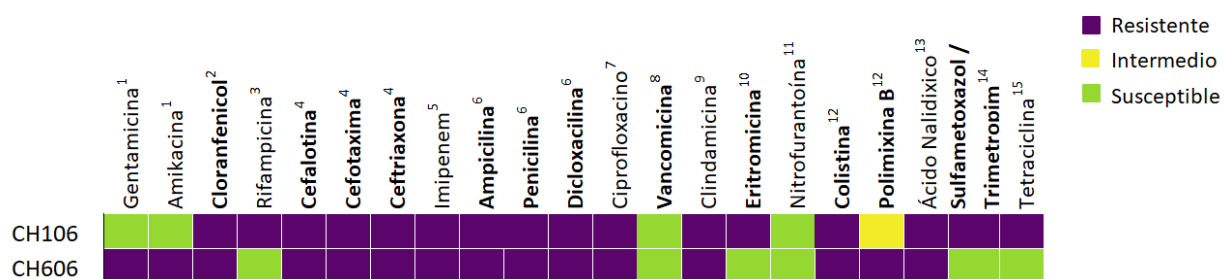


Figura 21. Perfil de resistencia de los aislados de actinobacterias CH106 y CH606. Categorías de antibióticos: ¹ Aminoglucósidos, ² Anfenicoles, ³ Rifamicinas, ⁴ Cefalosporinas espectro extendido, ⁵ Carbapenémicos, ⁶ Penicilinas, ⁷ Fluororquinolonas, ⁸ Glicopéptidos, ¹⁰ Macrólidos, ¹¹ Nitrofuranos, ¹² Polimixinas, ¹³ Quinolonas, ¹⁴ Inhibidores de la vía folato, ¹⁵ Tetraciclinas.

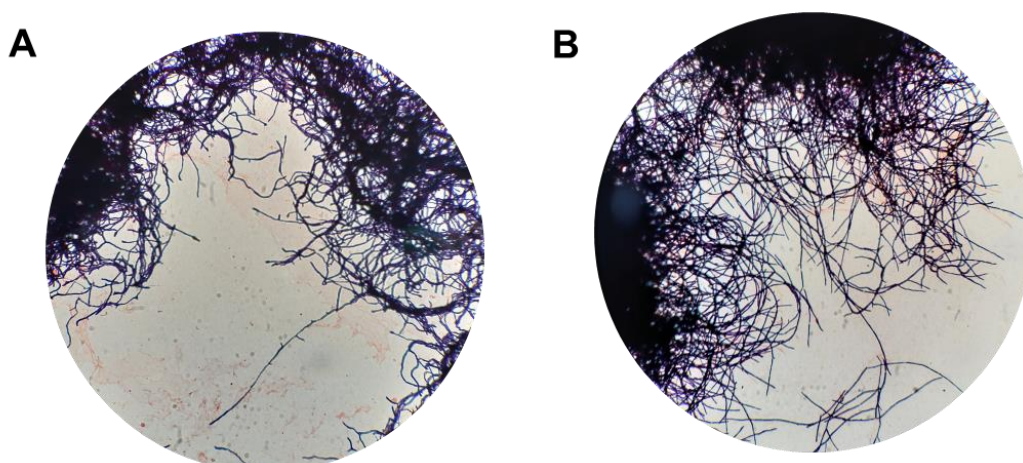


Figura 22. Tinción Gram de actinobacterias con actividad antimicrobiana. A) Asilado CH106. B) Asilado CH606. Magnitud total 1000X.

La morfología microscópica de ambos aislados fue de bacterias Gram positivas, filamentosas, formadoras de hifas vegetativas y esporas (Figura 22).

La caracterización fisiológica mostró que ambos son capaces de utilizar un gran número de fuentes de carbono y nitrógeno. El aislado CH106 mostró un crecimiento excelente en todos los medios de cultivo utilizados con excepción de quitina en donde el crecimiento fue moderado (Tabla 10 y Figura 23). También se observó un crecimiento positivo en todas las fuentes de carbono, principalmente en lactosa, galactosa, fructosa y dextrosa (Tabla 10).

Tabla 10. Caracterización fisiológica del aislado CH106.

Características	Crecimiento	Micelio aéreo	Micelio sustrato	Pigmentos solubles
Medios de cultivo				
ISP1	*****	Marfil	Crema	-
ISP2	*****	Gris platino	Blanco ostra	-
ISP3	*****	Gris blanco	Beige	-
ISP4	*****	Amarillo arena	Beige	-
ISP5	*****	Verde beige	Marfil claro	-
ISP6	*****	Blanco puro	Amarillo limón	Marfil
ISP7	*****	Blanco puro	Crema	-
M1	*****	Crema	Amarillo limón	-
M3	*****	Blanco puro	Verde beige	-
SFM	*****	Marfil	Blanco ostra	-
Quitina	***	Blanco grisáceo	Blanco ostra	-
Fuentes de carbono				
Arabinosa	**	Blanco grisáceo	Blanco señal	-
Celulosa	***	Crema	Blanco grisáceo	-
Dextrosa	****	Crema	Blanco ostra	-
Dulcitol	***	Blanco grisáceo	Blanco grisáceo	-
Fructosa	****	Blanco puro	Crema	-
Galactosa	****	Crema	Blanco grisáceo	-
Inositol	***	Blanco grisáceo	Blanco grisáceo	-
Lactosa	****	Blanco puro	Crema	-
Manitol	*	Blanco señal	Blanco señal	-
Ramnosa	****	Blanco grisáceo	Blanco grisáceo	-
Sacarosa	***	Blanco grisáceo	Blanco grisáceo	-
Xylosa	**	Blanco grisáceo	Crema	-

Los símbolos * representan en nivel de crecimiento: ***** excelente, **** bueno, *** regular, ** moderado, * débil. – sin pigmento.

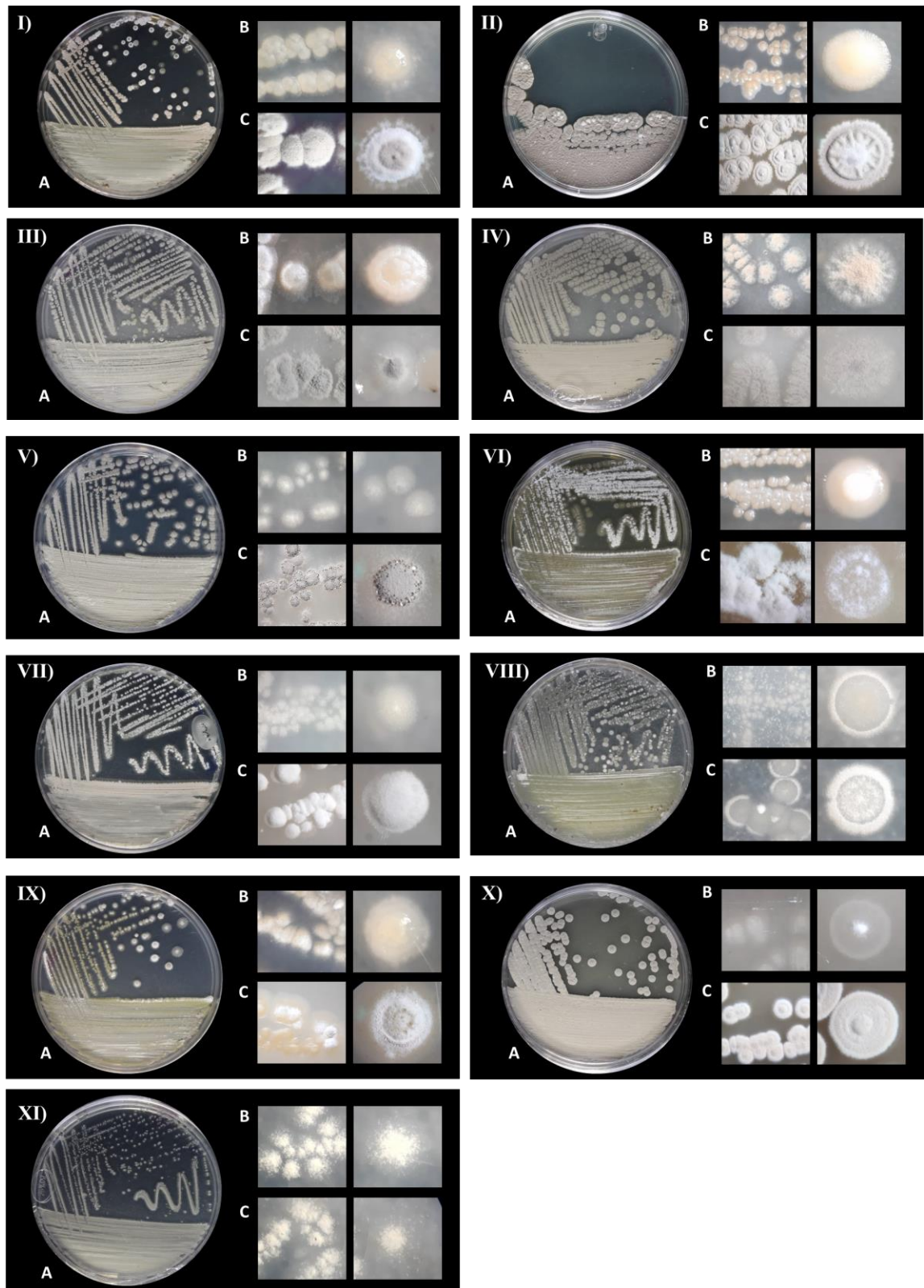


Figura 23. Caracterización morfológica de CH106 en medios de cultivo. A) Crecimiento en placa Petri. B) Colonias con 4 días de incubación. C) Colonias con 10 días de incubación. Medios de cultivo: I) ISP1,

II) ISP2, III) ISP3, IV) ISP4, V) ISP5, VI) ISP6, VII) ISP7, VIII) M1, IX) M3, X) SFM y XI) Quitina, en orden respectivo.

El aislado CH606 también mostró un crecimiento positivo en todos los medios (Figura 24), sin embargo, observamos que no fue capaz de utilizar el manitol como fuente de carbono, mientras que la dextrosa fue en donde se observó el mayor crecimiento (Tabla 11). En contraste con el aislado CH106, el aislado CH606 mostró pigmentos solubles de colores marfil, negro o blanco aluminio en varios medios de cultivo, también en el medio ISP2 se observó un micelio de color marfil claro y un micelio aéreo de color rosa característico del aislado.

Tabla 11. Caracterización fisiológica del aislado CH606.

Características	Crecimiento	Micelio aéreo	Micelio sustrato	Pigmentos solubles
Medios de cultivo				
ISP1	*****	Blanco ostra	Amarillo arena	Marfil claro
ISP2	*****	Rosa antiguo	Amarillo limón	Marfil
ISP3	*****	Blanco ostra	Marfil claro	-
ISP4	*****	Rojo beige	Blanco ostra	-
ISP5	*****	Verde beige	Blanco ostra	-
ISP6	*****	Blanco puro	Gris aluminio	Negro grafito
ISP7	*****	Gris seda	Gris amarillo	Blanco aluminio
M1	*****	Marfil claro	Verde beige	-
M3	*****	Blanco puro	Verde beige	-
SFM	*****	Rosa claro	Marfil claro	Marfil
Quitina	****	Blanco grisáceo	Blanco ostra	-
Fuentes de carbono				
Arabinosa	*	Blanco ostra	Blanco ostra	-
Celulosa	***	Marfil ligero	Crema	-
Dextrosa	*****	Marfil ligero	Blanco ostra	-
Dulcitol	**	Blanco ostra	Blanco ostra	-
Fructosa	**	Marfil ligero	Blanco ostra	-
Galactosa	**	Blanco ostra	Marfil ligero	-
Inositol	**	Blanco ostra	Blanco ostra	-
Lactosa	**	Blanco ostra	Marfil ligero	-
Manitol	-	-	-	-
Ramnosa	**	Blanco ostra	Marfil ligero	-
Sacarosa	***	Blanco ostra	Marfil ligero	-
Xylosa	**	Blanco ostra	Blanco ostra	-

Los símbolos * representan en nivel de crecimiento: ***** excelente, **** bueno, *** regular, ** moderado, * débil. – sin pigmento o sin crecimiento.

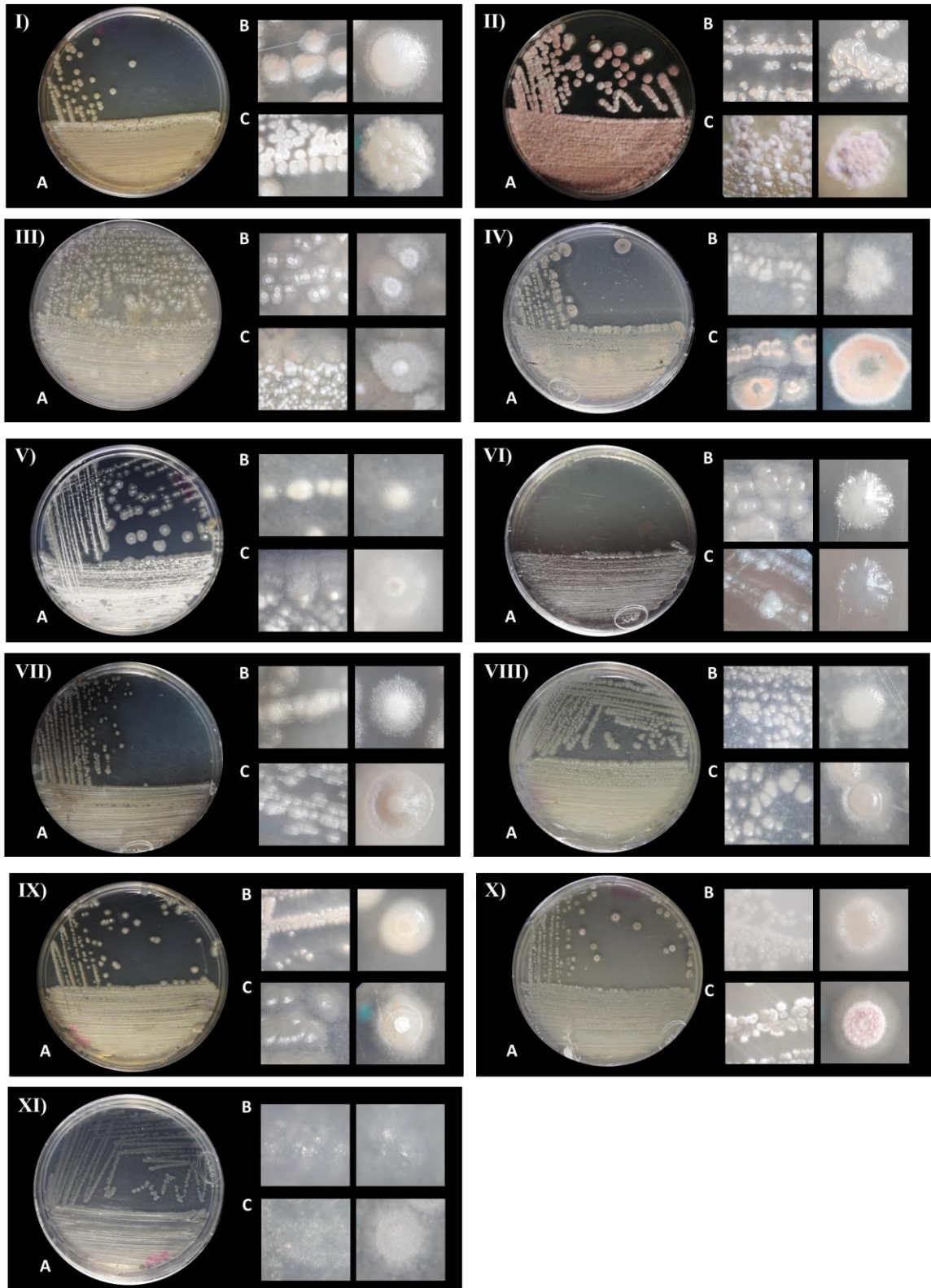


Figura 24. Caracterización morfológica de CH606 en medios de cultivo. A) Crecimiento en placa Petri. B) Colonias con 4 días de incubación. C) Colonias con 10 días de incubación. Medios de cultivo: I) ISP1,

II) ISP2, III) ISP3, IV) ISP4, V) ISP5, VI) ISP6, VII) ISP7, VIII) M1, IX) M3, X) SFM y XI) Quitina, en orden respectivo.

