

EFFECTO INHIBITORIO DE *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas aeruginosa* SOBRE BACTERIAS MULTIRRESISTENTES

Sebastián Campo Sulvarán

Universidad El Bosque

Facultad de Ciencias

Bogotá, 2022

EFFECTO INHIBITORIO DE *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas aeruginosa* SOBRE BACTERIAS MULTIRRESISTENTES

Sebastián Campo Sulvarán

Director: Juan Pablo Hernández Sánchez

Codirector: Oskar Alejandro Palacios López

Universidad El Bosque

Facultad de Ciencias

Bogotá, 2022

Agradecimientos

En primer lugar, a mi familia por motivarme a siempre dar mi mejor esfuerzo.

A mis amigos: Nicolás Ardila, Juan Abella, Karen Fonseca, Andrés Saavedra, Juan Zambrano, y todos los que junto a mí sacaron adelante sus carreras.

A los docentes que sí tienen la vocación de enseñar y transmitir su pasión por la ciencia.

A mis directores Juan Pablo Hernández y Oskar Palacios por abrirme las puertas de sus espacios de trabajo, por su asesoramiento en este proyecto, y por sus consejos para la vida profesional.

A la doctora Alexandra Elbakyan, creadora de la plataforma Sci-Hub por facilitar la consulta de información para este trabajo y por poner el conocimiento científico al alcance de todos. Le agradezco, aunque no nos conozcamos.

A la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua por permitirme acceder a sus instalaciones, equipos y reactivos.

Al Programa de Biología de la Universidad El Bosque por tenerme entre sus filas, y darme muchas de las herramientas necesarias para la realización de este trabajo.

Dedicatoria

A la memoria de mi compañera y amiga Karen Lorena Fonseca Bolívar †

Nota de salvedad

“La Universidad El Bosque no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético de este en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”

Tabla de contenido

1.	<i>Introducción</i>	3
2.	<i>Marco de referencia</i>	5
2.1.	<i>Páramos</i>	5
2.2.	<i>Manglares</i>	6
2.3.	<i>Indicadores biológicos de la calidad del suelo</i>	7
2.4.	<i>Uso de antibióticos en actividades agropecuarias</i>	8
2.5.	<i>Contaminación del suelo por antibióticos</i>	9
2.7.	<i>Azospirillum brasilense</i>	10
2.8.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
3.	<i>Pregunta de Investigación</i>	13
4.	<i>Justificación</i>	13
5.	<i>Objetivos</i>	15
5.1.	<i>Objetivo general</i>	15
5.2.	<i>Objetivos específicos</i>	15
6.	<i>Materiales y métodos</i>	16
6.1.	<i>Área de estudio</i>	16
6.1.1.	<i>Área de estudio de páramos</i>	16
6.2.	<i>Toma de muestras</i>	17
6.2.1.	<i>Toma de muestras en páramo</i>	17

6.2.2.	<i>Obtención de cepas de manglares.....</i>	18
6.3.	<i>Aislamiento de bacterias de páramo.....</i>	19
6.4.	<i>Caracterización de bacterias de páramo y manglar.....</i>	19
6.4.1.	<i>Determinación de perfiles de resistencia.....</i>	20
6.4.1.1.	<i>Determinación de perfiles de resistencia en bacterias de páramo....</i>	20
6.4.1.2.	<i>Determinación de perfiles de resistencia en bacterias de manglar.....</i>	
6.5.	<i>Reactivación de Azospirillum brasilense.....</i>	23
6.6.	<i>Reactivación de Pseudomonas aeruginosa.....</i>	23
6.7.	<i>Extracción de exudados.....</i>	24
6.8.	<i>Evaluación de inhibición de A. brasilense y P. aeruginosa.....</i>	25
6.8.1.	<i>Inhibición en cultivo.....</i>	25
6.8.2.	<i>Inhibición de exudados.....</i>	25
7.	<i>Resultados y discusión.....</i>	26
7.1.	<i>Caracterización de bacterias de páramo y manglar.....</i>	27
7.1.1.	<i>Caracterización de bacterias de páramo y perfil de resistencia.....</i>	27
7.1.2.	<i>Caracterización de bacterias de manglar y perfil de resistencia.....</i>	30
7.3.	<i>Evaluación de inhibición directa de A. brasilense y P. aeruginosa.....</i>	33
7.4.	<i>Evaluación de inhibición de exudados de A. brasilense y P. aeruginosa.....</i>	35
8.	<i>Conclusiones.....</i>	39
9.	<i>Referencias bibliográficas.....</i>	40
10.	<i>Anexos.....</i>	53

Lista de tablas

<i>Tabla 1. Antibióticos y su concentración usada para el antibiograma de bacterias de páramo.....</i>	<i>21</i>
<i>Tabla 2. Descripción macroscópica y microscópica de las cepas multirresistentes de páramo</i>	<i>27</i>
<i>Tabla 3. Perfil de resistencia de las cepas de páramo.....</i>	<i>29</i>
<i>Tabla 4. Descripción macroscópica y microscópica de las cepas multirresistentes de manglar.....</i>	<i>30</i>
<i>Tabla 5. Perfil de resistencia de las cepas de manglar.....</i>	<i>32</i>

Lista de figuras

<i>Figura 1. Distribución geográfica de la vegetación de páramo en Sudamérica. El sombreado negro representa las áreas con altitud mayor a 3.000 m.s.n.m.....</i>	<i>5</i>
<i>Figura 2. Puntos de muestreo en el páramo de Ocetá en Monguí, Boyacá.....</i>	<i>16</i>
<i>Figura 3. Puntos de muestreo en manglares de Baja California Sur, México.....</i>	<i>17</i>
<i>Figura 4. Disposición de los transectos paralelos.....</i>	<i>18</i>
<i>Figura 5. Perfiles de resistencia en el antibiograma.....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 6. Rotulación de cajas para el antibiograma de bacterias de páramo.....</i>	<i>22</i>
<i>Figura 7. Montaje de los materiales para la extracción de exudados de A. brasilense y P. aeruginosa.....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 8. Montaje de ensayo de inhibición directa.....</i>	<i>25</i>

<i>Figura 9. Montaje de ensayo de inhibición de exudados.....</i>	<i>26</i>
<i>Figura 10. Morfología colonial (vista estereoscópica) de las cepas multirresistentes de páramo.....</i>	<i>28</i>
<i>Figura 11. Morfología microscópica (100x) de las cepas multirresistentes de páramo en Tinción Gram.....</i>	<i>29</i>
<i>Figura 12. Morfología colonial de las cepas multirresistentes de manglar.....</i>	<i>31</i>
<i>Figura 13. Morfología microscópica (40x) de las cepas multirresistentes de manglar en Tinción Gram.....</i>	<i>31</i>
<i>Figura 14. Curva de crecimiento de A. brasilense y P. aeruginosa.....</i>	<i>33</i>
<i>Figura 15. Inhibición directa de A. brasilense y P. aeruginosa.....</i>	<i>34</i>
<i>Figura 16. Inhibición de los exudados de A. brasilense y P. aeruginosa en concentración 1x.....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 17. Inhibición de los exudados de A. brasilense y P. aeruginosa en concentración 10x.....</i>	<i>36</i>

Lista de Anexos

<i>Anexo I. Preparación de medio BTB para Azospirillum brasilense y Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>60</i>
<i>Anexo II. Preparación de medio OAB para Azospirillum brasilense</i>	<i>61</i>
<i>Anexo III. Preparación de medio M9 para Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>62</i>

<i>Anexo IV. Antibiograma de las cepas obtenidas de la muestra de suelo conservado</i>	63
<i>Anexo V. Antibiograma de las cepas obtenidas de la muestra de suelo intervenido por ganadería.</i>	63
<i>Anexo VI. Pruebas bioquímicas de las cepas aisladas.</i>	64

Resumen

El aumento en la ocurrencia de bacterias multirresistentes en casos clínicos y en ambientes influenciados por actividades antrópicas ha generado la necesidad de producir nuevas alternativas para reemplazar o complementar a los antibióticos, y así controlar la propagación de estos fenotipos. Para este efecto, se ha propuesto el uso de especies bacterianas como *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas aeruginosa*, que han demostrado ser capaces de desplazar a otras bacterias por competencia y producir metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas, sin embargo, estos no han sido probados en bacterias ambientales con multirresistencia. Para poner a prueba este efecto inhibitorio, se aislaron 9 cepas multirresistentes provenientes de dos ambientes extremos, páramo (4) y manglar (5), y se realizaron dos ensayos de inhibición, el primero corresponde a un cultivo mixto en placa con *A. brasilense* y *P. aeruginosa* junto con la cepa a ensayar, y el segundo un ensayo de antibiograma con los exudados de la fase superior de los cultivos en líquido de *A. brasilense* y *P. aeruginosa*. Los resultados muestran que estas especies bacterianas no son capaces de inhibir el crecimiento de las cepas en ninguno de los dos ensayos, debido a que *A. brasilense* y *P. aeruginosa* no están produciendo compuestos antimicrobianos a una concentración suficiente para inhibir el crecimiento de las cepas multirresistentes. En el caso de *A. brasilense*, es posible que al no contar con un organismo vegetal hospedero, esta no esté produciendo metabolitos secundarios que inhiban el crecimiento de otras cepas. Por otro lado, la actividad antimicrobiana de los ramnolípidos de *P. aeruginosa* es dependiente de la concentración, por lo que se infiere que la cantidad que produce no es suficiente para inhibir las cepas ensayadas.