5.1 Caracterización genómica

5.1 Ensamblaje y anotación

El ensamblaje de los genomas CH106 y CH606 mostraron diferentes características (Tabla 12). El genoma del aislado CH106 mostró un tamaño de 6,924,780 pb, un contenido de GC de 71.81 %, 7,041 secuencias codificantes, así como 63 y 8 ARN de transferencia y ribosomales, respectivamente. Por otro lado, el genoma del aislado CH606 contó con un tamaño de 7,725,394 pb, un contenido de GC de 73.45 %, 7,538 secuencias codificantes, 71 ARNt y 4 ANRr. Al comparar los genomas secuenciados contra la cepa modelo *S. coelicolor* M1154/pAMX4 observamos que ambos fueron menores por al menos un millón de pb y también observamos un menor contenido de CDS. Otra diferencia fue el porcentaje de GC, el cual fue mayor en los genomas CH106 y CH606 en contraste con *S. coelicolor*.

Tabla 12. Información general del ensamblaje y anotación de los genomas.

	CH106	CH606	<i>Streptomyces coelicolor</i> *
Tamaño del genoma (pb)	6,924,780	7,725,394	8,476,974
Contings	772	325	87
Contenido %GC	71.81	73.45	72.07
CDS	7,041	7,538	8,075
ARNt	63	71	69
ARNr	8	4	5
Genes metabolismo primario	2,045	1,927	2,291
Resistencia a antibióticos	2 ^a , 1 ^b	3 ^a	-

* Cepa: M1154/pAMX4, ^a Fluoroquinolonas, ^b Betalactamasas.

La anotación de ambos genomas mostró la presencia de un gran número de genes relacionados con diferentes subsistemas del metabolismo primario (Tabla S4). El genoma de CH106 mostró 2,045 genes, mientras que CH606 contó 1,927 genes, este último presentó un menor número en comparación con *S. coelicolor* (Tabla 12).

Algo importante de mencionar es que en ambos genomas para los subsistemas de virulencia y defensa se encontraron genes relacionados con la resistencia a antibióticos. En el caso de CH106 mostró genes para la resistencia a fluoroquinolonas y betalactámicos, mientras que CH606 mostró únicamente resistencia a fluoroquinolonas (Tabla 12). La resistencia fluoroquinolonas se pudo confirmar al observar los perfiles de resistencia de los aislados, ya que ambos mostraron ser resistentes a ciprofloxacino (Figura 21).

La evaluación del metabolismo secundario se realizó mediante la búsqueda de grupos de genes biosintéticos (BGCs), ambos genomas mostraron la presencia de un gran número de BGCs de diferentes clases. En el genoma del aislado CH106 se encontraron 52 grupos de clases como T1PKS, NRPS, lantipeptidos, entre otros (Tabla S5). Al clasificarlos por su función, se encontraron 3 clúster relacionados con compuestos heterocíclicos, 1 para inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas, 1 para osmolitos, 4 para péptidos y derivados, 9 para péptidos sintetasas no ribosómicas, 9 para pigmentos, 22 para policétidos sintetasas y 4 para sintetasas de sideróforos independientes de NRPS (Figura 25).

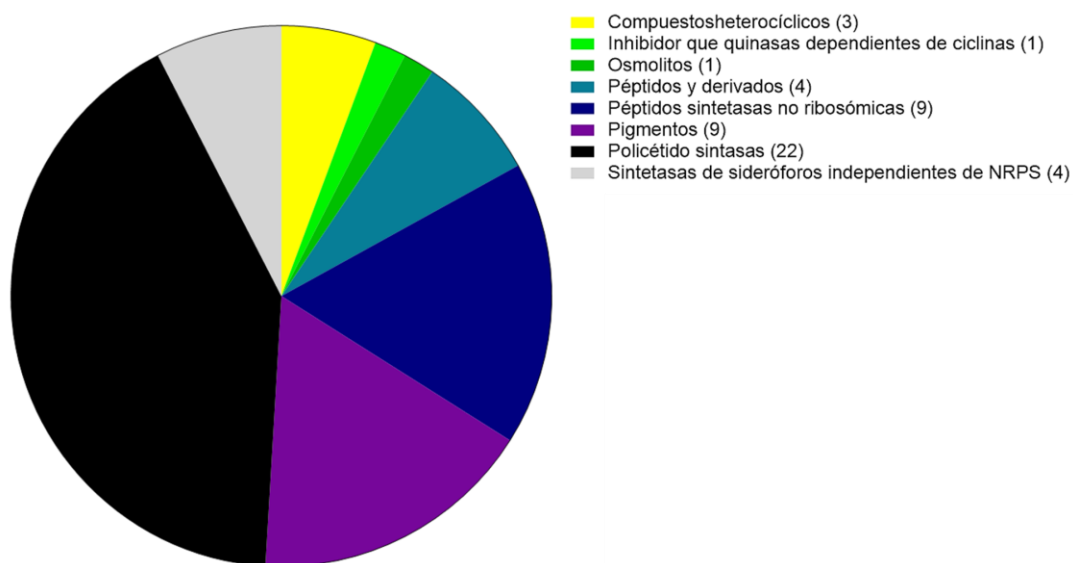


Figura 25. BGCs encontrados en el genoma de CH106. Entre paréntesis se muestra el número de grupos estimados para cada clase.

Por otra parte, para el aislado CH606 se encontraron 39 BGCs de diferentes clases como T3PKS, ectoínas, terpenos, lantipéptidos, entre otros (Tabla S6). Tras la clasificación por función observamos 1 grupo para agentes quelantes, 1 para aminoglucósidos, 3 para inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas, 2 para osmolitos, 9 para péptidos y derivados, 5 para péptidos sintetadas no ribosómicas, 8 para pigmentos, 15 para policétidos sintetasas y 3 para sintetadas de sideróforos independientes de NRPS (Figura 26). Algo importante de mencionar es que en los péptidos y derivados se encontró la presencia de varios lantipéptidos, tiopéptidos, metalóforos y guanidinotidas los cuales podrían estar relacionados con la actividad antimicrobiana del aislado CH606.

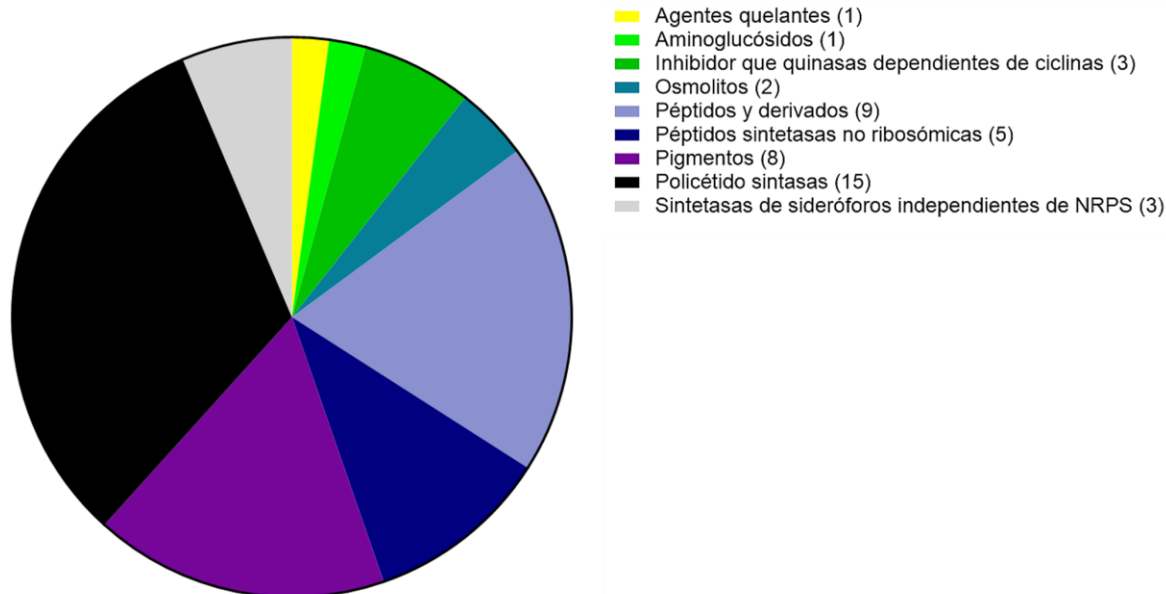


Figura 26. BGCs encontrados en el genoma de CH606. Entre paréntesis se muestra el número de grupos estimados para cada clase.

5.2 Reconstrucción filogenética

La reconstrucción filogenética mediante el gen 16S ARNr mostró que el aislado ADCA49 se relaciona con el género *Nocardioopsis*, mientras que los aislados CH106, CH606, CH653, CH196, CH610, CH617, PR51, ADCA48, ADCA47, ADCA53, ADCA44, ADCA43 y ADCA42 fueron relacionados con el género *Streptomyces* (Figura 27).

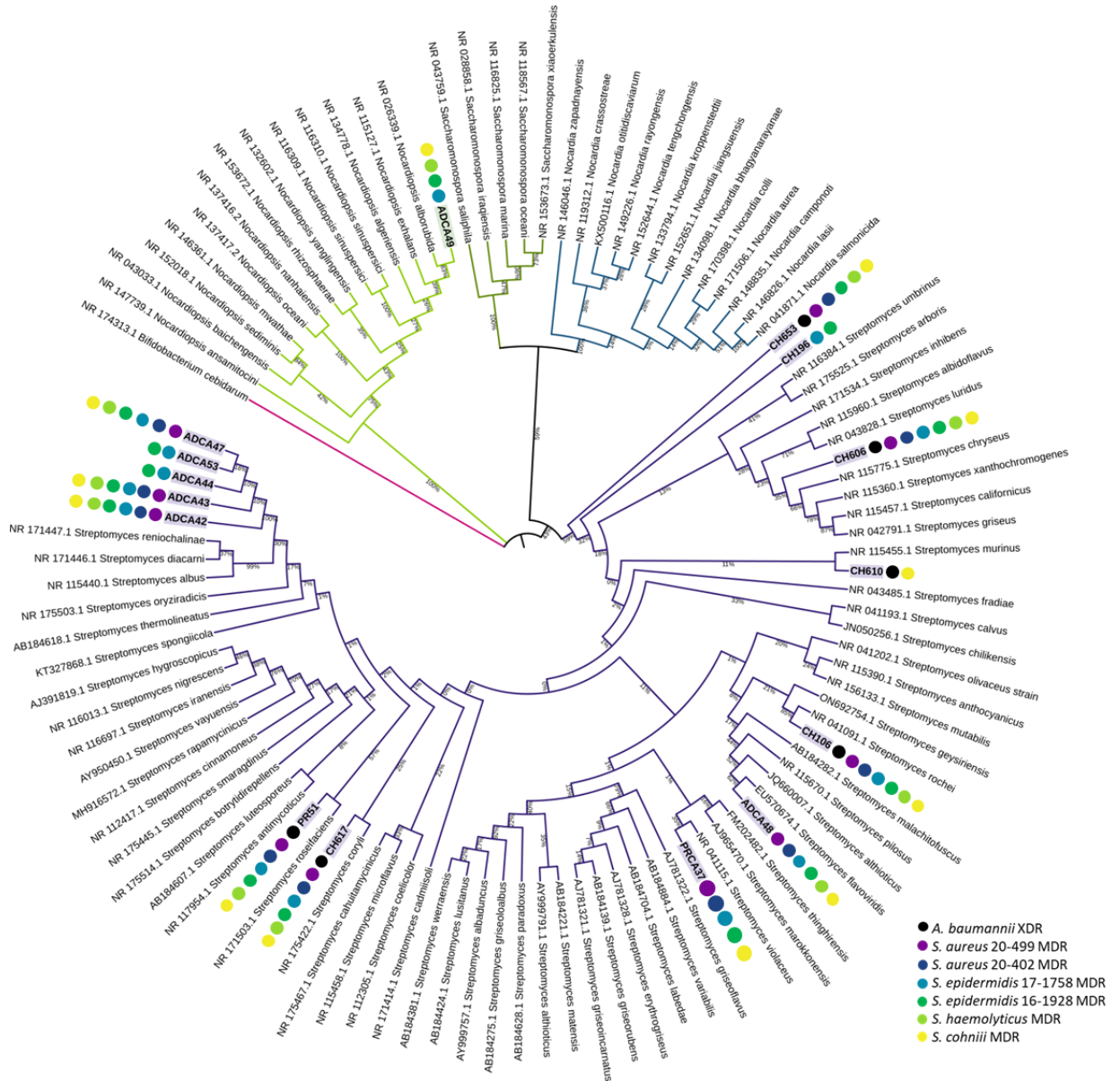


Figura 27. Árbol filogenético basado en el gen 16S ARNr y en el método de máxima verosimilitud (ML), construido por el modelo evolutivo Tamura-Nei I+G con 1000 réplicas. Los puntos de colores representan la actividad antimicrobiana de las actinobacterias contra los aislados clínicos.

5.3 Identidad promedio de nucleótidos

El análisis de identidad promedio de nucleótidos (ANI por sus siglas en inglés: Average Nucleotide Identity) se utilizó como una forma rápida de determinar la similitud entre genomas microbianos. Los resultados del aislado CH106 nuevamente lo clasificaron como del género *Streptomyces* y mostraron una probabilidad del 98.62 % ANI que pertenezca a *S. geysiriensis* (Tabla 13). El aislado CH606 también se clasificó como *Streptomyces* con una probabilidad del 94.94 % ANI de pertenecer a la *S. toxytricini*.

Tabla 13. Análisis de identidad promedio de nucleótidos.

Aislado	Resultado
CH106	<i>Streptomyces geysiriensis</i> (98.62 % ANI, p: 0.022)
CH606	<i>Streptomyces toxytricini</i> (94.94 % ANI, p: 0.096)

DISCUSIÓN

1. Elaboración y caracterización de un cepario de patógenos multifarmacorresistentes

La resistencia a los antibióticos ha ido en aumento en los últimos años, por lo tanto, el Centro Europeo de Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) en conjunto con los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) han propuesto clasificar la resistencia bacteriana como MDR, XDR y PDR. Los perfiles de resistencia obtenidos mostraron que *A. baumannii* fue resistente a 14 antibióticos en 9 categorías de antimicrobianos, de acuerdo con Magiorakos *et al.* (2012) al no ser susceptible a ≥ 1 antibióticos con excepción de ≤ 2 categorías la clasificación que recibe es de XDR o farmacorresistencia extendida. Diversos estudios han mostrado que las cepas de *A. baumannii* cuentan con resistencia intrínseca a varios antibióticos, además son capaces de adquirir resistencia por medio de diversos mecanismos como la adquisición de plásmidos (Simo *et al.*, 2019; Palavecino *et al.*, 2022). Existen reportes en todo el mundo que muestran un gran número de aislados nosocomiales resistentes a antibióticos como las penicilinas, carbapenémicos e incluso las colistinas (Ababneh *et al.*, 2022; Dagher *et al.*, 2020). En México se sabe que existe una prevalencia de más del 80 % de aislados resistentes a carbapenémicos y más del 50 % de resistencia a cefalosporinas, fluoroquinolonas y aminoglucósidos (Alcántar *et al.*, 2019; Garza *et al.*, 2021). Estos datos concuerdan con nuestros resultados, ya que también observamos una resistencia a estos antibióticos.

Por otro lado, el perfil de resistencia de los aislados de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. cohnii* mostraron resistencia a mínimo 4 antibióticos en 4 categorías, que de acuerdo con Magiorakos *et al.* (2012) se clasifican como MDR al no ser susceptibles a ≥ 1 agente en ≥ 3 categorías de antimicrobianos. En hospitales, los *Staphylococcus* son considerados como reservorios de genes de resistencia a antibióticos, en todo el mundo existen reportes de cepas resistentes a aminoglucósidos, cefalosporinas, penicilinas y macrólidos (Senobar *et al.*, 2021; Vazquez *et al.*, 2021), estos datos concuerdan con los resultados obtenidos, ya que observamos que nuestros aislados también eran resistentes a antibióticos de estas categorías.. Entre los *Staphylococcus* vimos que *S. haemolyticus* fue el de mayor resistencia a los antibióticos, al ser resistente

a 12 antibióticos en 10 categorías, varios reportes mencionan que *S. haemolyticus* es uno de los CoNs con mayor resistencia encontrado en hospitales, en donde más del 50 % de los aislados son resistentes a macrólidos, fluoroquinolonas, aminoglucósidos o tetraciclinas, jugando un papel importante en la aparición de cepas epidémicas (Haque *et al.*, 2021; Nicolosi *et al.*, 2020).

2. Actinobacterias de Cuatro Ciénegas con actividad antagonista contra patógenos multirresistentes

Tras la evaluación de actinobacterias por ensayos de antagonismo, observamos que 44 % de un total de 214 aislados evaluados mostraron actividad antimicrobiana en al menos un medio de cultivo, dicho porcentaje es cercano a reportes previos, de bioprospección en donde se ha observado un 38 – 50 % de actividad inhibitoria por parte de actinobacterias (Assou *et al.*, 2023; Majidzadeh *et al.*, 2021).

Los resultados de antagonismo mostraron que 80 cepas actinobacterias presentaban actividad al menos contra un aislado del género *Staphylococcus*, 5 únicamente contra *A. baumannii* y 10 actinobacterias contra ambos géneros. Existen reportes en donde se ha observado que las actinobacterias son capaces de inhibir a un gran número de bacterias patógenas Gram positivas y negativas como *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *B. cereus*, e incluso se ha visto que son capaces de inhibir levaduras como *C. albicans* (Assou *et al.*, 2023; Elbendary *et al.*, 2018). Por lo tanto, resultados concuerdan con investigaciones previas en donde mencionan que las actinobacterias son excelentes productoras de compuestos antimicrobianos, entre ellos los antibióticos (Phongsopitanuna *et al.*, 2020).

Diversos autores atribuyen la gran actividad antimicrobiana de las actinobacterias a su capacidad de producir una amplia gama de compuestos antimicrobianos, sin embargo, existen reportes de aislados que solo son capaces de producir un solo tipo o clase antimicrobiano (Awolusi *et al.*, 2020; Subramani & Sipkema, 2019; Zhu *et al.*, 2020), esto concuerda con nuestros resultados observados, ya que algunos aislados mostraron actividad únicamente contra el género *Staphylococcus* o inclusive solo contra una especie de bacteria patógena como *S. epidermidis* o *S. cohnii*.

Al analizar la actividad antagonista de las actinobacterias de Cuatro Ciénegas, Coahuila con base en los distintos medios de cultivo observamos que el medio que indujo mayor actividad contra *A. baumannii* XDR, *S. aureus* MDR y *S. haemolyticus* MDR fue ISP2. Risandiansyah & Yahya (2022) mencionan que en actinobacterias, el medio ISP2 es el recomendado para la producción de compuestos antimicrobianos, ya que las fuentes de carbono y nitrógeno como la glucosa, malta y levadura presentes en el medio, favorecen el excelente crecimiento de las actinobacterias y, en consecuencia, un aumento en la producción de metabolitos secundarios. Por otro lado, para *S. epidermidis* MDR y *S. cohnii* MDR el medio que presentó la mayor actividad antimicrobiana fue ISP6. Singh & Dubey (2020) mencionan algunos de los componentes del medio ISP6 como el fosfato de potasio, citrato de amonio férrico o el tiosulfato de sodio funcionan como cofactores de enzimas relacionadas con las rutas metabólicas para la producción de compuestos antimicrobianos específicos como lo son los péptidos antimicrobianos. Estos resultados nos muestran que los nutrientes son clave para la producción de compuestos antimicrobianos por parte de las actinobacterias.

Los cultivos líquidos de las 10 actinobacterias que tuvieron actividad contra ambos géneros bacterianos mostraron que 5 de ellas perdían actividad tras ser crecidas en medio líquido. Esta observación es consistente con otros estudios en donde han reportado que la “pérdida” de la actividad antimicrobiana cuando son pasadas a medio líquido por que las condiciones de cultivo sumergido afectan en gran medida al metabolismo y por ende la producción de los compuestos antimicrobianos. Además, se ha visto que en cultivos líquidos los antimicrobianos liberados pueden llegar a ser inactivados e inclusive en ocasiones pueden sufrir modificaciones químicas haciendo que estos pierdan su actividad inhibitoria (Sapkota *et al.*, 2020).

Existen estudios que sugieren que es mejor evitar medios complejos, para evitar modificaciones posteriores y se discute acerca de que los medios complejos dificultan el análisis posterior de las rutas metabólicas debido al gran número de componentes y de igual forma, estos generan un mayor costo al momento de producción por lo que es mejor optar por medio más simples (Abduljaba & Salih, 2022) Por estas razones se eligió el medio ISP2 para los análisis posteriores.

3. Identificación de los compuestos bioactivos con actividad antimicrobiana

El extracto orgánico crudo de *Streptomyces* CH106 obtenido con acetato de etilo, mostró una actividad antimicrobiana positiva contra todos los patógenos al presentar halos de inhibición tras los ensayos de bioautografía encontrando diferencias en su espectro de acción. Las CMI obtenidas del extracto CH106 fueron de 50 mg/ml para *A. baumannii* XDR y *S. aureus* MDR, mientras que para *S. epidermidis* MDR fue de 25 mg/ml.

Al respecto, estudios previos demuestran que las actinobacterias son mejores productoras de compuestos antimicrobianos contra bacterias Gram positivas que contra Gram negativas (Djebbah *et al.*, 2021). También se ha observado que las CMI de las bacterias Gram negativas tienden a ser más altas debido a su morfología celular, ya que a diferencia de las Gram positivas cuentan con una membrana externa y con lipopolisacáridos que funcionan como barrera para la entrada de un gran número de antibióticos (Joshua *et al.*, 2021).

Existen otros factores que son determinantes en la CMI de compuestos antimicrobianos naturales, algunos de ellos son las condiciones de producción, la concentración y el tipo de metabolito bioactivo y por ello, es importante realizar una optimización de la producción de los compuestos antimicrobianos (Ali *et al.*, 2022). La optimización del proceso buscando las mejores condiciones del cultivo, se recomienda como prioridad para próximos estudios.

El liofilizado del sobrenadante del cultivo de *Streptomyces* CH606 también mostró actividad antimicrobiana y las CMI obtenidas de este liofilizado fueron de 0.5 mg/ml para *A. baumannii* XDR y 0.25 mg/ml para *S. aureus* MDR y *S. epidermidis* MDR. La marcada actividad contra las especies de *Staphylococcus* pueden tener diversas interpretaciones, entre ellas, pudo deberse a la capacidad de inhibición de las actinobacterias, al tipo de metabolito bioactivo, a las condiciones de producción e incluso al tipo o a la susceptibilidad propia de los microorganismos ya que se sabe que algunos géneros bacterianos presentan de forma natural resistencia a cierto tipo de antibióticos (Djebbah *et al.*, 2021; Joshua *et al.*, 2021). Además, al ser un extracto liofilizado existe una mayor concentración de los compuestos antimicrobianos, en contraste con los extractos

orgánicos y por ende la CMI puede llegar a ser menor en comparación con otros tipos de extractos (Ali *et al.*, 2022; Peterson & Kaur, 2018).

El extracto proteico del liofilizado de *Streptomyces* CH606 mostró una concentración de 1.65 mg/ml de proteínas y tras su evaluación los resultados indicaron que contaba con actividad antimicrobiana contra *A. baumannii* XDR, *S. aureus* MDR, *S. epidermidis* MDR, *S. haemolyticus* MDR y *S. cohnii* MDR, sugiriendo la presencia de al menos un compuesto antimicrobiano de origen proteico. Diversos autores mencionan que las actinobacterias son productoras de un gran número de compuestos antimicrobianos de origen proteico conocidos como péptidos antimicrobianos (AMPs por sus siglas en inglés: antimicrobial peptides) y muchos de ellos se comercializan actualmente (Joseph *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2018).

Los resultados de la caracterización del concentrado proteico mostraron que la actividad antimicrobiana se mantenía contra todos los patógenos aun tras el calentamiento a 95°C por 5 minutos, lo cual de acuerdo con Ahire *et al.* (2020); esto sugiere que nuestro antimicrobiano es resistente al calor. Mientras que los resultados tras el tratamiento con tripsina mostraron que la actividad no fue reducida por completo, ya que observamos inhibición de todos los patógenos aun después de la digestión enzimática, Li y colaboradores (2017) aluden que esto podría deberse a la presencia de más de una proteína o péptido antimicrobiano, además mencionan que la tripsina solo realiza una digestión parcial de las proteínas ya que es una endopeptidasa que rompe únicamente enlaces entre la arginina y lisina, por lo que no es capaz de digerir a ciertas clases de péptidos. Relacionado con este último punto, otros autores han sugerido que las características estructurales de los péptidos se relacionan con la resistencia a proteasas ya que se ha visto que las estructuras diméricas, cíclicas o con giros β formados por enlaces iónicos, disulfuro o hidrógeno son de protección contra el sitio catalítico de la tripsina (Arias *et al.*, 2018; Cline & Waters, 2009; Getz *et al.*, 2011; Shin *et al.*, 2010). Por lo tanto, la prevalencia de la actividad sugiere la presencia de uno o más péptidos resistentes a la digestión por tripsina.

Los resultados obtenidos del SDS-PAGE reafirman la presencia de más de un péptido ya que se observaron bandas de diferentes tamaños las cuales iban desde los 11 kDa hasta más de 100 kDa. De acuerdo con Bin y colaboradores (2021) las bacterias Gram positivas, como lo son las actinobacterias, son capaces de producir diferentes tipos de péptidos, entre ellos los péptidos de clase II, cuyo tamaño es de ~ 10 kDa y por lo regular son termoestables, concordando con nuestros resultados obtenidos tras el tratamiento con calor. En el caso de las otras bandas, estas podrían tratarse de AMPs de clase III, los cuales se caracterizan por un tamaño de > 30 kDa y a su vez suelen ser termoestables, mientras que las bandas más grandes podrían pertenecer a AMPs de clase IV, los cuales se caracterizan por ser de gran tamaño al contener partes de lípidos o carbohidratos (Simons et al., 2020). Estos resultados presentan una evidencia más de la ampliamente descrita capacidad de las actinobacterias de para producir diversos péptidos con actividad antimicrobiana (Joseph *et al.*, 2021) y que se presentan también en las aisladas de CCC.

4. Caracterización de actinobacterias con actividad antimicrobiana

Con respecto a la caracterización de los aislados CH106 y CH606 el perfil de resistencia mostró que CH106 fue resistente a 16 antibióticos en 12 categorías y CH606 fue resistente a 14 antibióticos en 8 categorías, reportes previos mencionan que las actinobacterias pueden ser resistentes a un gran número de antibióticos de forma intrínseca, al ser productores de uno o más antibióticos cuentan con diversos mecanismos de resistencia como bombas especializadas en la expulsión de los antibióticos o la ausencia de los sitios blanco, además al estar en constante convivencia con otros microorganismos productores de antimicrobianos como bacterias, levaduras u hongos son capaces de adquirir plásmidos o ADN libre en el ambiente (Fatahi, 2019; Rahdar *et al.*, 2021).

Ahora bien, la caracterización morfológica mostró que nuestros aislados CH106 y CH606 son bacterias Gram positivas, filamentosas y formadoras de esporas, además mostraron un crecimiento positivo en distintos medios de cultivo con diversas fuentes de carbono y nitrógeno, varios autores mencionan que las actinobacterias son capaces de utilizar distintos sustratos para su crecimiento debido a su gran diversidad metabólica, además muchas de estas cuentan con sistemas robustos para crecer aun en condiciones de estrés

por nutrientes, sal, pH o temperatura (Singh & Dubey, 2020; Risandiansyah & Yahya, 2022).

El ensamble de los genomas CH106 y CH606 mostró que el tamaño de ambos aislados fue alrededor de a los 7 Mpb, si bien es cierto que al compararlo con el genoma de referencia de *Streptomyces coelicolor* el tamaño de ambos fue menor, diversos autores mencionan que los genomas de actinobacterias suelen oscilar entre los 6.7 y 10.1 Mpb (Lee *et al.*, 2020; Subramaniam *et al.*, 2020). El contenido de GC de ambos genomas fue arriba del 70 %, estos resultados concuerdan con una de las principales características de las actinobacterias, ya que estas suelen presentar un contenido de GC de 70-75 % (Heinsch *et al.*, 2019). Con respecto al contenido de CDS, los resultados mostraron que ambos genomas tenían cerca de 7 mil regiones codificantes, aunque este número fue menor al previamente reportado en *S. coelicolor* (cepa M1154/pAMX4) nuestros resultados son cercanos a datos previamente publicados por Lee y colaboradores (2020), quienes tras el análisis de 30 genomas de actinobacterias vieron que el promedio de CDS fue de 7 mil, concordando con lo observado en este trabajo.

Por otra parte, tras la búsqueda predictiva de BGCs en el genoma del aislado CH106 se encontraron 52 grupos, mientras que CH606 mostró 39. Estos datos concuerdan con estudios previos en donde se han encontrado aislados del género *Streptomyces* hasta con 58 BGCs (Singh *et al.*, 2021). Al clasificar los BGCs por función, observamos que en ambos genomas se encontraron osmolitos, pigmentos y sintetasa de sideróforos, los cuales, de acuerdo con estudios previos posiblemente sean esenciales para la supervivencia ya que codifican para compuestos como la ectoína que es un osmoprotector o los sideróforos que son mediadores importantes para las interacciones con otros miembros en comunidades microbianas (Feng *et al.*, 2022; Heinsch *et al.*, 2019). Otra clase de BGCs encontrados fueron los terpenos, estos pertenecen la clase de compuestos orgánicos volátiles y son ampliamente conocidos por su amplio potencial terapéutico al tener propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antimicrobianas (Singh & Dubey, 2020).

El mayor número de BGCs encontrados fueron de las clases de policétidos sintetasa (PKS) y los péptidos sintetasa no ribosomales (NRPS), en actinobacterias son de

importancia farmacéutica, ya que forman complejos enzimáticos modulares que realizan el ensamblado de un alto número de metabolitos secundarios como los antibióticos y son capaces de generar diversos tipos con diferentes conformaciones (Chen *et al.*, 2021). Además, trabajos anteriores han identificado en varias especies del género *Streptomyces* grupos de PKS y NRPS involucrados en la producción de antibióticos como la cefamicina, daptomicina, rifamicina, tetraciclina, entre otros (Amin *et al.*, 2020). Entre los BGCs restantes se encontraban aquellos péptidos y derivados como los lantipéptidos, lassopéptidos o tiopéptidos, los cuales de acuerdo con reportes previos cuentan con actividad antimicrobiana contra un amplio rango de bacterias Gram positivas y negativas como *S. aureus* MRSA, *Enterococcus spp.* vancomicina resistentes y *E. coli* (Gomes *et al.*, 2017; Kodani & Unno, 2020).

Algo importante a mencionar es que más del 80 % de las BGCs encontradas en ambos genomas no contaron con similitud significativa con bases de datos reportadas, esto sugiere que ambos aislados podrían ser productores de dichos compuestos, pero con conformaciones novedosas (Pei *et al.*, 2021). De acuerdo con Skinnider y colaboradores (2020) la baja similitud podría deberse al tipo de plataforma utilizada para la predicción de BGCs, ya que antiSMASH se caracteriza por utilizar genomas de referencia, dificultando la predicción de tipos y estructuras de BGCs nuevas o divergentes. Por otro lado, se ha visto que las actinobacterias aisladas de ambientes con condiciones oligotróficas (como CCC) cuentan con mayor potencial biosintético novedoso, incluso en el género *Streptomyces* (Gallegos *et al.*, 2020). Con relación a esto, González y colaboradores (2023) determinaron que las actinobacterias raras presentes en CCC cuentan con un mayor índice novedad biosintética y codifican nuevos subconjuntos de BGCs en contraste con otras actinobacterias aisladas de suelos de rizosferas, bosques o minas. Estos datos en conjunto con nuestros resultados resaltan el potencial de las actinobacterias raras de CCC para la búsqueda de nuevas moléculas con actividad antimicrobiana.

Otro resultado notable de este estudio fue haber trabajado con especies putativamente nuevas, especialmente del género *Streptomyces*. Particularmente los aislados más bioactivos contra patógenos, el CH106 y CH606 pertenecen al género *Streptomyces*. Para

acercarnos lo más posible a su relación filogenética con las especies ya reportadas, se hizo un análisis ANI donde los resultados obtenidos fueron un 98.62 % y 94.94 % para los aislados CH106 y CH606 respectivamente. Liu y colaboradores (2020) mencionan los umbrales propuestos para la clasificación taxonómica, en donde se utiliza un porcentaje de 45 – 65 % para la misma familia, un 65 – 95 % para el mismo género y un 95 – 100 % para la misma especie. Con base a esto, se corroboró que el aislado CH106 pertenece al género *Streptomyces* y posiblemente pertenezca a la especie *Streptomyces geysiriensis* con un 98.62 %. Por otro lado, el aislado CH606 también se identificó como del género *Streptomyces* y el pariente más cercano según el análisis fue *Streptomyces toxytricini*, sin embargo, el porcentaje obtenido fue menor al 95 % recomendado para la clasificación de especies, por lo que se sospecha la posibilidad de pertenecer otra especie. Estos resultados sugieren que el aislado *Streptomyces sp.*_CH606 pertenece a una especie no representada en las bases de datos o inclusive se trate de una especie nueva. Finalmente, en el caso de ambos aislados si se desea confirmar o conocer la especie a la perteneces es necesario realizar análisis más detallados en donde se incluyan otros genes marcadores (Amin *et al.*, 2019; Jiao *et al.*, 2021; Li & Huang, 2022).