Palabras clave: *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas aeruginosa*, inhibición, multirresistencia

Abstract

The increase in the occurrence of multidrug resistant bacteria in clinical cases and in environments influenced by anthropic activities has generated the necessity of producing new alternatives to replace or complement the antibiotics, and so control the spread of these phenotypes. For this effect, the use of bacterial species as *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas aeruginosa* has been proposed. These species have shown to be capable to displace other bacteria by competition and also produce secondary metabolites with antimicrobial properties, however, these compounds have not been tested on environmental bacteria with multidrug resistance. To prove this inhibitory effect, 9 multidrug resistant strains from two extreme environments were isolated, paramo (4) and mangal ecosystem (5). With these 9 strains, two inhibition assays were made, the first one was a mixed plate culture with *A. brasilense* and *P. aeruginosa* against one of the isolated strains, and the second one, was an antibiogram with the exudates from the upper phase of the liquid cultures of *A. brasilense* and *P. aeruginosa*. The results show that these bacterial species are not capable to inhibit the growth of the strains in any of both assays, due to *A. brasilense* and *P. aeruginosa* are not producing antimicrobial compounds in a sufficient concentration to inhibit the growth of the multidrug resistant strains. In the case of *A. brasilense*, is possible that this species is not producing secondary metabolites with antimicrobial properties because of the lack of a host plant organism, whereas the antimicrobial activity of rhamnolipids from *P. aeruginosa* are concentration dependent, hence it is inferred that the produced quantity is not enough to inhibit the assayed strains.

Key words: *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas aeruginosa*, inhibition, multidrug resistance

1. Introducción

La prevalencia de infecciones adquiridas por bacterias multirresistentes ha estado aumentando continuamente en varios países del mundo desde 1980 (Talon, 1999), y aunque estas infecciones suelen adquirirse en hospitales, se ha demostrado que estos mecanismos de resistencia también están presentes en bacterias ambientales (Grenni et al., 2018; Liao et al., 2019). Pese a que los antibióticos tienen grandes beneficios sobre la salud de los humanos y animales domésticos, el vertimiento continuo de estos medicamentos al medio ambiente puede tener efectos adversos sobre otros organismos, especialmente las bacterias del suelo (Fatta-Kassinos et al., 2011; De la Torre et al., 2012; Larsson 2014; Cychón et al., 2019). Las altas concentraciones de antibióticos en el ambiente actúan como un factor de selección favoreciendo a la dominancia de bacterias con genes relacionados a la resistencia a antibióticos (Halling-Sørensen et al., 2009; Kyselková et al., 2013; Cychón et al., 2019), generando así las condiciones precisas para producir alteraciones genéticas que confieren la ventaja de producir mecanismos de resistencia a varios tipos de antibióticos. El problema que representa todo lo anterior, es que el aumento de cepas multirresistentes (el cual es causado por actividades humanas), además de generar efectos negativos sobre un ecosistema al alterar la composición bacteriana del suelo, puede acarrear a un problema de salud pública, ya que esta resistencia antimicrobiana puede ser adquirida por especies patógenas por transferencia horizontal (Sun et al., 2019; Zhu et al., 2019).

Como alternativa a la problemática, se ha propuesto el uso de compuestos con propiedades antimicrobianas producidos por otras especies bacterianas. Destacan los estudios que reportan una actividad inhibitoria de crecimiento bacteriano por parte de *Azospirillum brasilense* (Tortora et al., 2011; Cassan et al., 2021) a través de la producción de sideróforos, compuestos de bajo peso molecular que ayudan al transporte

de iones de hierro entre el medio y la célula, y que pueden tener un efecto antimicrobiano (Hider & Kong, 2010). *A. brasilense* también ha mostrado ser eficiente como agente de biocontrol de fitopatógenos a través del desplazamiento por competencia (Bashan & de Bashan, 2002; Russo et al., 2008). En el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, se ha reportado que mediante la producción de ramnolípidos, los cuales son biosurfactantes con la capacidad de alterar la tensión superficial de las membranas celulares (Sekhon Randwana & Rahman, 2014), puede generar actividad antimicrobiana (El-Sheshtawy & Doheim, 2014; Sekhon Randwana & Rahman, 2014). Sin embargo, no se han encontrado estudios que demuestren el efecto inhibitorio de estas especies en cepas bacterianas obtenidas de muestras ambientales y con un perfil de resistencia antimicrobiana. Con este trabajo, se busca determinar si *A. brasilense* y *P. aeruginosa* actúan como agentes inhibitorios de crecimiento de bacterias multirresistentes de dos ambientes extremos, ya sea por el mecanismo de desplazamiento por competencia, o por la producción de compuestos con propiedades inhibitorias de crecimiento bacteriano. Para responder a esta pregunta se plantean dos hipótesis: (1) *A. brasilense* y *P. aeruginosa* desplazan a las cepas multirresistentes por competencia y (2) Los exudados de *A. brasilense* y *P. aeruginosa* inhiben el crecimiento de las cepas multirresistentes. La presente investigación busca generar información que será útil para mejorar el conocimiento sobre los mecanismos de inhibición de crecimiento de bacterias resistentes a antibióticos, y sobre las alternativas que se proponen para controlar su propagación, además de complementar los futuros ejercicios de divulgación sobre el abuso de antibióticos y sus consecuencias en el ambiente y el sistema sanitario.

2. Marco de referencia

2.1. Páramos

Los páramos son ecosistemas de alta montaña ubicados en zonas tropicales de Asia, África, Oceanía, Centroamérica y Suramérica que se encuentran entre los 3.000 y los 4.000 m.s.n.m. Son ecosistemas fundamentales para los procesos naturales y socioeconómicos de los países donde se encuentran, por su capacidad de regular sistemas hídricos y por ser un reservorio único de biodiversidad. La superficie total de páramos en el mundo se restringe casi en su totalidad a la cordillera de los Andes (Fig. 1), que cuenta con más de 3 millones de hectáreas de páramo, siendo Colombia el país con mayor superficie de este ecosistema (1.443.400 ha) (Uribe & Franco, 2004).

Figura 1. Distribución geográfica de la vegetación de páramo en Sudamérica. El sombreado negro representa las áreas con altitud mayor a 3.000 m.s.n.m. Tomado de: Kapelle & Horn, 2016, modificado de Luteyn, 1999.



La importancia de estos ecosistemas radica en la conservación de la biodiversidad y el suministro de agua. En esta región se pueden diferenciar dos límites: el límite superior (superpáramo), más cercano a las nieves perpetuas y con muy poca vegetación; y el

inferior (subpáramo), que se considera como una zona de transición entre el bosque altoandino y la región paramuna (Uribe, 2002). Este último ha sido descrito como la zona de mayor diversidad y endemismo vegetal (Corpocaldas, 2000), pero también es la zona más vulnerable a las intervenciones humanas como la ganadería, que además de alterar las características físicas y químicas del suelo, también pueden afectar a los microorganismos presentes (Cycón et al., 2019).

2.2. *Manglares*

Los manglares son ecosistemas costeros comúnmente distribuidos en latitudes tropicales y subtropicales en condiciones salobres, con un rango de mareas entre 1 y 4 metros, suelos aluviales, climas cálidos y templados, y una alta disponibilidad de nutrientes (Feller et al., 2010). Debido a estas condiciones, los manglares se componen principalmente de árboles leñosos adaptados para ser fisiológicamente tolerantes a la alta salinidad de su ambiente (Kathiream & Bingham, 2001). Estos ecosistemas son de gran interés en el área de la conservación, no solo por su alta biodiversidad, sino también por los múltiples beneficios que brindan a la población humana (secuestro de carbono, protección contra oleajes fuertes, pesca, etc.) (Walters et al., 2008; Koch et al., 2009). Según Vásquez-Lule et al., (2019), México cuenta con 4 categorías de manglares según distintas variables climáticas:

1. Manglares áridos con entrada de aguas superficiales: Distribuidos principalmente en la costa norte del Pacífico y el Golfo de California, y que solo reciben el drenaje de aguas continentales en ciertas épocas del año. Además, se encuentran en regiones con bajas precipitaciones

2. Manglares húmedos con entrada de aguas superficiales de la Costa Pacífica:
Distribuidos únicamente en la costa pacífica y reciben aguas superficiales permanentemente
3. Manglares húmedos con entrada de aguas superficiales del Golfo de México:
Distribuidos únicamente en el Golfo de México y reciben la mayor parte del drenaje de aguas superficiales
4. Manglares húmedos con entrada de aguas subterráneas del Caribe y el Golfo de México: Su principal entrada de aguas continentales corresponden a acuíferos subterráneos

2.3. *Indicadores biológicos de la calidad del suelo*

Según Rabot y colaboradores, (2018) la estructura del suelo y los microorganismos presentes en él, son los principales indicadores de la calidad del suelo ya que de esta dependen todas las funciones de este componente en el ecosistema. Adicionalmente, la estructura del suelo define el hábitat de los organismos edáficos y regula su actividad, de igual manera estos organismos aportan en la formación del suelo (Feeney et al., 2006; Bottinelli et al., 2015). Dentro de los organismos asociados al suelo, los más influyentes en su forma y función son los microorganismos (principalmente hongos y bacterias).

Los microorganismos son el indicador más fiable de la salud del componente suelo, ya que son capaces de responder rápidamente a los cambios debido a que se adaptan con facilidad a las condiciones ambientales (Nielsen et al., 2002). Esta capacidad de adaptarse rápidamente a los cambios permite analizar las comunidades microbianas de los suelos a lo largo del tiempo y evaluar alteraciones en su estructura y función (Kennedy, 1995; Pankhurst et al., 1995).

Dentro del concepto de microorganismos como indicadores de la calidad del suelo hay ciertos parámetros que ayudan a monitorear la salud del componente suelo (Christensen 1992; Christensen, 2001). Algunos de estos parámetros establecidos por Nielsen et al., (2002) son:

1. Biodiversidad: Dentro de los cuales se tiene en cuenta la diversidad genética, funcional y estructural.
2. Ciclos biogeoquímicos: Tales como el ciclo del carbono (actividad enzimática, descomposición de materia orgánica, respiración del suelo, oxidación de metano, etc.) o el ciclo del nitrógeno (Nitrificación, Amonificación, Desnitrificación, Fijación por *Rhizobium* y cianobacterias).
3. Biomasa microbiana: Por métodos directos e indirectos para hongos, bacterias y protozoos
4. Actividad microbiana: Síntesis de ADN y proteínas bacterianas, crecimiento de la comunidad, fisiología, bacteriófagos
5. Especies clave: Refiriéndose a micorrizas y patógenos de humanos
6. Biodisponibilidad: Se miden mediante bacterias biosensoras, bacterias contenedoras de plásmidos, bacterias resistentes a antibióticos, y la incidencia y expresión de genes catabólicos.

2.4. Uso de antibióticos en actividades agropecuarias

Los antibióticos veterinarios son ampliamente usados en animales de granja para tratar y prevenir enfermedades infecciosas o bien para promover el crecimiento de los animales (Boxall et al., 2003). No es fácil obtener información del uso individual de medicamentos veterinarios, sin embargo, en algunos países se puede encontrar

información limitada. Por ejemplo, en Estados Unidos se estima que el uso de antibióticos en acuicultura oscila entre 92.500 y 196.400 Kg/año, pero no se tiene aún una cifra o estimación para todas las actividades pecuarias (Benbrook, 2002). Por otra parte, en la Unión Europea, el consumo de antibióticos de uso veterinario es de alrededor de 5.000 ton/año. Según el Banco Mundial (2017), el consumo anual de antibióticos de uso veterinario supera las 63.000 toneladas métricas, y se estima que para 2030 esta cifra ascenderá por encima de 100.000 toneladas métricas.

El consumo y desecho de antibióticos en animales de granja, continuará en aumento a medida que aumente la población, ya que esto supone una mayor demanda de alimento.

2.5. Contaminación del suelo por antibióticos

Después de que el medicamento es administrado, el organismo sólo es capaz de absorber entre el 10 y el 60%, por lo que la cantidad restante es excretada en forma de metabolitos o compuestos similares (Kumar et al., 2005; Li et al., 2013). El suelo se contamina cuando este se fertiliza con estiércol de animales que han consumido antibióticos, causando alteraciones en los microorganismos del suelo y actuando como un factor de selección para aquellas bacterias con genes de resistencia a antibióticos (GRAs) (Boxall et al., 2003; Xie et al., 2018).

2.6. Contaminación de los manglares por antibióticos

Se reconocen 9 atributos que se deberían tomar en cuenta como indicadores de conservación o restauración de un ecosistema, los cuales se pueden agrupar en 4 categorías (Clewett et al., 2004): (1) composición de especies, (2) función ecosistémica, (3) estabilidad ecosistémica y (4) contexto del paisaje (Shackelford et al., 2013). En esta última categoría se podría relacionar uno de los factores que más afectan a la comunidad

bacteriana de los manglares, es decir, los contaminantes emergentes (CEs) como los residuos de antibióticos y bacterias resistentes a antibióticos, los cuales están relacionados con factores antropogénicos como los vertimientos de desechos industriales, aguas residuales, medicamentos de uso humano y veterinario, y actividades agrícolas (Tran et al., 2018).

En el caso de los manglares, el efecto de estas actividades antropogénicas sobre el aumento en la ocurrencia de bacterias resistentes a antibióticos (BRAs) y genes de resistencia a antibióticos (GRAs) es contradictoria, puesto que se ha reportado que en áreas industrializadas en India cercanas a manglares, estas variables están relacionadas (Bhattacharyya et al., 2019), mientras que en otros estudios realizados en China, la ocurrencia de BRAs y GRAs procede del flujo natural de aguas continentales que contienen estos contaminantes de manera autóctona (Wu et al., 2008; Li et al., 2016; Zhao et al., 2019). De lo anterior se puede inferir que en los ambientes de manglar se presentan varios factores que podrían promover la presencia de especies bacterianas multirresistentes, no solo por los antibióticos presentes de forma natural en el ecosistema, sino también por el ingreso de contaminantes emergentes (ECs) en el mismo (Sepúlveda-Correa et al., 2021).

2.7. *Azospirillum brasilense*

El género *Azospirillum* es un bacilo corto Gram-negativo que fue aislado por primera vez en 1925 del suelo de Países Bajos (Beijernik, 1925). Sin embargo, no se empezó a usar en biotecnología hasta los años 70 como resultado de la búsqueda de una bacteria fijadora de N₂ asociada a la rizosfera de *Digitaria* y *Zea mays* en Brasil (Nosto et al., 1994). A partir de este trabajo, se siguió usando a *Azospirillum* como objeto de estudio en muchas publicaciones, tanto que se considera como el género de bacterias

promotoras de crecimiento vegetal más estudiado (LPSN, 2018). Se ha demostrado que la especie *A. brasilense* también promueve el crecimiento de microalgas (como *Chlorella vulgaris*) y aumenta su capacidad de remover iones de fósforo y amonio, por lo que podría aplicarse para el tratamiento de aguas residuales (Hernández et al., 2006).

Algunas especies del género *Azospirillum* también son efectivas para contrarrestar el crecimiento de fitopatógenos. Russo y colaboradores, (2008) reportaron que la presencia de *Azospirillum brasilense* Sp245 incrementó la producción de biomasa del sistema radicular de *Prunus cerasifera* en su etapa de enraizamiento y, además logró inhibir al 100% el crecimiento del hongo *Rhizoctonia* sp. También se ha reportado su actividad de biocontrol en cultivos de tomate contra la infección de *Pseudomonas syringae*, posiblemente mediante el desplazamiento por obtención de nutrientes (Bashan & de Bashan, 2002), contra el hongo *Colletotrichum acutatum* a través de la producción de sideróforos de diferentes cepas de *A. brasilense* (Tortora et al., 2011) y contra otros fitopatógenos a través del sistema de secreción tipo IV (Cassan et al., 2021). Sin embargo, en los estudios realizados previamente no se ha ensayado la actividad antimicrobiana de *A. brasilense* en cepas multirresistentes obtenidas de muestras ambientales.

2.8. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una especie Gramnegativa aerobia con motilidad unipolar (Ryan & Ray, 2004) que se conoce comúnmente como un patógeno oportunista que puede producir infecciones nosocomiales, también existe naturalmente en el medio ambiente y es usada en biotecnología como desintoxicante de contaminantes orgánicos e inorgánicos presentes en el suelo, principalmente de metales pesados (Cervantes et al., 2006; Bojórquez et al., 2016).

También ha demostrado ser un método muy eficiente para la limpieza de hidrocarburos como el petróleo y sus derivados, convirtiéndolos en dióxido de carbono y agua (Prakash & Irfam, 2011). Este potencial para la biorremediación por parte de *P. aeruginosa* está relacionado con la producción de biosurfactantes, metabolitos secundarios que ayudan a degradar compuestos contaminantes de manera que el microorganismo pueda metabolizarlos (He et al., 2017).

El grupo de mayor interés dentro de estos biosurfactantes es el de los ramnolipidos (compuestos glicolípidicos), que tienen la capacidad de reducir la tensión superficial del agua y emulsionar otros lípidos, por lo que podrían generar actividad antimicrobiana al interactuar con las membranas celulares (Sekhon Randwana & Rahman, 2014). De hecho, estos ramnolipidos ya han demostrado tener actividad antimicrobiana, tal como lo reporta El-Sheshtawy & Doheim (2014) generando halos de inhibición entre 18 y 25 mm en bacterias Gram negativas como *Sarcina lutea*, Gram positivas como *Micrococcus luteus* y *Bacillus pumilus*, y hongos como *Penicillium chrysogenum* y *Candida albicans*. En otro estudio también se reportó que el 45% de las cepas ensayadas mostraron inhibición por parte de los biosurfactantes producidos por *Trichoderma viride*, *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Cellulomonas flavigena* y *Rhodococcus erythropolis* (Mohammed, 1997).

Sin embargo, no se ha ensayado la efectividad del compuesto producido por *P. aeruginosa* en cepas multirresistentes obtenidas de muestras ambientales

3. Pregunta de Investigación

¿Qué tan efectivos son los mecanismos de inhibición de *A. brasilense* y *P. aeruginosa* sobre bacterias multirresistentes?

4. Justificación

Debido al incremento de la ocurrencia de bacterias multirresistentes, tanto en ambientes naturales como en casos clínicos, derivado del abuso de antibióticos en actividades antropogénicas, y la búsqueda de nuevas alternativas para contrarrestar esta problemática, resulta de especial interés conocer el efecto antimicrobiano que presentan algunas bacterias, ya sea a través del desplazamiento por competencia o bien por compuestos con propiedades alelopáticas producidos por estas, así como estudiar su uso potencial para evitar la propagación de bacterias multirresistentes.