CONCLUSIONES

En el presente estudio se destaca la importancia de las etapas tempranas en la búsqueda de nuevos antibióticos a partir de productos naturales de actinobacterias taxonómicamente diversas aisladas de un ambiente inexplorado y extremo. Estos produjeron una amplia gama de compuestos bioactivos capaces de inhibir patógenos multirresistentes tanto para Gram positivos como Gram negativos.

El 41 % (87 aislados) de las cepas de actinobacterias evaluadas, mostraron actividad antimicrobiana contra al menos un aislado clínico MDR y/o XDR.

Los medios de cultivo como ISP2 e ISP6 favorecen la producción de compuestos antimicrobianos en comparación con los medios ISP4 e ISP7, también evaluados.

*Streptomyces sp.*_CH106 mostró la mayor actividad antagonista produciendo compuestos antimicrobianos contra todos los aislados de *Staphylococcus spp.* MDR y *A. baumannii* XDR. En donde la CMI del extracto orgánico de la cepa *Streptomyces sp.*_106 fue de 25 mg/ml contra los aislados patógenos Gram positivos *S. aureus* 20-499 MDR, *S. aureus* ATCC BAA-44 y *S. epidermidis* 17-1758 MDR; mientras que para las bacterias Gram negativas *A. baumannii* XDR y *A. baumannii* ATCC 15308 fue de 50 mg/ml.

*Streptomyces sp.*_CH606 produce al menos un compuesto antimicrobiano de naturaleza peptídica insensible al calor y a la actividad proteasa, contra todos los aislados de *Staphylococcus* MDR y *A. baumannii* XDR.

Los genomas de las cepas *Streptomyces sp.*_106 y *Streptomyces sp.*_606 codifican para 52 y 39 islas biosintéticas respectivamente, de las cuales, el 82.69 y 84.61 % no tienen similitud significativa con las bases de datos reportadas.

La diversidad de compuestos codificados por los elementos genómicos en la cepa *Streptomyces sp.*_106, está enriquecida con policétidos sintetasas que representan el 51.61 % de los metabolitos secundarios predichos; mientras que para la cepa *Streptomyces sp.*_606 los policétidos sintetasas representan el 51.28 %.

El conjunto de resultados de nuestro trabajo sugiere que las actinobacterias de CCC representan un reservorio de potencial biosintético novedoso y por ello, una prometedora fuente de posibles nuevos fármacos antimicrobianos.

Los estudios y esfuerzos de bioprospección dependientes de cultivo son una parte integral de las plataformas en la búsqueda de nuevos antibióticos. El presente trabajo es una evidencia más sobre la gran riqueza que representan las actinobacterias de sitios externos que no solo nos ofrecen pautas acerca de las claves para sobrevivir a los desafíos del cambio climático, sino que son una riqueza que debe salvaguardarse protegiendo las áreas que albergan estos microorganismos.

PERSPECTIVAS

La producción de compuestos antimicrobianos de las cepas *Streptomyces sp._106* y *Streptomyces sp._606* es prometedora y se sugiere seguir investigando los compuestos bioactivos. Un paso principal es lograr la separación e identificación de los compuestos antimicrobianos por métodos de cromatografías y espectrofotometría de masas.

Una vez obtenida la molécula activa es importante determinar la concentración mínima inhibitoria de células planctónicas y formadoras de biopelícula, tanto en bacterias Gram positivas como negativas.

Otro posible enfoque es evaluar la actividad antimicrobiana contra hongos y levaduras de importancia clínica como *Candida albicans* o *Candida auris*.

Finalmente, estandarizar el proceso de producción de los compuestos bioactivos para iniciar las pruebas en cultivos de células *in vitro*, así como análisis *in vivo* en modelos murinos.

BIBLIOGRAFÍA

Ababneh, Q., Abulaila, S., & Jaradat, Z. (2021). Isolation of extensively drug resistant *Acinetobacter baumannii* from environmental surfaces inside intensive care units. *American Journal of Infection Control*. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2021.09.001>

Abdolmaleki, Z., Mashak, Z., & Safarpour Dehkordi, F. (2019). Phenotypic and genotypic characterization of antibiotic resistance in the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from hospital cockroaches. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0505-7>

Abduljaba, M. H., & Salih, T. S. (2022). Antimicrobial Activity of Ten Local Actinobacterial Strains against ESKAPE, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas baetica* Pathogens. *South Asian Journal of Research in Microbiology*, 13(4), 1-10. <https://doi.org/10.9734/sajrm/2022/v13i4253>

Abu, A., Nor, M., Mohammad, E., Abdullah, A., & Hanani, A. (2020). Antibiotic Susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* among Undergraduate Students in Malaysia Public University Health Campus. *Medicine & Health*, 15(1), 166–176. <https://doi.org/10.17576/mh.2020.1501.15>

Achek, R., Hotzel, H., Cantekin, Z., Nabi, I., Hamdi, T. M., Neubauer, H., & El-Adawy, H. (2018). Emerging of antimicrobial resistance in staphylococci isolated from clinical and food samples in Algeria. *BMC Research Notes*, 11(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3762-2>

Adam, D., Maciejewska, M., Naômé, A., Martinet, L., Coppieters, W., Karim, L., Baurain, D., & Rigali, S. (2018). Isolation, Characterization, and Antibacterial Activity of Hard-to-Culture Actinobacteria from Cave Moonmilk Deposits. *Antibiotics*, 7(2), 28. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7020028>

Ahire, J. J., Kashikar, M. S., Lakshmi, S. G., & Madempudi, R. (2020). Identification and characterization of antimicrobial peptide produced by indigenously isolated *Bacillus*

paralicheniformis UBBLi30 strain. 3 *Biotech*, 10(3), 112. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-2109-6>

Alam, M., & Jha, D. K. (2020). Reviewing Antagonistic Actinomycetes in the era of drug resistance. *Critical Reviews*, 7(15), 3120–3135. ISSN- 2394-5125

Alcántar, M. D., Rosales, R., Jarillo, M. D., Gayosso, C., Fernández, J. L., Toledano, J. E. & Santos-Preciado, J. I. (2019). Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* in Three Tertiary Care Hospitals in Mexico: Virulence Profiles, Innate Immune Response and Clonal Dissemination. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02116>

Al-Haqan, A., Boswihi, S. S., Pathan, S., & Udo, E. E. (2020). Antimicrobial resistance and virulence determinants in coagulase-negative staphylococci isolated mainly from preterm neonates. *PloS One*, 15(8), e0236713. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236713>

Ali, A. R., Bahrami, Y., Kakaei, E., Mohammadzadeh, S., Bouk, S., & Jalilian, N. (2022). Isolation and identification of endophytic actinobacteria from *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad and their antibacterial properties. *Microbial cell factories*, 21(1), 206. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01936-9>

Álvarez, C. E. (2021). Bioprospección de géneros raros de actinobacterias de Cuatro Ciénegas, Coahuila. [Tesis de Licenciatura]. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Amin, D. H., Abdallah, N. A., Abolmaaty, A., Tolba, S., & Wellington, E. M. (2020). Microbiological and molecular insights on rare Actinobacteria harboring bioactive prospective. *Bulletin of the National Research Centre*, 44(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0266-8>

Amin, D. H., Abolmaaty, A., Borsetto, C., Tolba, S., Abdallah, N. A., & Wellington, E. M. (2019). In silico genomic mining reveals unexplored bioactive potential of rare actinobacteria isolated from Egyptian soil. *Bulletin of the National Research Centre*, 43, 1-9. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0121-y>

Ananda, R., Dharumadurai, D., & Manogaran, G. P. (2016). An Introduction to Actinobacteria. In Actinobacteria. *Basics and Biotechnological Applications*, 3–38. <https://doi.org/10.5772/62329>

Andrews, S. (2010) FastQC. Babraham Bioinforma.

Arias, M., Piga, K., Hyndman, M., & Vogel, H. (2018). Improving the Activity of Trp-Rich Antimicrobial Peptides by Arg/Lys Substitutions and Changing the Length of Cationic Residues. *Biomolecules*, 8(2), 19. <https://doi.org/10.3390/biom8020019>

Arocha-Garza, H. F. (2018). Diversidad y bioprospección de actinobacterias de Cuatro Ciénegas, Coahuila con potencial farmacéutico [Tesis de Doctorado]. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Arocha-Garza, H. F., Canales-Del Castillo, R., Eguiarte, L. E., Souza, V., & De la Torre-Zavala, S. (2017). High diversity and suggested endemicity of culturable Actinobacteria in an extremely oligotrophic desert oasis. *PeerJ*, (5), 1–21. <https://doi.org/10.7717/peerj.3247>

Asif, M., Alvi, I. A., & Ur Rehman, S. (2018). Insight into acinetobacter baumannii: Pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities. *Infection and Drug Resistance*, 11, 1249–1260. <https://doi.org/10.2147/IDR.S166750>

Assou, S.A., Anissi, J., Sendide, K. & Hassouni, M.E. (2023) Diversity and Antimicrobial Activities of Actinobacteria Isolated from Mining Soils in Midelt Region, Morocco. *The Scientific World Journal*. Vol., 19. <https://doi.org/10.1155/2023/6106673>

Awolusi, O. O., Ademakinwa, A. N., Ojo, A., Erasmus, M., Bux, F., & Agunbiade, M. O. (2020). Marine Actinobacteria Bioflocculant: A Storehouse of Unique Biotechnological Resources for Wastewater Treatment and Other Applications. *Applied Sciences*, 10(21), 7671. <https://doi.org/10.3390/app10217671>

Barros, E. M., Ceotto, H., Bastos, M. C. F., Dos Santos, K. R. N., & Giambiagi-deMarval, M. (2012). Staphylococcus haemolyticus as an important hospital pathogen and carrier of methicillin resistance genes. *Journal of Clinical Microbiology*, *50*(1), 166–168. <https://doi.org/10.1128/JCM.05563-11>

Basak, S., Singh, P., & Rajurkar, M. (2016). Multidrug Resistant and Extensively Drug Resistant Bacteria: A Study. *Journal of Pathogens*, *2016*, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2016/4065603>

Bassetti, M., Peghin, M., Trecarichi, E. M., Carnelutti, A., Righi, E., Del Giacomo, P. & Tumbarello, M. (2017). Characteristics of staphylococcus aureus bacteraemia and predictors of early and late mortality. *PLoS ONE*, *12*(2), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170236>

Benhadj, M., Gacemi-Kirane, D., Menasria, T., Guebla, K., & Ahmane, Z. (2019). Screening of rare actinomycetes isolated from natural wetland ecosystem (Fetzara Lake, northeastern Algeria) for hydrolytic enzymes and antimicrobial activities. *Journal of King Saud University - Science*, *31*(4), 706–712. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.03.008>

Billot-Klein, D., Gutmann, L., Bryant, D., Bell, D., Van Heijenoort, J., Grewal, J., & Shlaes, D. M. (1996). Peptidoglycan synthesis and structure in Staphylococcus haemolyticus expressing increasing levels of resistance to glycopeptide antibiotics. *Journal of Bacteriology*, *178*(15), 4696–4703. <https://doi.org/10.1128/jb.178.15.4696-4703.1996>

Bin Hafeez, A., Jiang, X., Bergen, P. J., & Zhu, Y. (2021). Antimicrobial Peptides: An Update on Classifications and Databases. *International journal of molecular sciences*, *22*(21), 11691. <https://doi.org/10.3390/ijms222111691>

Blin, K., Shaw, S., Kloosterman, A., Charlop, Z., Weezel, G., Medema, M., Weber, T. (2021) antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. *Nucleic Acids Research* doi: 10.1093/nar/gkab335.

Bonilla-Rosso, G., Peimbert, M., Alcaraz, L. D., Hernández, I., Eguiarte, L. E., Olmedo-Alvarez, G., & Souza, V. (2012). Comparative metagenomics of two microbial mats at Cuatro Ciénegas Basin II: Community structure and composition in oligotrophic environments. *Astrobiology*, *12*(7), 659–673. <https://doi.org/10.1089/ast.2011.0724>

Buda, G., Cristy, S. A., Garsin, D. A., & Lorenz, M. C. (2020). Antimicrobial Peptides: a New Frontier in Antifungal Therapy. *mBio*, *11*(6), e02123-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.02123-20>

Bundale, S., Singh, J., Begde, D., Nashikkar, N., & Upadhyay, A. (2018). Culturable rare actinomycetes from Indian forest soils: Molecular and physicochemical screening for biosynthetic genes. *Iranian Journal of Microbiology*, *10*(2), 132–142.

Calderón, G., & Aguilar, L. (2016). Resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, *LXXIII* (621), 757–763. Retrieved from <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/621/art03.pdf>.

Celis, Y. A., Rubio, V. V., & Camacho, M. M. (2017). Perspectiva histórica del origen evolutivo de la resistencia a antibióticos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *19*(2), 105–117. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.69501>

Cerritos, R., Vinuesa, P., Eguiarte, L. E., Herrera-Estrella, L., Alcaraz-Peraza, L. D., Arvizu-Gómez, J. L. & Souza, V. (2008). *Bacillus coahuilensis* sp. nov., a moderately halophilic species from a desiccation lagoon in the Cuatro Ciénegas Valley in Coahuila, Mexico. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *58*(4), 919–923. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64959-0>

Chabi, R., & Momtaz, H. (2019). Virulence factors and antibiotic resistance properties of the *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from hospital infections in Ahvaz, Iran. *Tropical Medicine and Health*, *47*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s41182-019-0180-7>

Chen, H. J., Hung, W. C., Lin, Y. T., Tsai, J. C., Chiu, H. C., Hsueh, P. R., & Teng, L. J. (2015). A novel fusidic acid resistance determinant, *fusF*, in *Staphylococcus cohnii*.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 70(2), 416–419.
<https://doi.org/10.1093/jac/dku408>

Chen, L., Wang, Z., Du, S., & Wang, G. (2021). Antimicrobial activity and functional genes of actinobacteria from coastal wetland. *Current Microbiology*, 78(8), 3058-3067.
<https://doi.org/10.1007/s00284-021-02560-3>

Chokshi, A., Sifri, Z., Cennimo, D., & Horng, H. (2019). Global Contributors to Antibiotic Resistance. *Journal of global infectious diseases*, 11(1), 36–42.
https://doi.org/10.4103/jgid.jgid_110_18

Cline, L. L., & Waters, M. L. (2009). The structure of well-folded β -hairpin peptides promotes resistance to peptidase degradation. *Peptide Science: Original Research on Biomolecules*, 92(6), 502-507. <https://doi.org/10.1002/bip.21266>

Craft, K. M., Nguyen, J. M., Berg, L. J., & Townsend, S. D. (2019). Methicillin-resistant: *Staphylococcus aureus* (MRSA): Antibiotic-resistance and the biofilm phenotype. *MedChemComm*, 10(8), 1231–1241. <https://doi.org/10.1039/c9md00044e>

Czekaj, T., Ciszewski, M., & Szewczyk, E. M. (2015). *Staphylococcus haemolyticus* – An emerging threat in the twilight of the antibiotics age. *Microbiology (United Kingdom)*, 161(11), 2061–2068. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000178>

Da Silva, J. B., Espinal, M., & Ramón-Pardo, P. (2020). Antimicrobial resistance: Time for action. *Pan American Journal of Public Health*, 44, 1–2.
<https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.131>

Dagher, M., Ruffin, F., Marshall, S., Taracila, M., Bonomo, R.A., Reilly, R., Fowler, V.G. & Thaden, J.J.T., (2020). Case Report: Successful Rescue Therapy of Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Osteomyelitis with Cefiderocol, *Open Forum Infectious Diseases*, Volume 7, Issue 5, May, ofaa150,
<https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa150>

De Anda, V., Zapata-Peñasco, I., Blaz, J., Poot-Hernández, A. C., Contreras-Moreira, B., González-Laffitte, M. & Souza, V. (2018). Understanding the Mechanisms Behind the Response to Environmental Perturbation in Microbial Mats: A Metagenomic-Network Based Approach. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02606>

De Carvalho, V. C., De Oliveira, P. R. D., Dal-Paz, K., De Paula, A. P., Félix, C. S., & Munhoz, A. (2012). Gram-negative osteomyelitis: Clinical and microbiological profile. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16(1), 63–67. [https://doi.org/10.1016/S1413-8670\(12\)70276-3](https://doi.org/10.1016/S1413-8670(12)70276-3)

Dimri, A. G., Chauhan, A., & Aggarwal, M. (2020). Antibiotic potential of actinomycetes from different environments against human pathogens and microorganisms of industrial importance: a review. *Science Archives*, 01(01), 07–24. <https://doi.org/10.47587/sa.2020.1102>

Djebbah, F. Z., Belyagoubi, L., Abdelouahid, D. E., Kherbouche, F., Al-Dhabi, N. A., Arasu, M. V., & Ravindran, B. (2021). Isolation and characterization of novel Streptomyces strain from Algeria and its in-vitro antimicrobial properties against microbial pathogens. *Journal of Infection and Public Health*, 14(11), 1671-1678. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.09.019>

Du, X., Zhu, Y., Song, Y., Li, T., Luo, T., Sun, G. & Li, M. (2013). Molecular Analysis of Staphylococcus epidermidis Strains Isolated from Community and Hospital Environments in China. *PLoS ONE*, 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062742>

Dziri, R., Klibi, N., Lozano, C., Ben Said, L., Bellaaj, R., Tenorio, C. & Torres, C. (2016). High prevalence of Staphylococcus haemolyticus and Staphylococcus saprophyticus in environmental samples of a Tunisian hospital. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 85(2), 136–140. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.03.006>

Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Research*, Volume 32, Issue 5, 1, Pages 1792–1797, <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>

Elbendary, A.A., Hessain, A.M., El-Hariri, M.D., Seida, A.A., Moussa, I. M., Mubarak, A. S., Saleh, A. & Hassan, A. (2018). Isolation of antimicrobial producing Actinobacteria from soil samples, Saudi. *Journal of Biological Sciences*, Volume 25, Issue 1, Pages 44-46, ISSN 1319-562X, <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.05.003>.

Escalante, A. E., Caballero-Mellado, J., Martínez-Aguilar, L., Rodríguez-Verdugo, A., González-González, A., Toribio-Jiménez, J., & Souza, V. (2009). *Pseudomonas cuatrocienegasensis* sp. nov., isolated from an evaporating lagoon in the Cuatro Ciénegas valley in Coahuila, Mexico. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(6), 1416–1420. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.006189-0>

Espadinha, D., Sobral, R. G., Mendes, C. I., Méric, G., Sheppard, S. K., Carriço, J. A. & Miragaia, M. (2019). Distinct phenotypic and genomic signatures underlie contrasting pathogenic potential of staphylococcus epidermidis clonal lineages. *Frontiers in Microbiology*, 10(AUG), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01971>

Espinosa, L., Monroy, C., Madrigal, D., Navarro, M., Sánchez, J., Buenrostro, J., Villar J., Cifuentes, J.F., Kalambokidis, M., Esquivel, D.A., Viladomat, M., Escalante, A.E., Velez, P., Figueroa, M., Martinez, A., Ramirez, S., Gasca, J., Eguiarte L.E & Souza, V. 2022. Diversity of an uncommon elastic hypersaline microbial mat along a small-scale transect. *PeerJ* 10:e13579 <https://doi.org/10.7717/peerj.13579>

Falcón, L. I., Cerritos, R., Eguiarte, L. E., & Souza, V. (2007). Nitrogen fixation in microbial mat and stromatolite communities from Cuatro Cienegas, Mexico. *Microbial Ecology*, 54(2), 363–373. <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9240-3>

Fatahi-Bafghi, M. (2019). Antibiotic resistance genes in the Actinobacteria phylum. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 38, 1599-1624. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03580-5>

Feng, S., Tang, S., Jian, Y., Huang, X., Jin, L., Zhu, Z., & Li, Z. (2022). Complete Genome Sequence Data of a Novel *Streptomyces* sp. Strain A2-16, a Potential Biological Control

Agent for Potato Late Blight. *Plant Disease*, 106(2), 723-726.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-04-21-0858-A>

França, A., Gaio, V., Lopes, N., & Melo, D. R. (2021). Virulence Factors in Coagulase-Negative Staphylococci. *Pathogens*, 10(170).
<https://doi.org/10.3390/pathogens10020170>

Galac, M. R., Snesrud, E., Lebreton, F., Stam, J., Julius, M., Ong, A. C. & Gann, P. M. (2020). A diverse panel of clinical acinetobacter baumannii for research and development. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(10). <https://doi.org/10.1128/AAC.00840-20>

Gallegos, S., Mejia, P. M., Gonzalez, L. A., Rodriguez, L., Souza, V., & Licona, C. (2020). Draft genome sequence of Streptomyces sp. strain C8S0, isolated from a highly oligotrophic sediment. *Microbiology Resource Announcements*, 9(14), e01441-19.
<https://doi.org/10.1128/MRA.01441-19>

Garza, E., Bocanegra, P., Bobadilla, M., Ponce, L.A., Esteban, V., Silva, J., et al. (2021) Drug resistance phenotypes and genotypes in Mexico in representative gram-negative species: Results from the infivar network. *PLoS ONE* 16(3): e0248614.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248614>

Garza, E., Franco, R., Morfín, R., Echaniz, G., Rojas, F., Bocanegra, P. & Camacho-Ortiz, A. (2020). The Evolution of Antimicrobial Resistance in Mexico during the Last Decade: Results from the INVIFAR Group. *Microbial Drug Resistance*, 26(11), 1372–1382.
<https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0354>

Garza, E., Morfin, R., Martnez, M. A., Gonzalez, E., Gonzlez, O., & Rodriguez, E. (2011). Microbiological and molecular characterization of human clinical isolates of Staphylococcus cohnii, Staphylococcus hominis, and Staphylococcus sciuri. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 43(11–12), 930–936.
<https://doi.org/10.3109/00365548.2011.598873>

Garza, E., Morfín, R., Mendoza, S., Bocanegra, P., Flores, S., Rodríguez, E. & Camacho, A. (2019). A snapshot of antimicrobial resistance in Mexico. Results from 47 centers from

20 states during a six-month period. *PLoS ONE*, *14*(3), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209865>

Gastelo-Acosta, R., & Maguiña-Vargas, C. (2018). Mecanismos de resistencia bacteriana. *Diagnóstico*, *57*(2), 82–86. <https://doi.org/10.33734/diagnostico.v57i2.139>

Getz, J. A., Rice, J. J., & Daugherty, P. S. (2011). Protease-resistant peptide ligands from a knottin scaffold library. *ACS chemical biology*, *6*(8), 837-844. <https://doi.org/10.1021/cb200039s>

Gomes, K. M., Duarte, R. S., & de Freire Bastos, M. D. C. (2017). Lantibiotics produced by Actinobacteria and their potential applications. *Microbiology*, *163*(2), 109-121. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000397>

González, L. A., Quezada, M., Rodríguez, L., Ramos, H., Capon, R. J., Souza, V., ... & Licona, C. (2023). Biosynthetic novelty index reveals the metabolic potential of rare actinobacteria isolated from highly oligotrophic sediments. *Microbial Genomics*, *9*(1), 000921. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000921>

Guo, Y., Song, G., Sun, M., Wang, J., & Wang, Y. (2020). Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*(March), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00107>

Hamidian, M., & Nigro, S. J. (2019). Emergence, molecular mechanisms and global spread of carbapenem-resistant acinetobacter baumannii. *Microbial Genomics*, *5*(10). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000306>

Han, J. E., Lee, S., Jeong, D. G., Yoon, S. W., Kim, D. J., Lee, M. S. & Park, S. C. (2017). Complete genome sequence of multidrug-resistant *Staphylococcus cohnii* ssp. *urealyticus* strain SNUDS-2 isolated from farmed duck, Republic of Korea. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *10*, 37–39. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.05.008>

Haque, M.H., Miah, M.L., Sarker, S., Shamsuzzaman, M. & Shiddiky, M.J.A. (2021). Molecular Characterization and Antibioqram Profiling of Multidrug Resistant

Staphylococcus haemolyticus Isolated from Patients with Urinary Tract Infection in Bangladesh. *J Bacteriol Mycol.* 8(2): 1166. <https://doi.org/10.26420/jbacteriolmycol.2021.1166>

Heinsch, S. C., Hsu, S. Y., Otto-Hanson, L., Kinkel, L., & Smanski, M. J. (2019). Complete genome sequences of *Streptomyces* spp. isolated from disease-suppressive soils. *BMC genomics*, 20(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6279-8>

Henrique Rosa, L., Gomes Machado, K. M., Jacob, C. C., Capelari, M., Augusto Rosa, C., & Leomar Zani, C. (2003). Screening of Brazilian Basidiomycetes for Antimicrobial Activity. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(7), 967–974. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762003000700019>

Hernando, S., Coque, T. M., Baquero, F., & Martínez, J. L. (2019). Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nature Microbiology*, 4(9), 1432–1442. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0503-9>

Hui, M. L.Y., Tan, L. T.H., Letchumanan, V., He, Y.W., Fang, C.M., Chan, K.G., Law, J. W.F., & Lee, L.H. (2021). The Extremophilic Actinobacteria: From Microbes to Medicine. *Antibiotics*, 10(6), 682. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060682>

Jiang, J. H., Dexter, C., Cameron, D. R., Monk, I. R., Baines, S. L., Abbott, I. J. & Peleg, A. Y. (2019). Evolution of daptomycin resistance in coagulase-negative staphylococci involves mutations of the essential two-component regulator WALKR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(3). <https://doi.org/10.1128/AAC.01926-18>

Jiang, Z. K., Tuo, L., Huang, D. L., Osterman, I. A., Tyurin, A. P., Liu, S. W. & Sun, C. H. (2018). Diversity, novelty, and antimicrobial activity of endophytic actinobacteria from mangrove plants in Beilun Estuary National Nature Reserve of Guangxi, China. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAY), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00868>

Jiao, J. Y., Fu, L., Hua, Z. S., Liu, L., Salam, N., Liu, P. F., & Li, W. J. (2021). Insight into the function and evolution of the Wood–Ljungdahl pathway in Actinobacteria. *The ISME Journal*, 15(10), 3005-3018. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-00935-9>

Johnson, E. N., Burns, T. C., Hayda, R. A., Hospenthal, D. R., & Murray, C. K. (2007). Infectious complications of open type III tibial fractures among combat casualties. *Clinical Infectious Diseases*, 45(4), 409–415. <https://doi.org/10.1086/520029>

Jose, P. A., Maharshi, A., & Jha, B. (2021). Actinobacteria in natural products research: Progress and prospects. *Microbiological Research*, 246, 126708. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126708>

Joseph, J., Abirami, B., Manigundan, K., Gopikrishnan, V., & Radhakrishnan, M. (2021). Antimicrobial peptides from Actinobacteria: Current status and future prospects. *Microbial and Natural Macromolecules*. 205-231 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820084-1.00009-0>

Joshua, S. A., Sangeetha, N., Iniyan, A. M., & Vincent, S. G. P. (2021). Exploring antagonistic actinobacteria from a mangrove ecosystem of the southern coast of India against multidrug-resistant pathogens. *Environmental and Experimental Biology*, 19(4), 255-263. <http://doi.org/10.22364/eeb.19.24>

Kodani, S., & Unno, K. (2020). How to harness biosynthetic gene clusters of lasso peptides. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology: Official Journal of the Society for Industrial Microbiology and Biotechnology*, 47(9-10), 703-714. <https://doi.org/10.1007/s10295-020-02292-6>

Kourtis, A. P., Hatfield, K., Baggs, J., Mu, Y., See, I., Epton, E. & Cardo, D. (2019). Vital Signs: Epidemiology and Recent Trends in Methicillin-Resistant and in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections — United States. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 68(9), 214–219. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6809e1>

Krueger, F. (2015) Trim Galore. A Wrapper Tool around Cutadapt and FastQC to Consistently Apply Quality and Adapter Trimming to FastQ Files; Babraham Bioinformatics: Cambridgeshire, UK

Kumar, R. R., & Jadeja, V. J. (2018). Characterization and partial purification of an antibacterial agent from halophilic actinomycetes *Kocuria* sp. strain rsk4. *BioImpacts* : BI, 8(4), 253–261. <https://doi.org/10.15171/bi.2018.28>

Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G., & Marinelli, F. (2000). Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 78(3–4), 399–405. <https://doi.org/10.1023/A:1010287600557>

Lee, L. H., Chan, K. G., Stach, J., Wellington, E. M. H., & Goh, B. H. (2018). Editorial: The search for biological active agent(s) from actinobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAY), 1–4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00824>

Lee, N., Kim, W., Hwang, S., Lee, Y., Cho, S., Palsson, B., & Cho, B. K. (2020). Thirty complete *Streptomyces* genome sequences for mining novel secondary metabolite biosynthetic gene clusters. *Scientific data*, 7(1), 55. <https://doi.org/10.1038/s41597-020-0395-9>

Letunic, I., Bork, P. (2021) Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res* doi: 10.1093/nar/gkab301

Li, D., Liu, C.M., Luo, R., Sadakane, K., Lam, T.W. (2015) MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics* 31:1674–1676.

Li, J., Koh, J. J., Liu, S., Lakshminarayanan, R., Verma, C. S., & Beurman, R. W. (2017). Membrane active antimicrobial peptides: translating mechanistic insights to design. *Frontiers in neuroscience*, 11, 73. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00073>

Li, Y., & Huang, Y. (2022). Distribution and evolutionary history of sialic acid catabolism in the phylum actinobacteria. *Microbiology Spectrum*, 10(1), e02380-21. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02380-21>

Liaqat, I., Muhammad, N., Mubin, M., Arshad, N., Iftikhar, T., Sajjad, S., & Rashid, F. (2022). Antibacterial and Larvicidal Activity of Ethyl Acetate Extract of Actinomycetes from Soil Samples. *Zoological Society of Pakistan* <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.09.019>

Lienen, T., Schnitt, A., Hammerl, J. A., Marino, S. F., Maurischat, S., & Tenhagen, B. A. (2021). Multidrug-resistant *Staphylococcus cohnii* and *Staphylococcus urealyticus* isolates from German dairy farms exhibit resistance to beta-lactam antibiotics and divergent penicillin-binding proteins. *Scientific Reports*, *11*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85461-6>

Liu, S. W., Ye, J. J., Lu, Q. P., Cheema, M. T., Abbas, M., Huang, D. L. & Sun, C. H. (2020). *Motilibacter deserti* sp. nov. and *Motilibacter aurantiacus* sp. nov., two novel actinobacteria isolated from soil of Cholistan Desert and emended description of the genus *Motilibacter*. *Systematic and Applied Microbiology*, *43*(6), 126150. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126150>

Long, Y., Jiang, J., Hu, X., Zhou, J., Hu, J., & Zhou, S. (2019). Actinobacterial community in Shuanghe Cave using culture-dependent and -independent approaches. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *35*(10). <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2713-y>

López, N. E., Heidelberg, K. B., Nelson, W. C., García, F., Eguiarte, L. E., & Souza, V. (2013). Microbial secondary succession in soil microcosms of a desert oasis in the Cuatro Ciénegas Basin, Mexico. *PeerJ*, *2013*(1), 1–21. <https://doi.org/10.7717/peerj.47>

Lynch, M. D. J., & Neufeld, J. D. (2015). Ecology and exploration of the rare biosphere. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(4), 217–229. doi:10.1038/nrmicro3400

MacGowan, A. P. (2008). Clinical implications of antimicrobial resistance for therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *62* (SUPPL. 2), 105–115. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn357>

MacLean, R. C. & Millan, A. S. (2019). The evolution of antibiotic resistance. *Science*, *365*(6458), 1082–1083. <https://doi.org/10.1126/science.aax3879>

Magiorakos, A., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G. & Hindler, J. F. (2012). Bacteria: an International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>

Majidzadeh, M., Heidarieh, P., Fatahi-Bafghi, M. et al. (2021). Antimicrobial activity of Actinobacteria isolated from dry land soil in Yazd, Iran. *Mol Biol. Rep* 48, 1717–1723. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06218-y>

Makvandi, P., Wang, C., Zare, E. N., Borzacchiello, A., Niu, L. & Tay, F. R., Metal-Based Nanomaterials in Biomedical Applications: Antimicrobial Activity and Cytotoxicity Aspects. *Advanced Functional Materials* Volume 30, Issue 222020, 1910021. <https://doi.org/10.1002/adfm.201910021>

Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K., & Kim, S. K. (2014). Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. *Microbiological Research*, 169(4), 262–278. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.07.014>

Manoharan, M., Sistla, S., & Ray, P. (2021). Prevalence and Molecular Determinants of Antimicrobial Resistance in Clinical Isolates of Staphylococcus haemolyticus from India. *Microbial Drug Resistance*, 27(4), 501–508. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0395>

Maragakis, L. L., & Perl, T. M. (2008). Acinetobacter baumannii: Epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. *Clinical Infectious Diseases*, 46(8), 1254–1263. <https://doi.org/10.1086/529198>

Martinez, Z., Quiñones, E., & Rincón, G. (2017). Potencial biotecnológico de las actinobacterias aisladas de suelos. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 21(63), 39–51. Retrieved from https://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/handle/10651/39315/TD_AidaSarmiento.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

Mendoza, S., Garcia, J. F., Morfín, R., Villarreal, L., Camacho, A., Rodríguez, E. & Garza, E. (2017). Draft genome sequences of two opportunistic pathogenic strains of

Staphylococcus cohnii isolated from human patients. *Standards in Genomic Sciences*, 12(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s40793-017-0263-1>

Miranda, M. G., Flores, K., López, Y., Rodríguez, M., Solórzano, F., Soto, J. L., & Ponce de León, S. (2020). Antimicrobial resistance and antibiotic consumption in Mexican hospitals. *Salud Pública de México*, 62(1), 42–49. Retrieved from <http://saludpublica.mx/index.php/spm/article/view/10543/11829>

Morejón, M. (2013). Betalactamasas de espectro extendido. *Revista Cubana de Medicina*, 52(4), 272–280.