Este trabajo surge de la necesidad de esclarecer la eficacia de dos mecanismos de actividad inhibitoria que no han sido previamente estudiados sobre bacterias multirresistentes, planteándose como propósito el demostrar el posible efecto inhibitorio de dos especies de amplio uso biotecnológico contra bacterias multirresistentes, a través de un análisis de actividad antagónica en cultivos mixtos, y comparando la eficacia de sus productos para inhibir el crecimiento de cepas multirresistentes aisladas de dos ambientes con condiciones extremas.

La presente investigación busca generar información que será útil para mejorar el conocimiento sobre posibles mecanismos de inhibición de crecimiento de bacterias resistentes a antibióticos, y sobre las alternativas que se proponen para controlar su propagación y minimizar el uso de productos químicos que generen contaminación secundaria. Dicha información también servirá para complementar los futuros ejercicios

de divulgación sobre el abuso de medicamentos antibióticos y la problemática que al día de hoy es evidente tanto en ambientes naturales como en el sistema sanitario.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Determinar el efecto inhibitorio de *A. brasilense* y *P. aeruginosa* en bacterias multirresistentes

5.2. Objetivos específicos

Analizar si *A. brasilense* y *P. aeruginosa* presentan actividad antagónica contra bacterias multirresistentes de dos ambientes diferentes

Comparar el efecto inhibitorio de los exudados de *A. brasilense* y *P. aeruginosa* en bacterias multirresistentes de dos ambientes extremos

6. Materiales y métodos

6.1. Área de estudio

6.1.1. Área de estudio de páramos

El área de estudio es el páramo de Ocetá, ubicado en el Municipio de Monguí, Departamento de Boyacá, Colombia, el cual presenta una temperatura promedio de 10°C y comprende una superficie aproximada de 57,71 km² (Roa-Angulo & Forero-Jimenez, 2021). La toma de muestras se realizó en dos puntos, uno de ellos corresponde a un área conservada dentro del Parque Natural Regional Siscunsi Ocetá a una altitud de 3750 m.s.n.m. El segundo punto de muestreo fue en un área intervenida por actividades humanas, usada para el pastoreo de ganado pertenecientes a predios aledaños al páramo, a una altitud de 3200 m.s.n.m.

Figura 2. Puntos de muestreo en el páramo de Ocetá en Monguí, Boyacá. Tomado de:

Google Earth Pro. a: Puntos de muestreo; b: Boyacá; c: Colombia



6.1.2. Área de estudio de manglares

Todos los sitios de muestreo se encuentran dentro del municipio de La Paz, estado de Baja California, México. Los sitios fueron seleccionados por sus características y las diferentes actividades antropogénicas por las que se ven influenciados, algunos de ellos presentan perturbaciones naturales y otros se caracterizan por una exposición prolongada.

Figura 3. Puntos de muestreo en manglares de Baja California Sur, México. Tomado de: Zapién-Chavarría, 2021. a: Puntos de muestreo; b: Baja California Sur; c: México



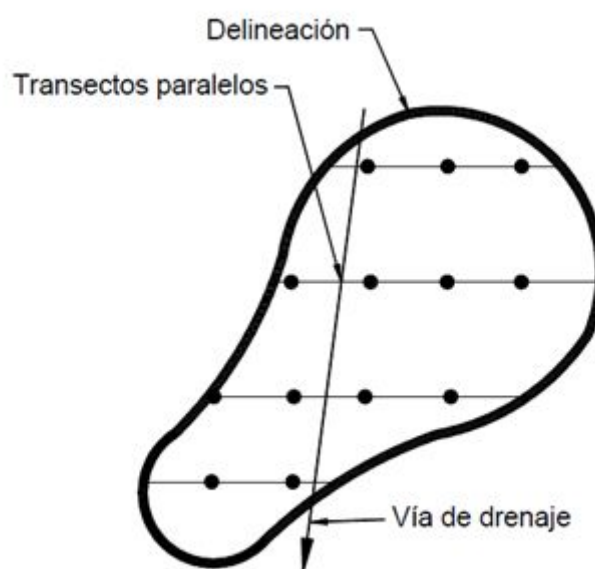
6.2. Toma de muestras

6.2.1. Toma de muestras en páramo

Se recolectaron dos muestras compuestas de 1 Kg en dos unidades de muestreo, la primera corresponde a un área con actividad agrícola y pecuaria y la segunda a un área forestal sin intervención humana. Se utilizó el método de transectos paralelos descrito por Carter y Gregorich (2007). Se realizaron 3 transectos de 60 m perpendiculares a la

pendiente del terreno y en cada transecto se tomaron 6 submuestras cada 10 m, para un total de 18 submuestras por unidad de muestreo, siguiendo las especificaciones de la Norma Técnica Colombiana (NTC) 3656/1994 modificada en el 2004 (Fig. 4). Para esto, se retiró la vegetación de la superficie y se introdujo el barreno a una profundidad de 5 cm, luego las submuestras se depositaron en un balde para obtener una muestra compuesta. Este procedimiento se realizó de la misma forma en las 2 unidades de muestreo. Una vez obtenidas las muestras compuestas, se empacaron en bolsas con cierre hermético debidamente rotuladas y se transportaron al laboratorio en refrigeración.

Figura 4. Disposición de los transectos paralelos. Tomado de: NTC 3656,1994.



6.2.2. Obtención de cepas de manglares

Se seleccionaron 5 cepas multirresistentes previamente aisladas en el Laboratorio de Microbiología III de la Facultad de Ciencias Químicas, de la Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua, México. Las cepas fueron aisladas y caracterizadas, para el trabajo de tesis de Zapién-Chavarría (2021), a partir de muestras tomadas de la rizosfera en 3 zonas de manglar en el municipio de La Paz, Baja California Sur, México (Cola de

Ballena, Bahía Magdalena y El Mogote). Estas cepas se aislaron en Agar Müller-Hinton para su posterior uso en ensayos de antibiograma y caracterización.

6.3. *Aislamiento de bacterias de páramo*

Se realizó un pre-enriquecimiento diluyendo 10 g de la muestra de suelo en 100 mL de solución salina estéril (0.85% NaCl), y se dejó en agitación a 125 rpm durante 24 h. Luego, se tomó un 1 mL de la solución y se sembró en 100 mL de caldo nutritivo suplementado con oxitetraciclina (30 µg/mL). El cultivo en líquido se incubó a 37°C durante 24 h y luego se realizó una siembra por extensión en placas de agar nutritivo. Para ello, se realizó una dilución seriada con NaCl (0.85%) de 10^{-8} a partir de 1 mL del cultivo en líquido y se tomaron 100 µL de los últimos 3 tubos (10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8}) para sembrar en las placas de agar nutritivo con ayuda de un asa triangular, extendiendo el líquido hasta secar. Las placas se incubaron a 37°C por 24 h y luego se clasificaron las bacterias por morfología colonial con ayuda de un estereoscopio. Cada morfoespecie fue separada en una placa de agar nutritivo.

6.4. *Caracterización de bacterias de páramo y manglar*

Se realizó la caracterización a las cepas seleccionadas para los ensayos de inhibición, es decir, las que mostraron un perfil de resistencia múltiple en los ensayos de antibiograma. Se registró la morfología colonial (forma, color, borde, superficie y elevación) y morfología microscópica en Tinción Gram. Todas las cepas utilizadas fueron sometidas a pruebas rápidas de identificación preliminar (catalasa y oxidasa), pruebas con lectura en menos de 6 horas (Indol) y con lectura de 18 a 48 horas (fermentación de carbohidratos, rojo de metilo, citrato y reducción de nitratos).

6.4.1. Determinación de perfiles de resistencia

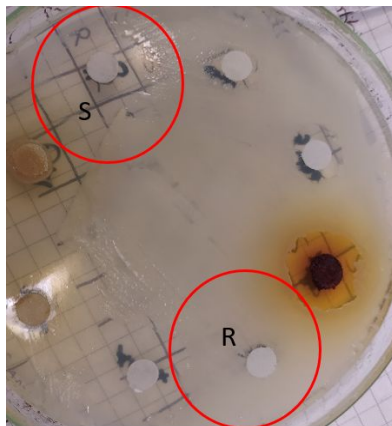
Según los criterios CLSI (*Clinical & Laboratory Standard Institute*), se considera que una bacteria es resistente cuando no presenta un halo de inhibición (Fig 5).

Para este trabajo se tomaron en cuenta dos perfiles:

Resistente (R): El cual no muestra ningún halo de inhibición, lo que indica que es resistente al antibiótico en su concentración clínica;

Sensible (S): Las bacterias que muestran un halo de inhibición y, por lo tanto, no pueden crecer en presencia del antibiótico evaluado.

Figura 5. Perfiles de resistencia en el antibiograma. S: Sensible; R: Resistente



De acuerdo con Magiorakos et al. (2012), se considera que una bacteria es multirresistente cuando genera un halo de inhibición en más de 3 grupos de antibióticos por lo que, para este estudio se tomará este criterio como término de referencia.