Motta, J. C., Forero-Carreño, C., Arango, & Sánchez, M. (2020). Staphylococcus cohnii endocarditis in native valve. *New Microbes and New Infections*, 38, 100825. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2020.100825>

Moubareck, C. A., & Halat, D. H. (2020). Insights into Acinetobacter baumannii: A review of microbiological, virulence, and resistance traits in a threatening nosocomial pathogen. *Antibiotics*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9030119>

Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*, (6), 481–511. <https://doi.org/10.1128/9781555819286.ch17>

Nasaj, M., Saeidi, Z., Asghari, B., Roshanaei, G., & Arabestani, M. R. (2020). Identification of hemolysin encoding genes and their association with antimicrobial resistance pattern among clinical isolates of coagulase-negative Staphylococci. *BMC Research Notes*, 13(1), 4–9. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-4938-0>

Nicolosi D., Cinà, D., Naso, N.D., D'Angeli, F., Salmeri, M. & Genovese, C. (2020). Antimicrobial Resistance Profiling of Coagulase-Negative Staphylococci in a Referral Center in South Italy: A Surveillance Study. *The Open Microbiology Journal*, Volume 14., 91-97 DOI: 10.2174/1874285802014010091

Núñez-Montero, K., & Barrientos, L. (2018). Advances in Antarctic Research for Antimicrobial Discovery: A Comprehensive Narrative Review of Bacteria from Antarctic Environments as Potential Sources of Novel Antibiotic Compounds Against Human Pathogens and Microorganisms of Industrial Importance. *Antibiotics*, 7(4), 90. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7040090>

Olson, R.D., Assaf, R., Brettin, T., Conrad, N., Cucinell, C., Davis, J.J., Dempsey, D.M., Dickerman, A., Dietrich, E.M., Kenyon, R.W., Kuscuoglu, M., Lefkowitz, E.J., Lu, J., Machi, D., Macken, C., Mao, C., Niewiadomska, A., Nguyen, M., Olsen, G.J., Overbeek, J.C., Parrello, B., Parrello, V., Porter, J.S., Pusch, G.D., Shukla, M., Singh, I., Stewart, L., Tan, G., Thomas, C., VanOeffelen, M., Vonstein, V., Wallace, Z.S., Warren, A.S., Wattam, A.R., Xia, F., Yoo, H., Zhang, Y., Zmasek, C.M., Scheuermann, R.H., Stevens, R.L. (2022) Introducing the Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC): a resource combining PATRIC, IRD and ViPR. *Nucleic Acids Res.* doi: 10.1093/nar/gkac1003.

Ortega, S., & Cerón, G. (2017). Producción de biopelículas y resistencia antimicrobiana en uropatógenos aislados de catéteres urinarios en un hospital de rehabilitación física. *Investigación En Discapacidad*, 6(October), 115–121. Retrieved from www.medigraphic.org.mx

Otto M. (2004). Virulence factors of the coagulase - negative Staphylococci. *Allergy*, 9(2004), 841–863. <https://doi.org/10.2741/1295>

Palavecino, E., Greene, S. R. & Kilic, A. (2022). Characterisation of carbapenemase genes and antibiotic resistance in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* between 2019 and 2022, *Infectious Diseases*, 54:12, 951-953, <https://doi.org/10.1080/23744235.2022.2113137>

Papan, C., Schröder, M., Hoffmann, M., Knoll, H., Last, K., Albrecht, F. & Becker, S. L. (2021). Combined antibiotic stewardship and infection control measures to contain the spread of linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* in an intensive care unit.

Antimicrobial Resistance and Infection Control, 10(1), 99.
<https://doi.org/10.1186/s13756-021-00970-3>

Pei, S., Niu, S., Xie, F., Zhang, S., Wang, W., & Zhang, G. (2021). Complete genome sequence of *Streptomyces* sp. HSG2 from rhizosphere soil of mangrove in Qingmei Gang, Sanya. *Archives of Microbiology*, 203(6), 3519-3524. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02339-x>

Peleg, A. Y., Seifert, H., & Paterson, D. L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(3), 538–582. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-07>

Perez, F., Hujer, A. M., Hujer, K. M., Decker, B. K., Rather, P. N., & Bonomo, R. A. (2007). Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(10), 3471–3484. <https://doi.org/10.1128/AAC.01464-06>

Peterson, E., & Kaur, P. (2018). Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Frontiers in microbiology*, 9, 2928. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02928>

Petinaki, E., Kanellopoulou, M., Damani, A., Foka, A., Spiliopoulou, I., Skalmoutsou, N. & Papafragas, E. (2009). Linezolid-resistant *Staphylococcus cohnii*, Greece. *Emerging Infectious Diseases*, 15(1), 116–118. <https://doi.org/10.3201/eid1501.080769>

Phongsopitanun, W., Sripreechusak, P., Rueangsawang, K., Panyawut, R., Pittayakhajonwut, P., & Tanasupawat, S. (2020). Diversity and antimicrobial activity of culturable endophytic actinobacteria associated with Acanthaceae plants. *ScienceAsia*, 46, 288.

Rahdar, H. A., Mahmoudi, S., Bahador, A., Ghiasvand, F., Sadeghpour Heravi, F., & Feizabadi, M. M. (2021). Molecular identification and antibiotic resistance pattern of actinomycetes isolates among immunocompromised patients in Iran, emerging of new infections. *Scientific reports*, 11(1), 10745. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90269-5>

Read, A. F., & Woods, R. J. (2014). Antibiotic resistance management. *Evolution, Medicine and Public Health*, 2014(1), 147. <https://doi.org/10.1093/emph/eou024>

Region, K., Pandey, B., Ghimire, P., & Agrawal, V. P. (2000). Studies on the antibacterial activity of the Actinomycetes isolated from the. *Proteus*, (January), 2–5.

Risandiansyah, R., & Yahya, A. (2022). Antibiotic Activity of Actinomycetes Isolated from Young Tectona Grandis (L.) Wood and Pith. *Biointerface Res. Appl. Chem*, 12, 8174-8183. <https://doi.org/10.33263/BRIAC126.81748183>

Rodriguez, L. M., Gunturu, S., Harvey, W. T., Rosselló, R., Tiedje, J. M., Cole, J. R., & Konstantinidis, K. T. (2018). The Microbial Genomes Atlas (MiGA) webserver: taxonomic and gene diversity analysis of Archaea and Bacteria at the whole genome level. *Nucleic acids research*, 46(W1), W282–W288. <https://doi.org/10.1093/nar/gky467>

Rodriguez, L. M., Harvey, W. T., Rosselló, R., Tiedje, J. M., Cole, J. R., Konstantinidis, K. T. (2020). Classifying prokaryotic genomes using the Microbial Genomes Atlas (MiGA) webserver. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. doi: 10.1002/9781118960608.bm00042.

Roque, C. A., da Silva, P. B., Rodrigues, M. C., Azevedo, R. B., Di Filippo, L., Duarte, J. L., Chorilli, M., Festozo Vicente, E., & Pavan, F. R. (2021). Challenge in the Discovery of New Drugs: Antimicrobial Peptides against WHO-List of Critical and High-Priority Bacteria. *Pharmaceutics*, 13(6), 773. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060773>

Ruangpan, L. (2004). Minimal inhibitory concentration (MIC) test and determination of antimicrobial resistant bacteria. In *Laboratory manual of standardized methods for antimicrobial sensitivity tests for bacteria isolated from aquatic animals and environment* (pp.31-55). *Tigbauan, Iloilo, Philippines: Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center*

Salwan, R., & Sharma, V. (2020). Molecular and biotechnological aspects of secondary metabolites in actinobacteria. *Microbiological Research*, 231(September 2019), 126374. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126374>

Sánchez, J. M., Sorlózano, A., Navarro, J. M., & Gutiérrez, J. (2019). Evolution of the antibiotic-resistance of microorganisms causing urinary tract infections: A 4-year epidemiological surveillance study in a hospital population. *Revista Clinica Espanola*, 219(3), 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.rce.2018.07.005>

Sapkota, A., Thapa, A., Budhathoki, A., Sainju, M., Shrestha, P., & Aryal, S. (2020). Isolation, characterization, and screening of antimicrobial-producing actinomycetes from soil samples. *International journal of microbiology*. <https://doi.org/10.1155/2020/2716584>

Senobar, SA, Stájer A, Barrak I, Ostorházi E, Szabó D. & Gajdács M. (2021). Correlation Between Biofilm-Formation and the Antibiotic Resistant Phenotype in *Staphylococcus aureus* Isolates: A Laboratory-Based Study in Hungary and a Review of the Literature. *Infect Drug Resist.* 2021; 14:1155-1168 <https://doi.org/10.2147/IDR.S303992>

Serra, M. (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 16(3), 402–419.

Sharma, S., Fulke, A. B., & Chaubey, A. (2019). Bioprospection of marine actinomycetes: recent advances, challenges and future perspectives. *Acta Oceanologica Sinica*, 38(6), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s13131-018-1340-z>

Shin, Y. P., Park, H. J., Shin, S. H., Lee, Y. S., Park, S., Jo, S., Yong, S. L. & Lee, I. H. (2010). Antimicrobial activity of a halocidin-derived peptide resistant to attacks by proteases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(7), 2855-2866. <https://doi.org/10.1128/AAC.01790-09>

Shrestha, L. B., Bhattarai, N. R., & Khanal, B. (2017). Antibiotic resistance and biofilm formation among coagulase-negative staphylococci isolated from clinical samples at a tertiary care hospital of eastern Nepal. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 6(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13756-017-0251-7>

Shrivastava, S. R., Shrivastava, P. S., & Ramasamy, J. (2018). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *Journal of Medical Society*, 32(1), 76–77. https://doi.org/10.4103/jms.jms_25_17

Silva, W. A., Pinheiro, A. M., Jahns, B., Bögli-Stuber, K., Droz, S., & Zimmerli, S. (2011). Breast abscess due to *Actinomyces europaeus*. *Infection*, 39(3), 255–258. <https://doi.org/10.1007/s15010-011-0119-3>

Simo, P.L., Rabenandrasana, M.A.N., Kowalewicz, C. et al. (2019). Phenotypic and molecular characterisations of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Madagascar. *Antimicrob Resist Infect Control* 8, 31 <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0491-9>

Simons, A., Alhanout, K., & Duval, R. E. (2020). Bacteriocins, Antimicrobial Peptides from Bacterial Origin: Overview of Their Biology and Their Impact against Multidrug-Resistant Bacteria. *Microorganisms*, 8(5), 639. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050639>

Singh, R., & Dubey, A. K. (2020). Isolation and characterization of a new endophytic actinobacterium *Streptomyces californicus* strain ADR1 as a promising source of anti-bacterial, anti-biofilm and antioxidant metabolites. *Microorganisms*, 8(6), 929. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060929>

Singh, T. A., Passari, A. K., Jajoo, A., Bhasin, S., Gupta, V. K., Hashem, A., ... & Abd_Allah, E. F. (2021). Tapping into Actinobacterial genomes for natural product discovery. *Frontiers in Microbiology*, 12, 655620. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.655620>

Skinnider, M. A., Johnston, C. W., Gunabalasingam, M., Merwin, N. J., Kieliszek, A. M., MacLellan, R. J., ... & Magarvey, N. A. (2020). Comprehensive prediction of secondary metabolite structure and biological activity from microbial genome sequences. *Nature communications*, 11(1), 6058. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19986-1>

Souza, V., Olmedo-álvarez, G., Editors, L. E. E., & Souza, V. (2018). *Cuatro Ciénegas Ecology, Natural History and Microbiology*. Retrieved from <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-93423-5>.

Souza, V., Siefert, J. L., Escalante, A. E., Elser, J. J., & Eguiarte, L. E. (2012). The Cuatro Ciénegas Basin in Coahuila, Mexico: An astrobiological Precambrian Park. *Astrobiology*, *12*(7), 641–647. <https://doi.org/10.1089/ast.2011.0675>

Strathdee, S. A., Davies, S. C., & Marcelin, J. R. (2020). Confronting antimicrobial resistance beyond the COVID-19 pandemic and the 2020 US election. *The Lancet*, *396*(10257), 1050–1053. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32063-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32063-8)

Subramani, R., & Sipkema, D. (2019). Marine rare actinomycetes: A promising source of structurally diverse and unique novel natural products. *Marine Drugs* (Vol. 17). <https://doi.org/10.3390/md17050249>

Subramaniam, G., & Girish, M. (2020). Antibiotic Resistance — A Cause for Reemergence of Infections. *Indian Journal of Pediatrics*, *87*(11), 937–944. <https://doi.org/10.1007/s12098-019-03180-3>

Subramaniam, G., Thakur, V., Saxena, R. K., Vadlamudi, S., Purohit, S., Kumar, V., ... & Varshney, R. K. (2020). Complete genome sequence of sixteen plant growth promoting *Streptomyces* strains. *Scientific reports*, *10*(1), 10294. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67153-9>

Szewczyk, E. M., Nowak, T., Cieślowski, T., & Różalska, M. (2003). Potential role of *Staphylococcus cohnii* in a hospital environment. *Microbial Ecology in Health and Disease*, *15*(1), 51–56. <https://doi.org/10.1080/08910600310014908>

Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outtersson, K., Patel, J., Cavalieri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh, N. & Theuretzbacher, U. WHO Pathogens Priority List Working Group (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant

bacteria and tuberculosis. *Infectious diseases*, 18(3), 318–327.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)

Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S. (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38:3022-3027

Teeraputon, S., Santanirand, P., Wongchai, T., Songjang, W., Lapsomthob, N., Jaikrasun, D. & Tophon, P. (2017). Prevalence of methicillin resistance and macrolide–lincosamide–streptogramin B resistance in *Staphylococcus haemolyticus* among clinical strains at a tertiary-care hospital in Thailand. *New Microbes and New Infections*, 19, 28–33.
<https://doi.org/10.1016/j.nmni.2017.05.007>

Tiwari, K., & Gupta, R. K. (2012). Rare actinomycetes: A potential storehouse for novel antibiotics. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32(2), 108–132.
<https://doi.org/10.3109/07388551.2011.562482>

Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P. & Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(18), 5649–5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>

Vazquez, G.J., Merida, J., Aparicio, G., Lara, A., De Colsa, A. & Aquino, A., (2021) Molecular Characterization of *Staphylococcus aureus* Obtained from Blood Cultures of Paediatric Patients Treated in a Tertiary Care Hospital in Mexico. *Infect Drug Resist.* 14:1545-1556 <https://doi.org/10.2147/IDR.S302416>

Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Rasool, M. H., Nisar, M. A., Aslam, M. A., & Qamar, M. U. (2018). Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance*, 1645–1658. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173867>

Wattam, A.R., Davis, J.J., Assaf, R., Boisvert, S., Brettin, T., Bun, C., Conrad, N., Dietrich, E.M., Disz, T., Gabbard, J.L., Gerdes, S., Henry, C.S., Kenyon, R.W., Machi, D., Mao, C., Nordberg, E.K., Olsen, G.J., Murphy-Olson, D.E., Olson, R., Overbeek, R., Parrello, B., Pusch, G.D., Shukla, M., Vonstein, V., Warren, A., Xia, F., Yoo, H., Stevens,

- R.L. (2017). Improvements to PATRIC, the all-bacterial Bioinformatics Database and Analysis Resource Center. *Nucleic Acids Res.* doi: 10.1093/nar/gkw1017
- Xie, Y., Liu, Y., Yang, J., Liu, Y., Hu, F., Zhu, K., & Jiang, X. (2018). Gold Nanoclusters for Targeting Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* In Vivo. *Angewandte Chemie - International Edition*, 57(15), 3958–3962. <https://doi.org/10.1002/anie.201712878>
- Xu, Z., Cave, R., Chen, L., Yangkyi, T., Liu, Y., Li, K. & Mkrtychyan, H. V. (2020). Antibiotic resistance and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* recovered from hospital personnel in China. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 22, 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.02.013>
- Xu, Z., Shah, H. N., Misra, R., Chen, J., Zhang, W., Liu, Y. & Mkrtychyan, H. V. (2018). The prevalence, antibiotic resistance and mecA characterization of coagulase negative staphylococci recovered from non-healthcare settings in London, UK. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0367-4>
- Yelin, I., & Kishony, R. (2018). SnapShot: Antibiotic Resistance. *Cell*, 172. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.018>
- Yılmaz, E. Ş., & Aslantaş, Ö. (2017). Antimicrobial resistance and underlying mechanisms in *Staphylococcus aureus* isolates. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(11), 1059–1064. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.10.003>
- Zhang, B., Liu, Z., Lin, Z., Zhang, X., & Fu, W. (2012). Microbiologic characteristics of pathogenic bacteria from hospitalized trauma patients who survived Wenchuan earthquake. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 31(10), 2529–2535. <https://doi.org/10.1007/s10096-012-1591-0>
- Zhao, P., Xue, Y., Gao, W., Li, J., Zu, X., Fu, D. & Li, P. (2018). Actinobacteria –Derived peptide antibiotics since 2000. *Peptides*, 103, 48–59. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.03.011>

Zhen, X., Lundborg, C. S., Zhang, M., Sun, X., Li, Y., Hu, X. & Dong, H. (2020). Clinical and economic impact of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a multicentre study in China. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60825-6>

Zhu, Y., Zhang, P., Zhang, J., Wang, J., Lu, Y., & Pang, X. (2020). Impact on multiple antibiotic pathways reveals MtrA as a master regulator of antibiotic production in *Streptomyces* and potentially in other actinobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/aem.01201-20>

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla S1. Evaluación extensa del perfil de resistencia de los aislados de *A. baumannii* y *Staphylococcus spp.*

Aislado	Antibiótico																																				
	NA	AK	AMP	AMC	CB	CF	FEP	CFX	FOX	CTX	CXM	CPF	CLM	CL	COL	DC	DO	E	GE	IMP	K	LEV	LZD	MEM	MH	NET	NF	P	PB	RD	S	SXT	TE	TZP	VA		
<i>A. baumannii</i> 4542	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-
<i>S. aureus</i> 20-499	R	-	R	R	R	R	R	R	R	-	R	R	R	-	R	R	S	R	I	R	R	R	R	S	R	S	-	-	R	R	I	R	-	S	R	S	
<i>S. aureus</i> 20-402	R	-	R	R	R	R	R	R	R	-	R	R	R	-	R	R	S	R	S	R	R	R	R	S	R	S	-	-	R	R	S	I	S	S	R	S	
<i>S. epidermidis</i> 17-1758	R	-	R	R	I	-	R	I	R	-	R	R	R	-	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	-	-	R	R	R	R	R	R	R	I	S	
<i>S. epidermidis</i> 16-1998	R	-	R	R	I	-	R	R	R	-	R	R	R	-	R	R	S	R	S	S	R	S	S	R	S	-	-	R	R	S	R	S	I	R	S		
<i>S. haemolyticus</i>	R	-	R	R	R	R	R	R	R	-	R	R	R	-	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	-	-	R	R	R	I	R	R	R	S	
<i>S. colmii</i>	R	-	I	R	S	-	R	R	R	-	R	R	R	-	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	-	-	R	R	R	R	I	S	R	-	
<i>A. baumannii</i> ATCC 15308	S	S	-	R	R	-	S	R	R	R	-	-	-	S	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	I	R	-	S	R	R	R	R	R	-		
<i>S. aureus</i> ATCC BAA-44	R	-	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	I	S	R	I	-	-	R	R	R	R	S	R	R	S		

Inhibición pared celular
 Inhibición ADN
 Inhibición metabólica
 Alteraciones en la membrana celular
 Inhibición ribosomal

R: Resistente, **I:** Intermedio, **S:** Susceptible; **NA:** Ácido nalidixico, **AK:** Amikacina, **AMP:** Ampicilina, **AMC:** Amoxicilina + Ácido clavulónico, **CB:** Cefbenicilina, **CF:** Cefalotina, **FEP:** Cefepime, **CFX:** Cefotaxima, **FOX:** Ceftioxitina, **CTX:** Ceftriaxona, **CMX:** Cefuroxima, **CPF:** Ciprofloxacino, **CLM:** Clindamicina, **CL:** Cloranfenicol, **COL:** Colistina, **DC:** Dicloxacilina, **DO:** Doxiciclina, **E:** Eritromicina, **GE:** Gentamicina, **IMP:** Imipenem, **K:** Kanamicina, **LEV:** Levofloxacino, **LDZ:** Linezolid, **MEM:** Meropenem, **MH:** Minociclina, **NET:** Netilmicina, **NF:** Nitrofurantoina, **P:** Penicilina, **PB:** Polimixina B, **RD:** Rifampicina, **S:** Streptomicina, **SXT:** Sulfametoxazol + Trimetropina, **TE:** Tetraciclina, **TZP:** Piperacilina + Tazobactam, **VA:** Vancomicina.

Tabla S2. Aislados de actinobacterias evaluadas ordenadas por poza de origen.

Anteojó			
A511	A518	A519	
Domos del Arqueano			
AD623	AD625	AD629	AD681
AD686	AD687	ADCA12	ADCA13
ADCA14	ADCA15	ADCA16	ADCA17
ADCA18	ADCA19	ADCA20	ADCA21
ADCA22	ADCA23	ADCA24	ADCA25
ADCA26	ADCA27	ADCA28	ADCA29
ADCA30	ADCA31	ADCA33	ADCA35
ADCA36	ADCA40	ADCA42	ADCA43
ADCA44	ADCA46	ADCA47	ADCA48
ADCA49	ADCA50	ADCA51	ADCA53
ADCA54	ADCA55	ADCA56	ADCA57
ADCA60	ADCA61	ADCA62	ADCA63
ADCA65	ADCA66	ADCA67	ADCA68
ADCA75	ADCA76	ADCA77	ADCA78
ADCA79	ADCA80	ADCA81	ADCA82
ADCA85	ADCA86	ADCA88	ADCA89
ADCA91	ADCA92	ADCA93	ADCA94
ADCA95	ADCA96	ADCA97	
Becerra			
BCA10	BCA11	BCA9	
Churince			
CH1	CH10	CH106	CH11
CH12	CH123	CH13	CH15
CH16	CH160	CH162	CH163
CH164	CH167	CH168	CH169
CH171	CH185	CH186	CH187
CH189	CH192	CH193	CH194
CH195	CH196	CH197	CH198
CH200	CH201	CH203	CH204

CH207	CH208	CH209	CH221
CH223	CH230	CH232	CH233
CH236	CH237	CH3	CH30
CH33	CH36	CH4	CH401
CH506	CH516	CH53	CH577
CH579	CH580	CH600	CH601
CH602	CH603	CH605	CH606
CH607	CH610	CH612	CH613
CH614	CH614	CH615	CH617
CH619	CH620	CH628	CH630
CH641	CH653	CH665	CH671
CH676	CH678	CH685	CH698
CH699	CH7	CH702	
Hundidos			
HCA7	HCA8		
Pozas Rojas			
PR105	PR106	PR107	PR108
PR112	PR114	PR115	PR119
PR12	PR33	PR35	PR51
PR561	PR568	PR570	PR571
PR573	PR574	PR587	PR589
PR59	PR69	PR75	PR77
PR79	PR81	PR85	PR96
PRCA1	PRCA2	PRCA3	PRCA37
PRCA38	PRCA39	PRCA4	PRCA5
PRCA58	PRCA59	PRCA6	PRCA64
PRCA69	PRCA70	PRCA71	PRCA72
PRCA73	PRCA74	PRCA90	PRCA98

Tabla S3. Aislados de actinobacterias con actividad antimicrobiana. Inhibición (mm).

Aislado	<i>A. baumannii</i> XDR				<i>S. aureus</i> 20-499 MDR				<i>S. aureus</i> 20-402 MDR				<i>S. epidermidis</i> 17-1758 MDR			
	ISP2	ISP4	ISP6	ISP7	ISP2	ISP4	ISP6	ISP7	ISP2	ISP4	ISP6	ISP7	ISP2	ISP4	ISP6	ISP7
PRCA1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15.97 ± 0.64	15.31 ± 0.01	11.5 ± 0	-
PRCA2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	23 ± 0	-	-
PRCA3	-	-	-	-	19.16 ± 1.91	19.17 ± 1.91	5.75 ± 0	-	-	-	-	-	23 ± 0	11.5 ± 0	11.5 ± 0	-
PRCA4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19.17 ± 3.83	-	23 ± 0	-
PRCA5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	9.58 ± 1.92	-	-
PRCA6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0
HCA7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	11.5 ± 0	-	-
HCA8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21.08 ± 1.92	-	-	-
BCA9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0
BCA10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	-
BCA11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	-
ADCA12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	-	-	-
ADCA15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	-
ADCA17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	-	23 ± 0	23 ± 0
ADCA20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15.3 ± 0	23 ± 0	-
ADCA21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	-	-	-

ADCA22	-	-	-	-	17.25 ± 0	7.60 ± 0	5.75 ± 0	7.60 ± 0	17.25 ± 0	11.50 ± 0	5.75 ± 0	7.60 ± 0	23 ± 0	11.5 ± 0	11.5 ± 0	15.33 ± 0
ADCA23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19.17 ± 3.84	23 ± 0	23 ± 0	-
ADCA24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	-	23 ± 0	-
ADCA26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	-
ADCA27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11.5 ± 0	-
ADCA28	-	-	-	-	15.97 ± 0.64	-	-	-	12.77 ± 1.27	-	-	-	17.25 ± 0	-	23 ± 0	-
ADCA29	-	-	-	-	18.4 ± 0	-	5.75 ± 0	-	17.25 ± 0	-	-	-	23 ± 0	-	23 ± 0	-
ADCA30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	-	-
ADCA31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	-
ADCA35	-	-	-	-	23 ± 0	23 ± 0	-	-	11.5 ± 0	23 ± 0	-	-	19.17 ± 3.83	23 ± 0	23 ± 0	-
ADCA36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0
PRCA37	-	-	-	-	23 ± 0	23 ± 0	-	-	23 ± 0	23 ± 0	-	-	23 ± 0	23 ± 0	-	-
PRCA38	-	-	-	-	23 ± 0	23 ± 0	-	-	19.17 ± 1.91	23 ± 0	-	-	23 ± 0	23 ± 0	-	-
PRCA39	-	-	-	-	21.17 ± 1.83	23 ± 0	-	-	17.25 ± 0	23 ± 0	-	-	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	5.75 ± 0
ADCA40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	-	23 ± 0	-
ADCA42	-	-	-	-	23 ± 0	-	-	-	23 ± 0	-	-	-	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	7.66 ± 0

ADCA43	-	-	-	-	20.44± 2.56	5.62 ± 1.02	-	-	19.17 ± 3.83	-	-	-	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	-
ADCA44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	-
ADCA46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	-
ADCA47	-	-	-	-	18.02 ± 0.38	16.35 ± 1.02	-	-	18.65 ± 0.25	15.33 ± 0	-	-	20.44 ± 1.28	23 ± 0	23 ± 0	-
ADCA48	-	-	-	-	17.25 ± 0	17.50 ± 0	17.25 ± 0	17.25 ± 0	13.42 ± 1.91	9.58 ± 1.91	7.67 ± 1.91	5.75 ± 0	21.08 ± 1.92	23 ± 0	21.08 ± 1.92	17.25 ± 0
ADCA49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	-
ADCA50	-	-	-	-	-	11.5 ± 0	-	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	-
ADCA51	-	-	-	-	11.5 ± 0	-	-	23 ± 0	19.17 ± 1.92	-	-	11.5 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0
ADCA53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	23 ± 0	-
ADCA54	-	-	-	-	-	-	7.66 ± 0	-	-	-	5.75 ± 0	-	-	-	23 ± 0	-
ADCA55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	-
ADCA56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	23 ± 0	-
PRCA58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10.2 ± 1.3	-	23 ± 0	-
ADCA60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	-
ADCA61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.02 ± 0.64	15.31 ± 0.01	-	-
ADCA62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	-	11.5 ± 0	23 ± 0

ADCA63	-	-	-	-	23 ± 0	11.5 ± 0	5.75 ± 0	-	23 ± 0	5.75 ± 0	7.66 ± 0	-	23 ± 0	11.5 ± 0	11.5 ± 0	-
ADCA64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0
ADCA65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	-	11.5 ± 0	-
ADCA66	-	-	-	-	16.61 ± 1.28	11.50 ± 0	-	7.66 ± 0	23 ± 0	8.94 ± 1.28	-	7.66 ± 0	19.17 ± 3.83	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0
ADCA67	-	-	-	-	17.25 ± 0	9.58 ± 1.90	-	-	17.25 ± 0	11.5 ± 0	-	-	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	-
ADCA68	-	-	-	-	19.17 ± 3.83	11.50 ± 0	-	9.58 ± 1.91	22.04 ± 0.96	5.75 ± 0	-	11.5 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0
PRCA69	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17.25 ± 0
PRCA70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	19.17 ± 3.83
PRCA71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.66 ± 0	-	-	-
PRCA72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PRCA73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.66 ± 0	-	23 ± 0	-
PRCA74	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	-
ADCA75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19.17 ± 3.83	23 ± 0	23 ± 0	-
ADCA76	-	-	-	-	17.25 ± 0	-	-	11.5 ± 0	17.25 ± 0	-	-	11.5 ± 0	23 ± 0	11.5 ± 0	-	23 ± 0
PRCA78	-	-	-	-	7.67 ± 1.91	-	-	23 ± 0	-	-	-	23 ± 0	11.5 ± 0	-	19.17 ± 3.83	23 ± 0

ADCA79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0
ADCA80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0
ADCA82	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	-	-	5.75 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	-
ADCA85	39.33 ± 11.2	-	7.67 ± 0.33	21.67 ± 0.88	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0
ADCA86	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	-	5.75 ± 0	-	23 ± 0	15.33 ± 3.83
ADCA88	-	-	-	-	11.5 ± 0	-	-	-	11.5 ± 0	-	-	-	23 ± 0	-	-	-
ADCA89	-	-	-	-	23 ± 0	-	-	-	23 ± 0	-	-	-	23 ± 0	-	-	-
PRCA90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADCA91	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20.12 ± 0
ADCA93	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0
ADCA95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11.5 ± 0	-	-	-	23 ± 0
ADCA96	-	-	-	-	5.75 ± 0	-	-	23 ± 0	-	-	-	23 ± 0	11.5 ± 0	23 ± 0	-	23 ± 0
ADCA97	-	-	-	-	23 ± 0	-	-	23 ± 0	-	-	-	23 ± 0	23 ± 0	-	-	23 ± 0
PRCA98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	-
PR51	36 ± 0	-	-	-	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0
CH230	60 ± 0	-	-	29 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0
CH106	60 ± 0	-	60 ± 0	29 ± 0	23 ± 0	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	23 ± 0	17.25 ± 0	23 ± 0	23 ± 0

CH606	60 ± 0	-	-	22 ± 0	11.5 ± 0	-	11.5 ± 0	-	11.5 ± 0	5.75 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	5.75 ± 0	23 ± 0	-
CH653	60 ± 0	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	-	-	-	23 ± 0	23 ± 0	17.25 ± 0	23 ± 0	23 ± 0
CH641	60 ± 0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	11.5 ± 0	5.75 ± 0	-
CH620	60 ± 0	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	-	-	-	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0
CH619	60 ± 0	-	-	60 ± 0	-	-	-	23 ± 0	-	-	-	17.3 ± 0	20.13	5.75 ± 0	11.5 ± 0	23
CH617	60 ± 0	-	-	60 ± 0	-	-	-	23 ± 0	-	-	-	23 ± 0	21.08 ± 1.92	5.75 ± 0	17.25 ± 0	23 ± 0
CH610	-	-	-	60 ± 0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. coelicolor</i>	-	-	-	-	21.10 ± 1.91	-	-	-	21.17 ± 1.83	-	-	-	23 ± 0	-	-	-

± Error estándar de tres repeticiones, - Sin inhibición.