6.4.1.1. Determinación de perfiles de resistencia en bacterias de páramo

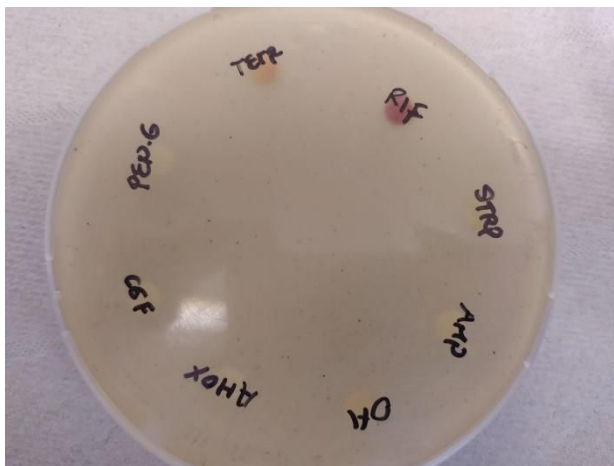
Las bacterias previamente aisladas se pusieron en tubos de ensayo con solución salina al 0.85% ajustando la turbidez según el Estandar de McFarland en escala 0.5. Se inoculó un volumen de 0.1 mL de las diluciones ajustadas en placas de Agar Nutritivo y en cada una de estas placas se situaron 8 sensidiscos impregnados con una solución de los antibióticos en las concentraciones que se muestran en la Tabla 1. (Fig. 3) y se incubaron a 37°C por 24 h. Pasado ese tiempo, se tomó el registro del perfil de resistencia de cada bacteria.

Tabla 1. Antibióticos y su concentración usada para el antibiograma de bacterias de páramo (Gotlieb & Shaw, 2013)

Antibiótico	Concentración
	final (µg/mL)
Ampicilina	50
Penicilina G	491.64
Amoxicilina	15
Estreptomicina	100
Tetraciclina	12
Oxitetraciclina	30
Cefalexina	4.81
Rifampicina	150

Se seleccionaron los antibióticos mostrados en la Tabla 1, al ser de los más usados en medicina veterinaria para el ganado vacuno.

Figura 6. Rotulación de cajas para el antibiograma de bacterias de páramo. TETR= Tetraciclina; PEN.G=Penicilina G; CEF= Cefalexina; AMOX= Amoxicilina; OXI= Oxitetraciclina; AMP=Ampicilina; STRP= Streptomicina; RIF= Rifampicina.



6.4.1.2. Antibiogramas de control

De las 9 cepas multirresistentes de páramo (4) y manglar (5) se preparó una solución bacteriana en tubos de ensayo con solución salina al 0.85% ajustando la turbidez según el Estándar de McFarland en escala 0.5. Estas soluciones se inocularon en placas de Agar Müller-Hinton utilizando hisopos estériles. Posteriormente se agregaron 5 sensidiscos con los siguientes antibióticos y concentraciones: ampicilina (10 µg/mL), tetraciclina (30 µg/mL), vancomicina (5 µg/mL), ciprofloxacina (10 µg/mL) y cefoxitina (10 µg/mL). Las placas se incubaron a 37°C por 24, y pasado ese tiempo se registró el diámetro de los halos de inhibición.

6.5. Reactivación de *Azospirillum brasilense*

Se agregaron 22.5 mL de pre-inóculo de *A. brasilense* en 600 mL de medio BTB-1 (Bashan et al., 2011, **ANEXO I**) y se dejó incubar a 37°C durante 24 horas en agitación (100 rpm). Pasado ese tiempo, se lavó el pellet centrifugando un volumen de 25 mL del cultivo a 4500 rpm durante 10 minutos y desechando sobrenadante. Posteriormente se agregaron 20 mL de solución salina (0.85%) para luego centrifugar a 4500 rpm por 10 minutos y desechar el sobrenadante. Este procedimiento se repitió 2 veces. Después de resuspender en solución salina (0.85%) y mezclar en el vórtex hasta deshacer el pellet, se tomaron 10 mL de esta solución y se agregaron a 90 mL de medio OAB (Okon et al., 1977; **ANEXO II**). Los cultivos se incubaron en agitación continua a 100 rpm a 37°C, y se realizaron mediciones de densidad óptica (OD) a 540 nm cada 6 horas hasta llegar a la fase estacionaria de crecimiento.

6.6. Reactivación de *Pseudomonas aeruginosa*

Se agregaron 5 asadas de un cultivo en placa de *P. aeruginosa* a 50 mL de medio BTB-1 (Bashan et al., 2011, **ANEXO I**) y se dejó incubar a 37°C durante 24 horas en agitación constante a 100 rpm. Pasado ese tiempo, se lavó el pellet centrifugando un volumen de 25 mL del cultivo a 4500 rpm durante 10 minutos y se desechó el sobrenadante. Posteriormente se agregaron 20 mL de solución salina (0.85%) para luego centrifugar a 4500 rpm por 10 minutos y desechar el sobrenadante. Este procedimiento se repitió 2 veces. finalizado el lavado se resuspendió en solución salina (0.85%) y mezclar en vórtex, se tomaron 10 mL de esta solución y se agregaron a 90 mL de medio M9 (Viramontes-Ramos et al., 2010, **ANEXO III**). Los cultivos se incubaron en agitación a 37°C, y se realizaron mediciones de densidad óptica (OD) a 540 nm cada 6 horas hasta llegar a la fase estacionaria de crecimiento (**ANEXO IV**).

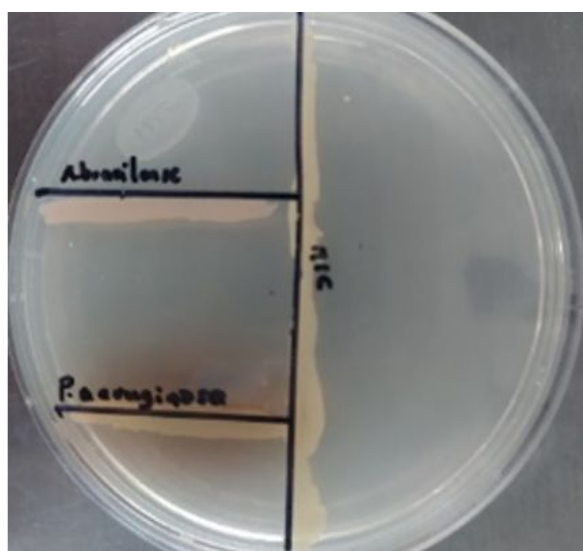
10X en el rotaevaporador. Para esto, se agregaron 100 mL del exudado 1X en el matraz del rotaevaporador, y se dejó reducir hasta un volumen de 10 mL.

6.8. Evaluación de inhibición de *A. brasilense* y *P. aeruginosa*

6.8.1. Inhibición en cultivo

Se realizó un cultivo mixto en cajas de Petri con Agar Mueller Hinton (38 g/L). En un lado de la caja, se sembró una de las cepas multirresistentes, y en el otro, dos siembras perpendiculares de *A. brasilense* y *P. aeruginosa*, procurando mantener una separación de 2 mm entre las dos siembras y la cepa problema (Fig. 8). Estos cultivos se incubaron a 37°C por 24. Pasado ese tiempo se registró el crecimiento, y si se mantenía la separación de 2 mm, se registraba como inhibición por parte de *A. brasilense* o *P. aeruginosa*.

Figura 8. Montaje de ensayo de inhibición directa

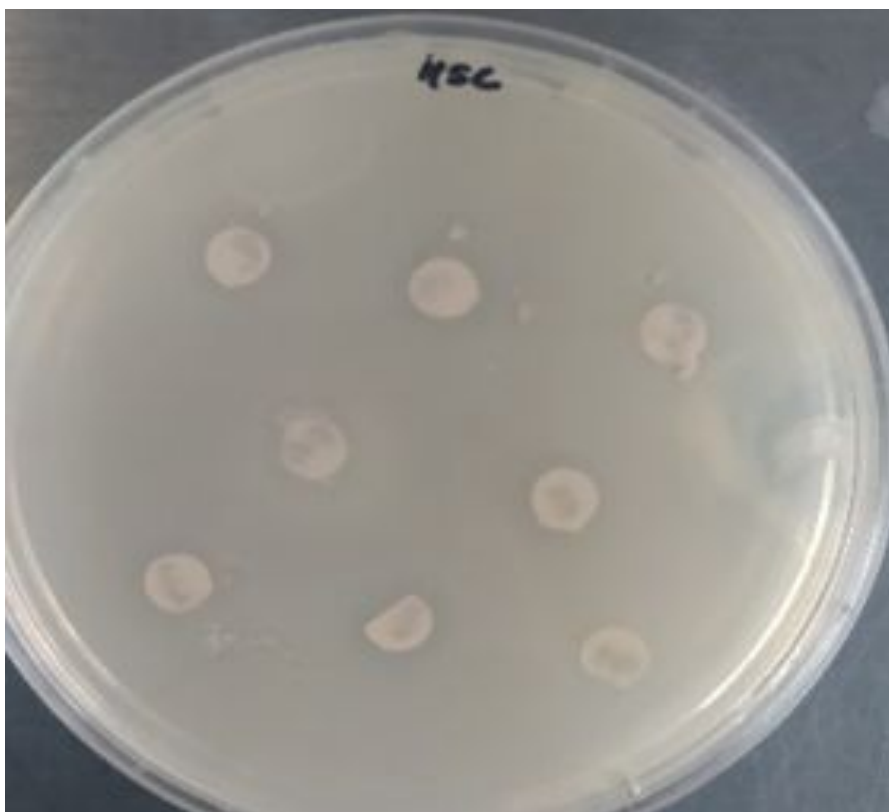


6.8.2. Inhibición de exudados

Se realizaron dos tratamientos de inhibición, el primero (t1) con los exudados en concentración 1X, y el segundo (t2) en 10X.

Los ensayos de inhibición se realizaron con la metodología Kirby-Bauer modificada para este trabajo. Con un asa redonda, se tomó una colonia de la cepa a analizar y se disolvió en un tubo de ensayo con solución salina (0.85%). Posteriormente se ajustó a la escala de MacFarland 0.5 para luego sembrar con un hisopo estéril en placas de Agar Mueller Hinton (38 g/L). Luego se aplicaron los sensidiscos impregnados con los exudados y se incubó a 37°C por 24 horas. Pasado ese tiempo, se registró el crecimiento de las colonias midiendo el diámetro de los halos de inhibición con una cinta métrica. También se usaron dos sensidiscos impregnados con medio OAB y medio M9 como control negativo.

Figura 9. Montaje de ensayo de inhibición de exudados



7. Resultados y discusión

Se aislaron 11 cepas a partir de las muestras de suelo de páramo, de las cuales 4 mostraron un perfil multirresistente, y se seleccionaron 5 cepas multirresistentes de

manglar. Lo anterior se corroboró en un ensayo de antibiograma con 5 antibióticos (Tabla 4 – Tabla 5). Los ensayos de inhibición de crecimiento a través de dos mecanismos diferentes mostraron que *A. brasilense* y *P. aeruginosa* no presentan actividad antimicrobiana en cepas multirresistentes (Figura 13 – Figura 14 – Figura 15).

7.1. Caracterización de bacterias de páramo y manglar

7.1.1. Caracterización de bacterias de páramo y perfil de resistencia

A partir de las muestras de suelo fue posible aislar 11 cepas bacterianas en medio nutritivo, de las cuales 6 pertenecen al sitio intervenido y 5 al conservado. Las pruebas de tinción Gram, indican que 7 de ellas son Gram positivas (2 en conservado y 5 en intervenido) y 4 son Gram negativas (3 en conservado y 1 en intervenido) (Tabla 2).

Tabla 2. Descripción macroscópica de las cepas multirresistentes de páramo

Cepa	Forma	Color	Borde	Superficie	Elevación	Gram
		Gris translúcido con				
M4I	Irregular	bordes blancos	Completo	Suave/Reluciente	Plano	+
M1C	Puntiforme	Blanco translúcido	Completo	Suave/Reluciente	Plano	-
M2C	Circular	Blanco opaco	Completo	Suave/Reluciente	Elevado	-
M5C	Irregular	Blanco translúcido	Completo	Suave/Reluciente	Plano	-

Los géneros Gramnegativos se encuentran con mayor frecuencia en el suelo de los páramos, siendo *Pseudomonas* sp. el más abundante en los aislamientos, seguido de *Acinetobacter* sp. (Hernández & Lizarazo, 2015). Los bacilos Gramnegativos también han mostrado ser el grupo más abundante en la rizósfera de *Espeletia* sp., debido a que la mayoría de las bacterias promotoras de crecimiento y descomponedoras de materia orgánica pertenecen al grupo de las Gramnegativas (Lizarazo & Gómez, 2015). Sin embargo, otro grupo que se encuentra en la misma proporción que los bacilos

Gramnegativos, es el de las bacterias productoras de endosporas, dentro del cual están algunas especies presentes en el suelo como *Clostridium tetani*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus* (Clark et al., 2009; Lizarazo & Gómez, 2015). En las muestras de suelo de páramo se aisló un mayor número de Grampositivas respecto a las Gramnegativas, pero estas últimas fueron las más frecuentes en el perfil de multirresistencia. Los bacilos Gramnegativos se presentan con mayor frecuencia en casos clínicos de infecciones multirresistentes, por lo cual, causan una mayor preocupación en términos de salud pública (Pop-Vicas & D'Agatha, 2005; Köck et al., 2021).

Figura 10. Morfología colonial (vista estereoscópica) de las cepas multirresistentes de páramo.

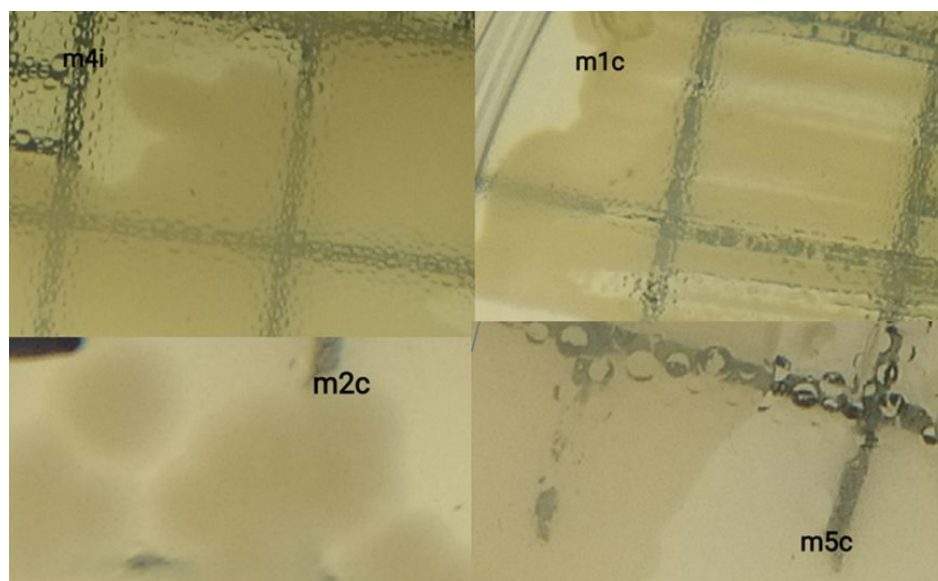


Figura 11. Morfología microscópica (100x) de las cepas multirresistentes de páramo en Tinción Gram.

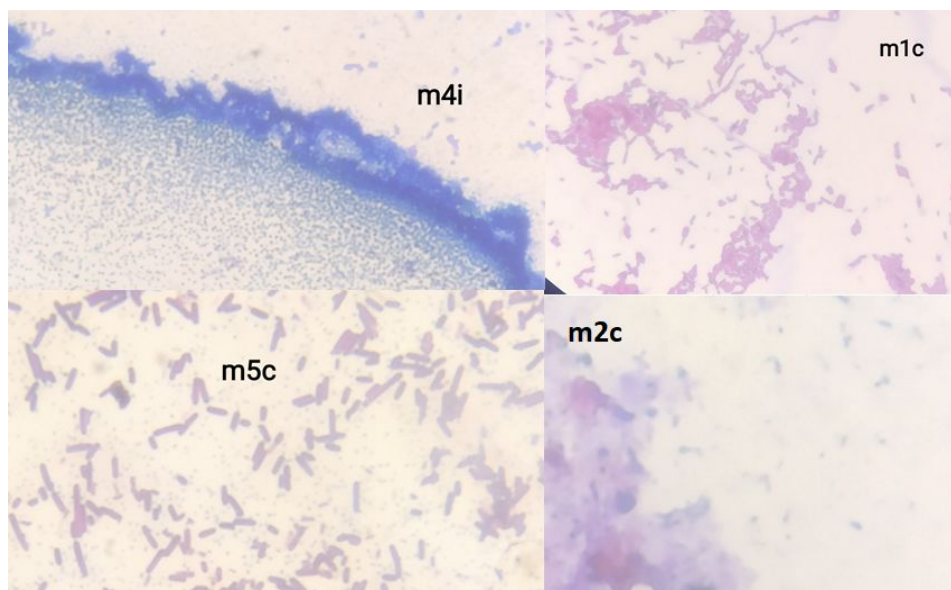


Tabla 3. Perfil de resistencia de las cepas de páramo. AM: Ampicilina; CFX: Cefoxitina; CIP: Ciprofloxacina; VA: Vancomicina; TET: Tetraciclina.

Cepa		Halo de inhibición (mm)				
Páramo	ID	AM	CFX	CIP	VA	TET
Intervenido	M4I	40	38	29	0	0
Conservado	M1C	0	0	34	0	30
Conservado	M2C	0	12	34	21	33
Conservado	M5C	0	0	28	0	20

De todas las cepas aisladas solo M4I, M1C, M2C y M5C presentaron multirresistencia en el primer ensayo (**ANEXO IV** y **ANEXO V**), por lo tanto, fueron las únicas cepas de páramo que se usaron en el ensayo de resistencia con *A. brasilense* y *P. aeruginosa*.

Este perfil se mantuvo en M1C y M5C al hacer un segundo ensayo contra otro grupo de antibióticos (Tabla 3). Sin embargo, otros trabajos que indican que las actividades antropogénicas como el uso de medicamentos veterinarios y antibióticos o la irrigación de cultivos con aguas residuales pueden causar un aumento en la frecuencia de GRAs y la transferencia horizontal de los mismos en la comunidad bacteriana del suelo (Boto et al., 2019). Pero estas cepas, aunque corresponden al suelo conservado del páramo, presentan el fenotipo multirresistente.