Tabla S3. Aislados de actinobacterias con actividad antimicrobiana (Continuación).

Aislado	<i>S. epidermidis</i> 16-1928 MDR				<i>S. haemolyticus</i> MDR				<i>S. cohnii</i> MDR			
	ISP2	ISP4	ISP6	ISP7	ISP2	ISP4	ISP6	ISP7	ISP2	ISP4	ISP6	ISP7
PRCA1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PRCA2	-	-	-	-	-	-	11.5 ± 0	-	-	-	-	-
PRCA3	-	-	-	-	-	-	-	-	5.75 ± 0	-	-	-
PRCA4	-	-	-	-	-	-	-	-	17.25 ± 5.75	-	-	-
PRCA5	23 ± 0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PRCA6	-	-	-	-	-	-	-	-	17.25 ± 5.75	-	-	-
HCA7	-	-	-	-	23 ± 0	-	-	-	-	23 ± 0	-	-
HCA8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BCA9	-	-	-	-	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	-	23 ± 0
BCA10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BCA11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADCA12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADCA15	-	-	23 ± 0	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	-
ADCA17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADCA20	-	-	23 ± 0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADCA21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADCA22	-	7.6 ± 0	-	-	23 ± 0	11.5 ± 0	11.5 ± 0	15.25 ± 0	23 ± 0	11.50 ± 0	17.25 ± 0	17.25 ± 0
ADCA23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADCA24	6.6 ± 1	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	-
ADCA26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	-
ADCA27	-	-	5.75 ± 0	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ADCA28	14.03 ± 1.27	-	-	-	18.4 ± 0	-	-	-	15.72 ± 2.13	-	-	-
ADCA29	19.93 ± 1.53	-	-	-	17.25 ± 0	-	6.39 ± 0.64	-	15.33 ± 1.92	-	-	-
ADCA30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADCA31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	-
ADCA35	-	23 ± 0	-	-	5.75 ± 0	23 ± 0	-	-	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	-
ADCA36	-	23 ± 0	23 ± 0	-	-	-	-	-	-	14.05 ± 1.28	-	-
PRCA37	23 ± 0	23 ± 0	-	-	-	-	-	-	17.25	-	-	-
PRCA38	21.17 ± 1.83	23 ± 0	-	-	23 ± 0	23 ± 0	-	-	23 ± 0	23 ± 0	-	-
PRCA39	23 ± 0	23 ± 0	-	-	17.25 ± 0	23 ± 0	-	-	21.08 ± 1.92	23 ± 0	-	-
ADCA40	17.88 ± 1.27	-	-	-	-	-	-	-	6.39 ± 0.64	23 ± 0	-	23 ± 0
ADCA42	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	7.66 ± 0.03	14.05 ± 1.28	-	-	-	23 ± 0	-	6.39 ± 0.64	-
ADCA43	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	-	10.22 ± 1.28	-	-	-	18.53 ± 2.30	23 ± 0	-	-
ADCA44	11.5 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADCA46	-	23 ± 0	23 ± 0	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0
ADCA47	19.55 ± 1.76	23 ± 0	23 ± 0	-	13.42 ± 1.92	7.66 ± 0	-	-	20.44 ± 2.56	23 ± 0	15.33 ± 0	-

ADCA48	15.33 ± 3.83	9.58 ± 1.92	11.5 ± 0	11.5 ± 0	11.5 ± 0	11.5 ± 0	11.5 ± 0	11.5 ± 0	17.25 ± 0	17.25 ± 3.32	-	13.42 ± 1.92
ADCA49	11.5 ± 0	11.5 ± 0	23 ± 0	-	-	-	23 ± 0	-	-	-	23 ± 0	-
ADCA50	-	-	23 ± 0	-	-	-	23 ± 0	-	-	23 ± 0	23 ± 0	-
ADCA51	19.17 ± 1.92	23 ± 0	23 ± 0	-	5.75 ± 0	-	-	-	23 ± 0	-	-	11.5 ± 0
ADCA53	5.75 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADCA54	-	-	5.75 ± 0	-	-	-	23 ± 0	-	-	-	23 ± 0	-
ADCA55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADCA56	-	-	-	-	-	-	7.66 ± 0	-	-	-	23 ± 0	-
PRCA58	-	-	23 ± 0	-	-	-	-	-	11.5 ± 0	-	23 ± 0	-
ADCA60	-	-	23 ± 0	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	-
ADCA61	6.03 ± 0.89	-	-	-	-	-	-	-	-	10.22 ± 1.28	-	-
ADCA62	23 ± 0	-	5.75 ± 0	5.75 ± 0	-	-	-	-	-	-	-	-
ADCA63	23 ± 0	7.66 ± 0	11.5 ± 0	-	23 ± 0	15.25 ± 0	11.5 ± 0	-	23 ± 0	15.20 ± 0.10	7.66 ± 0	5.75 ± 0
ADCA64	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	-	-	-	-	-
ADCA65	11.5 ± 0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADCA66	-	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	12.78 ± 1.28	5.75 ± 0	-	-	23 ± 0	23 ± 0	-	-
ADCA67	17.25 ± 0	11.5 ± 0	-	-	15.33 ± 3.83	5.75 ± 0	-	-	23 ± 0	23 ± 0	-	-

ADCA68	23 ± 0	5.75 ± 0	-	9.58 ± 1.92	19.17 ± 3.83	-	-	-	23 ± 0	17.25 ± 0	-	20.12
PRCA69	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PRCA70	-	-	-	-	-	-	17.25 ± 0	-	-	-	-	-
PRCA71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PRCA72	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	-	-	-	23 ± 0	-
PRCA73	-	-	23 ± 0	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	-
PRCA74	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	-	-	-	23 ± 0	-
ADCA75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11.5 ± 0	-	-
ADCA76	23 ± 0	-	-	11.5 ± 0	23 ± 0	-	-	19.17 ± 1.92	17.25 ± 0	17.25 ± 0	-	23 ± 0
PRCA78	-	-	23 ± 0	23 ± 0	-	-	23 ± 0	21.08 ± 0.96	-	-	23 ± 0	23 ± 0
ADCA79	17.25 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	-	-	-	-	-	-	-	-
ADCA80	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	-	-	-	-	-	-	-	-
ADCA82	-	-	23 ± 0	-	-	-	23 ± 0	-	-	-	23 ± 0	-
ADCA85	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0
ADCA86	-	-	23 ± 0	-	-	-	23 ± 0	-	-	-	23 ± 0	-
ADCA88	17.25 ± 0	-	-	-	11.5 ± 0	-	-	-	11.5 ± 0	-	-	-
ADCA89	20.12 ± 0.04	-	-	-	23 ± 0	-	-	-	23 ± 0	-	-	-
PRCA90	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	-	-	-	23 ± 0	-
ADCA91	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADCA93	-	-	-	23 ± 0	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	-

ADCA95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADCA96	11.5 ± 0	-	-	21.08 ± 3.32	5.75 ± 0	-	-	-	-	21.08 ± 1.92	-	-	23 ± 0
ADCA97	-	-	-	23 ± 0	23 ± 0	-	-	23 ± 0	-	23 ± 0	-	-	23 ± 0
PRCA98	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	-	-	-	-	23 ± 0	-
PR51	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0
CH230	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0
CH106	23 ± 0	5.75 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	-	-	-	-	-	11.5 ± 0	-	23 ± 0
CH606	23 ± 0	5.75 ± 0	17.25 ± 0	-	23 ± 0	5.75 ± 0	23 ± 0	-	-	23 ± 0	-	17.25 ± 0	-
CH653	23 ± 0	5.75 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	-	-	-	23 ± 0	-	-	11.50 ± 0	-	23 ± 0
CH641	23 ± 0	5.75 ± 0	11.5 ± 0	-	-	-	-	-	-	-	5.75 ± 0	5.75 ± 0	-
CH620	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	23 ± 0	-	-	-	23 ± 0	-	-	23 ± 0	23 ± 0	-
CH619	11.5 ± 0	5.75 ± 0	17.25 ± 0	23 ± 0	-	-	-	23 ± 0	-	-	-	-	23 ± 0
CH617	-	11.5 ± 0	11.5 ± 0	23 ± 0	-	-	-	23 ± 0	-	-	5.75 ± 0	-	23 ± 0
CH610	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0	-
<i>S. coelicolor</i>	21.17 ± 1.83	-	-	-	21.08 ± 1.92	-	-	-	-	21.08 ± 1.92	-	-	-

± Error estándar de tres repeticiones, - Sin inhibición.

Tabla S4. Número de genes relacionados con el metabolismo primario tras la anotación con RAST.

Categoría	CH106	CH606
Cofactores, Vitaminas, Pigmentos	158	174
Pared celular y cápsula	41	41
Virulencia y defensa	48	50
Metabolismo del potasio	11	10
Trasporte de membranas	51	40
Adquisición y metabolismo del hierro	47	32
Metabolismo del ARN	50	51
Nucleósidos y Nucleótidos	98	102
Metabolismo Proteico	236	231
Regulación y Señalización celular	23	23
Metabolismo del ADN	90	105
Ácidos grasos, lípidos e isoprenoides	158	153
Metabolismo del Nitrógeno	30	18
Latencia y esporulación	14	1
Respiración	112	119
Respuesta al estrés	55	50
Metabolismo de Compuestos Aromáticos	49	16
Aminoácidos y Derivados	397	396
Metabolismo del azufre	8	9
Metabolismo del fósforo	29	25
Carbohidratos	316	252
Otros	24	27

Tabla S5. BGCs encontrados en el genoma CH106 identificados por antiSMASH.

Región	% Similitud	Clase	No. Genes	Función
17.1	0%	NRPS	1	Péptido sintetasa no ribosómica
42.1	0 %	NRPS	1	Péptido sintetasa no ribosómica
60.1	18 %	NRPS	2	Péptido sintetasa no ribosómica
78.1	28 %	T1PKS	2	Policétido sintasa
132.1	30 %	Terpeno	11	Pigmento
140.1	83 %	NRPS sideróforo independiente	9	Sintetasa de sideróforos independientes de NRPS
148.1	30 %	Terpeno	4	Pigmento
167.1	33 %	T1PKS	3	Policétido sintasa
168.1	0 %	Lantipéptido Clase III	4	Péptido
180.1	75 %	Lasso péptido	28	Péptido
200.1	100 %	Ectoina	9	Osmolito
204.1	26 %	T1PKS	2	Policétido sintasa
246.1	8 %	Butirolactona	7	Inhibidor que quinasas dependientes de ciclinas
247.1	6 %	HgIE-KS	13	Policétido sintasa tipo heterocisto glicolípido sintasa
288.1	0 %	T1PKS	1	Policétido sintasa
305.1	0 %	NRPS	1	Péptido sintetasa no ribosómica
322.1	0 %	NRPS sideróforo independiente	4	Sintetasa de sideróforos independientes de NRPS
329.1	55 %	T1PKS	14	Policétido sintasa
331.1	0 %	T1PKS	1	Policétido sintasa
334.1	0 %	T1PKS	1	Policétido sintasa
361.1	0 %	Lantipéptido Clase V	6	Péptido
376.1	6 %	T1PKS	6	Policétido sintasa
389.1	0 %	Terpeno	15	Pigmento
402.1	0 %	T1PKS	1	Policétido sintasa
435.1	100 %	T1PKS	2	Policétido sintasa
450.1	9 %	Arilpolieno	4	Pigmento
461.1	100 %	Terpeno	15	Pigmento
461.2	83 %	Indol	16	Compuestos heterocíclicos
476.1	7 %	T2PKS	8	Policétido sintasa
486.1	9 %	NRPS sideróforo independiente	6	Sintetasa de sideróforos independientes de NRPS
490.1	66 %	T2PKS	11	Policétido sintasa
516.1	0 %	NRPS sideróforo independiente	4	Sintetasa de sideróforos independientes de NRPS
518.1	0 %	Terpeno	4	Pigmento
528.1	0 %	T1PKS	1	Policétido sintasa

555.1	100 %	T3PKS	17	Policétido sintasa
559.1	9 %	Furano	17	Compuestos heterocíclicos
590.1	88 %	Indol	18	Compuestos heterocíclicos
609.1	30 %	T2PKS	11	Policétido sintasa
612.1	0 %	T1PKS	1	Policétido sintasa
620.1	0 %	NRPS	1	Péptido sintetasa no ribosómica
667.1	27 %	NRPS	6	Péptido sintetasa no ribosómica
681.1	14 %	T1PKS	3	Policétido sintasa
685.1	36 %	T1PKS	2	Policétido sintasa
702.1	0 %	T1PKS	1	Policétido sintasa
719.1	4 %	Terpeno	21	Pigmento
726.1	72 %	NRP- metalóforo, NRPS	22	Péptido, Péptido sintetasa no ribosómica
739.1	0 %	HgIE-KS	2	Policétido sintasa tipo heterocisto glicolípido sintasa
744.1	0 %	T1PKS	1	Policétido sintasa
746.1	100 %	Terpeno	9	Pigmento
748.1	6 %	NRPS	2	Péptido sintetasa no ribosómica
754.1	0 %	NRPS	1	Péptido sintetasa no ribosómica
761.1	100 %	Terpeno	3	Pigmento

Tabla S6. BGCs encontrados en el genoma CH606 identificados por antiSMASH.

Región	% Similitud	Clase	No. Genes	Función
1.1	54 %	T1PKS	45	Policétido sintasa
2.1	0 %	Lantipéptido Clase I	22	Péptido
3.1	7 %	Butirolactona	11	Inhibidor que quinasas dependientes de ciclinas
3.2	44 %	Ácido aminopolicarboxílico	13	Agente quelante
3.3	0 %	T1PKS	28	Policétido sintasa
4.1	47 %	Butirolactona, Ectoína	19	Inhibidor que quinasas dependientes de ciclinas, Osmolito
4.2	16 %	NRPS, Linaridina	54	Péptido sintetasa no ribosómica, Péptido
4.3	11 %	Butirolactona	11	Inhibidor que quinasas dependientes de ciclinas
6.1	55 %	NRP-metalóforo, NRPS, Ectoína	42	Peptido no ribosomal metalóforo, Péptido sintetasa no ribosómica, Osmolito
10.1	0 %	Terpeno	16	Pigmento
10.2	6 %	hgIE-KS	25	Policétido sintasa tipo heterocisto glicolípido sintasa
11.1	10 %	CDPS	20	Derivado de ciclopeptido
21.1	0 %	Lantipéptido Clase I	22	Péptido
25.1	57 %	T3PKS, Guanidinotidas	24	Policétido sintasa, Péptido
30.1	100 %	Lantipéptido Clase IV	22	Péptido
34.1	100 %	Melanina, Terpeno	33	Pigmento
36.1	100 %	T3PKS	28	Policétido sintasa
38.1	0 %	Terpeno	15	Pigmento
42.1	37 %	NRPS	41	Péptido sintetasa no ribosómica
45.1	14 %	Terpeno	13	Pigmento
49.1	80 %	T1PKS	18	Policétido sintasa
55.1	78 %	NRP-metalóforo, NRPS	31	Peptido no ribosomal metalóforo, Péptido sintetasa no ribosómica
65.1	3 %	NRPS- sideróforo independiente	13	Sintetasas de sideróforos independientes de NRPS
71.1	17 %	T1PKS	3	Policétido sintasa
74.1	100 %	NRPS sideróforo independiente	9	Sintetasas de sideróforos independientes de NRPS
77.1	5 %	Terpeno	15	Pigmento
78.1	8 %	hgIE-KS	17	Policétido sintasa tipo heterocisto glicolípido sintasa
84.1	61 %	Terpeno	19	Pigmento
85.1	26 %	T1PKS	3	Policétido sintasa
89.1	24 %	T2PKS	26	Policétido sintasa
92.1	0 %	NRPS- sideróforo independiente	14	Sintetasas de sideróforos independientes de NRPS
109.1	10 %	Amgliciclo	13	Aminoglucósido
116.1	22 %	LAP, tiopéptido	14	Péptido
150.1	100 %	Terpeno	12	Pigmento

202.1	0 %	hgIE-KS	2	Policétido sintasa tipo heterocisto glicolípido sintasa
217.1	0 %	T1PKS	1	Policétido sintasa
239.1	18 %	T1PKS	2	Policétido sintasa
260.1	0 %	T1PKS	1	Policétido sintasa
264.1	0 %	T1PKS	1	Policétido sintasa