7.1.2. Caracterización de bacterias de manglar y perfil de resistencia

Tabla 4. Descripción macroscópica de las cepas multirresistentes de manglar

Cepa	Forma	Color	Borde	Superficie	Elevación	Gram
77	Irregular	Naranja	Completo	Suave/Reluciente	Plano	+
80	Puntiforme	Blanco opaco	Completo	Suave/Reluciente	Convexa	-
82	Puntiforme	Blanco translúcido	Completo	Suave/Reluciente	Convexa	+
				Suave/Reluciente con		+
47	Irregular	Gris opaco	Lobulado	biopelícula	Elevado	+
36	Irregular	Amarillo	Lobulado	Rugosa	Elevado	-

Figura 12. Morfología colonial de las cepas multirresistentes de manglar

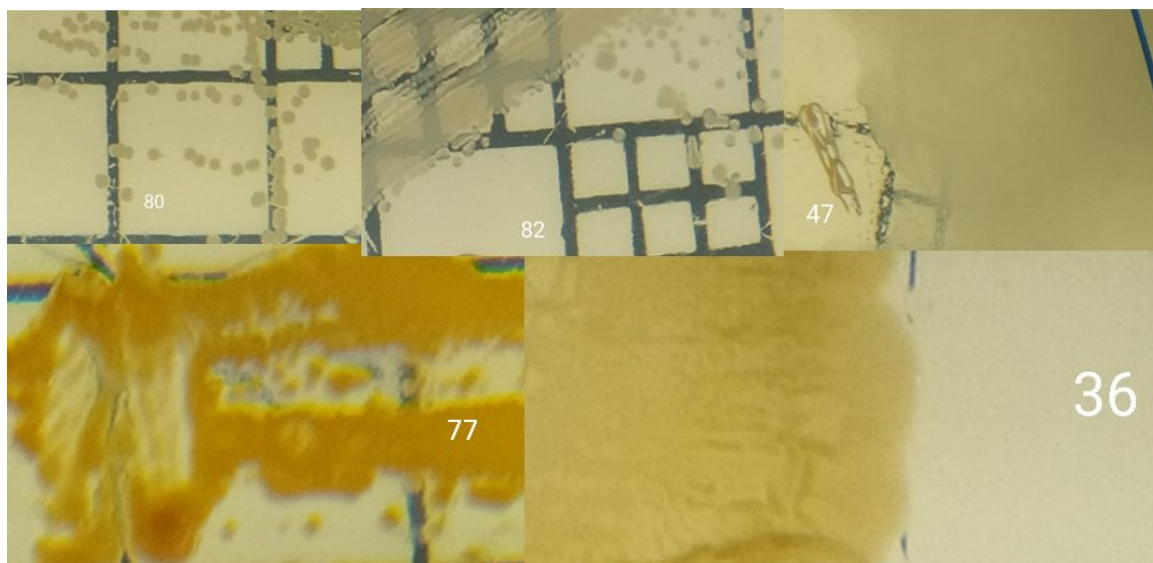


Figura 13. Morfología microscópica (40x) de las cepas multirresistentes de manglar en Tinción Gram

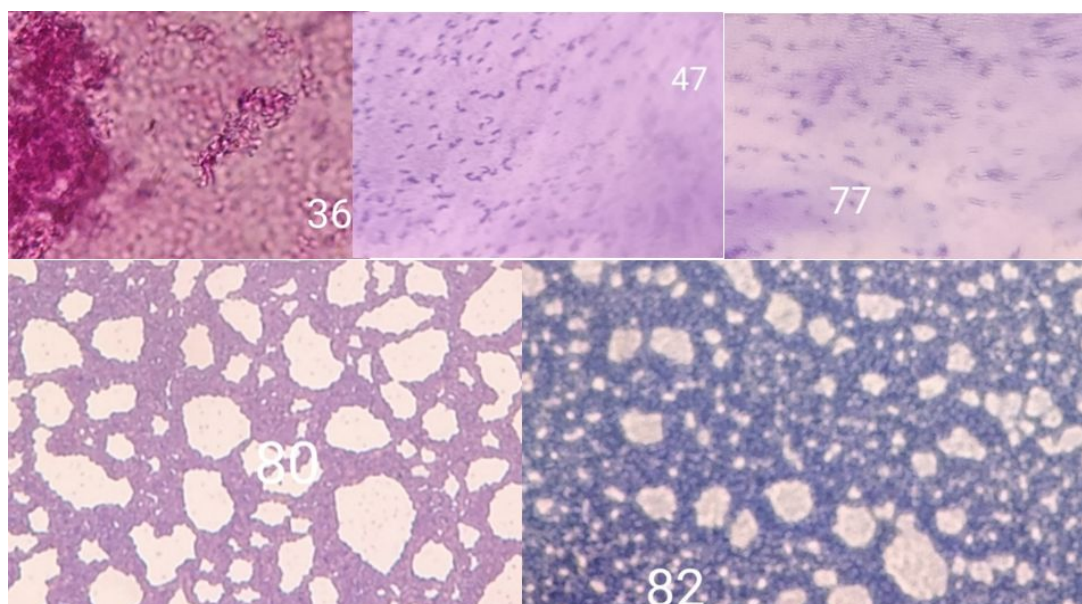


Tabla 5. Perfil de resistencia de las cepas de manglar. AM: Ampicilina; CFX: Cefoxitina; CIP: Ciprofloxacina; VA: Vancomicina; TET: Tetraciclina.

Halo de Inhibición (mm)					
Cepa	AM	CFX	CIP	VA	TET
82	22	44	37	20	36
80	24	37	36	19	36
47	0	50	37	11	19
77	21	18	45	54	33
36	0	0	50	41	35

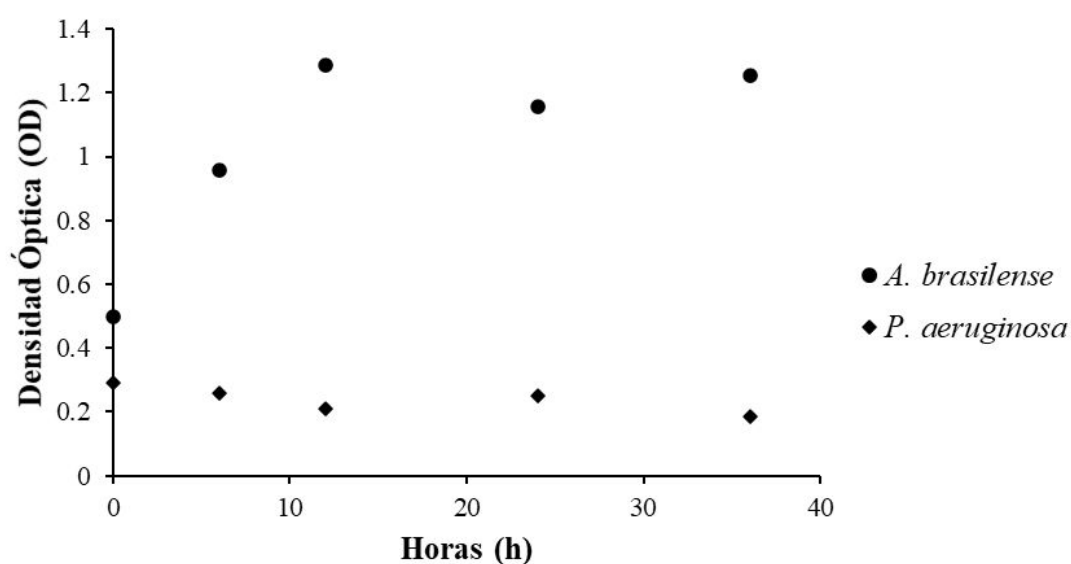
Al comparar el perfil de resistencia realizado en este trabajo con el ensayo realizado por Zapién-Chavarría (2021), se puede observar que las cepas aisladas de manglar perdieron su característica de multirresistencia. Esto se puede explicar con una disminución en la expresión fenotípica de algunas porinas relacionadas a la resistencia antimicrobiana (Jacoby, 2009), uno de los mecanismos que generan resistencia a beta-lactamasas (ampicilina), cefalosporinas (cefotixina). En el caso de enterobacterias, los mecanismos de resistencia generalmente están asociados a una acumulación de mutaciones en los genes de las topoisomerasas (*gyrA* y *parC*), que se concentran en una región codificante específica relacionada a la resistencia de quinolonas (ciprofloxacina) (Ruiz, 2003; Jacoby, 2009). Esta alteración de las porinas también se da por mutaciones en el gen *penB*, relacionado con la resistencia a tetraciclinas, y todos los mecanismos

mencionados anteriormente pueden reducir su expresión al dejar de estar en contacto con los compuestos a los que generan resistencia (Navarro et al., 2011).

7.2. Cultivo de *A. brasilense* y *P. aeruginosa*

Ambos cultivos se dejaron en incubación hasta el día 4, cuando su densidad óptica se mantuvo estable, es decir, en su fase estacionaria. Sin embargo, en *A. brasilense* se puede observar que las fases están bien diferenciadas, mientras que en *P. aeruginosa* no se puede observar una fase de crecimiento exponencial (Figura 12).

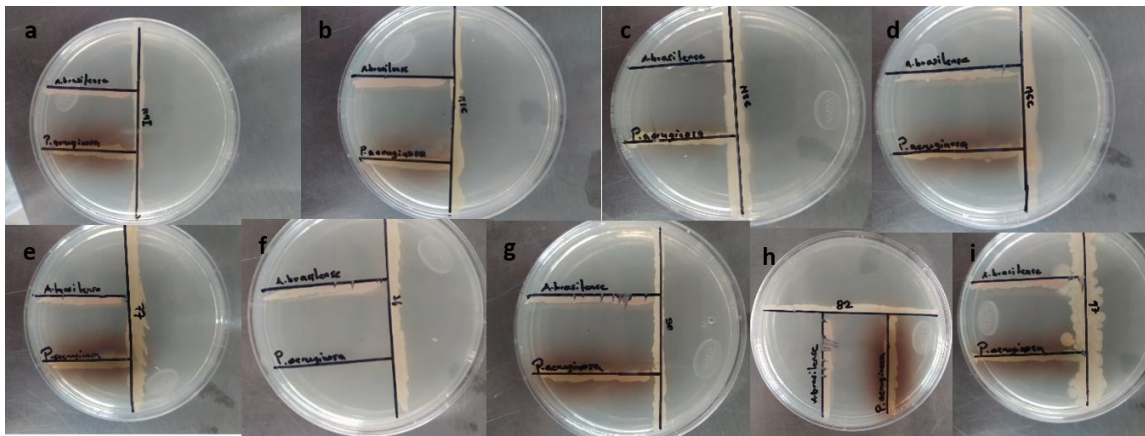
Figura 14. Curva de crecimiento de *A. brasilense* y *P. aeruginosa*



7.3. Evaluación de inhibición directa de *A. brasilense* y *P. aeruginosa*

Se observa que tanto *A. brasilense* como *P. aeruginosa* no presentaron actividad antagonista sobre el crecimiento de ninguna de las cepas multirresistentes (Fig. 13). En algunas cepas se puede observar crecimiento alrededor de las colonias de *A. brasilense* y *P. aeruginosa* (Fig. 15a, Fig. 15b, Fig. 15e, Fig. 15i).

Figura 15. Inhibición directa de *A. brasilense* y *P. aeruginosa*. a: M4I; b: M1C; c: M2C; d: M5C; e: 77; f: 36; g: 80; h: 82; i: 47.



A pesar de que se han reportado las propiedades de *A. brasilense* en el biocontrol sobre varios fitopatógenos en diferentes cultivos (Bashan & de Bashan, 2002; Russo et al., 2008; Tortora et al., 2011; Cassan et al., 2021), estas no se manifiestan al ensayar su efecto directo sobre las cepas multirresistentes de dos ambientes extremos. Existen varias estrategias de biocontrol de fitopatógenos, ya sea a través de la producción de sustancias inhibitorias, o por desplazamiento del patógeno por competencia, pero *Azospirillum* sp. se considera un género rizocompetente y no es capaz de producir cantidades significativas de sustancias antimicrobianas (Glick & Bashan, 1997). Esto se debe a que la función principal de estos compuestos no es la de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas, sino intervenir en el ciclo de vida de las plantas y mejorar la asimilación de nutrientes (Cohen & Brandurski, 1982; Hider & Kong, 2010), por lo que se puede deducir que en ausencia de una planta hospedera, *A. brasilense* no produciría estos compuestos. Otra posibilidad es que *A. brasilense* no esté produciendo sustancias inhibitorias debido a su tiempo de crecimiento en placa, puesto que en estudios donde se han intentado aislar los sideróforos producidos por *Azospirillum* sp., se ha observado que su máxima producción se da en la fase estacionaria, es decir, después de 28 horas de

crecimiento, aunque puede variar según la especie (Shah et al., 1992; Dufrène et al., 1996).

En cuanto a *P. aeruginosa*, el único mecanismo de inhibición de crecimiento bacteriano es la producción de biosurfactantes del grupo de los ramnolípidos. En el estudio de El-Sheshtawy & Doheim (2014) se reportan halos de inhibición entre 18 y 25 mm en dos cepas Grampositivas, una Gramnegativa y dos especies de hongos. Sin embargo, al comparar la actividad del biosurfactante en crudo con eritromicina, esta parece tener menor eficiencia. Bakkar et al., (2021) reportan que los ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* agrupados en nano-micelas superaron la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en Grampositivas como *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*, pero fue significativamente más baja en Gramnegativas como *Salmonella* (cepas Montevideo y Typhimurium). También evidenciaron que la CMI es dependiente del tamaño de las nano-micelas, ya que las de mayor tamaño presentaron una mayor CMI en todas las cepas ensayadas. De lo anterior, se puede inferir que *P. aeruginosa* está produciendo ramnolípidos al estar frente a otras cepas bacterianas, pero su concentración no es suficiente para inhibir su crecimiento. Se ha reportado la presencia de ramnolípidos en el sobrenadante de los cultivos de *P. aeruginosa* a 30°C después de 55 horas (Itoh et al., 1971), aunque en otros casos no se llegó a observar la presencia de ramnolípidos hasta el paso de 6 días de incubación (Hisatsuka et al., 1971).

7.4. Evaluación de inhibición de exudados de *A. brasilense* y *P. aeruginosa*

Se ensayaron dos concentraciones de los exudados (1x y 10x). Sin embargo, no presentaron inhibición sobre el crecimiento de ninguna de las cepas multirresistentes (Fig. 16 - Fig. 17).

Figura 16. Inhibición de los exudados de *A. brasilense* y *P. aeruginosa* en concentración 1x. a: M4I; b: M1C; c: M2C; d: M5C; e: 77; f: 36; g: 80; h: 82; i: 47.

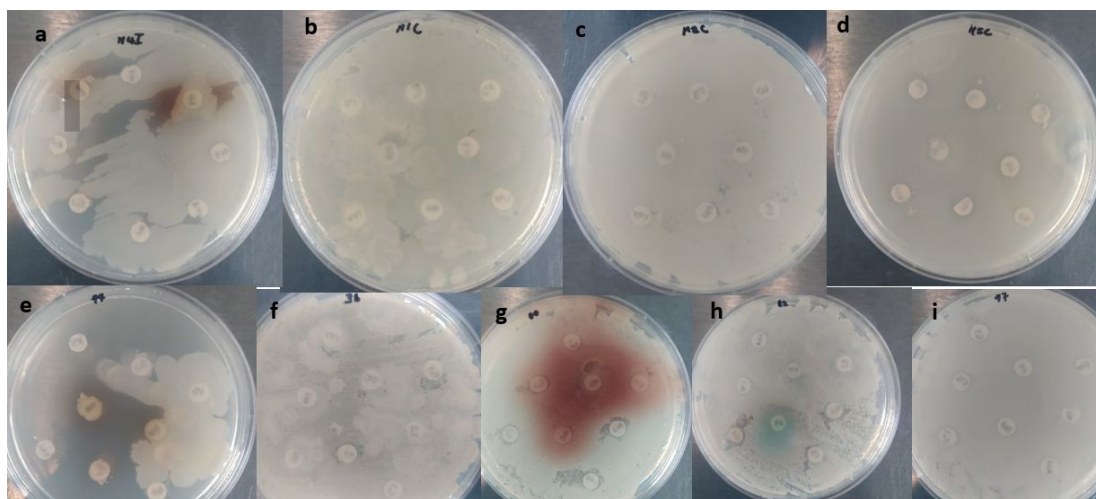
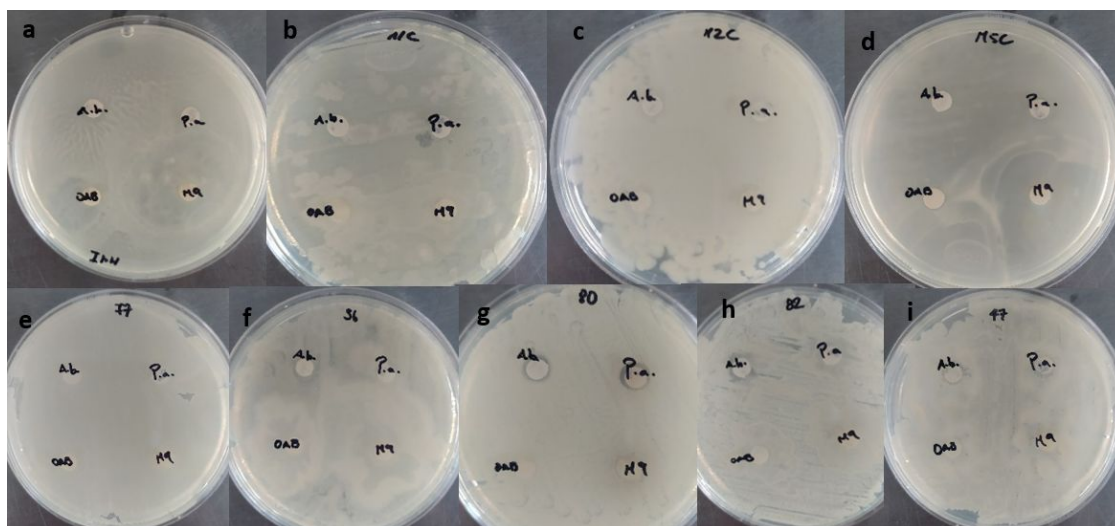


Figura 17. Inhibición de los exudados de *A. brasilense* y *P. aeruginosa* en concentración 10x. a: M4I; b: M1C; c: M2C; d: M5C; e: 77; f: 36; g: 80; h: 82; i: 47.



La actividad antimicrobiana de *A. brasilense* se ha reportado mayormente gracias a la producción de sideróforos, concretamente el *spirilobacin* (tipo catecol), el cual es secretado en medios con deficiencia de hierro (Bachhawat & Ghosh, 1987), así que una posible causa de la baja producción de sideróforos podría ser la concentración de hierro

en el medio OAB, en el que se agregaron 0.07 g/L de EDTA (FeIII) (ANEXO II). Sin embargo, también se ha reportado la producción de fitohormonas del grupo de las auxinas como mecanismos de inhibición bacteriana reportados para *Azospirillum spp.*, tales como el Ácido indol-3-acético o el Ácido fenilacético (Somers et al., 2005; Cassan et al., 2021), compuestos que no se producirían en ausencia de un organismo vegetal hospedero o fitopatógeno sobre el cual causar una actividad antagonista. En cuanto a los exudados de *P. aeruginosa*, se ha reportado que los ramnolípidos sí se producen en ausencia de otros microorganismos, pero la actividad inhibitoria de este compuesto es dependiente de la concentración del mismo. Lo anterior concuerda con el estudio de Buonocore et al., (2020) en el que se sometieron 17 cepas bacterianas a antibiograma con los ramnolípidos aislados en diferentes concentraciones, y se observó que la sensibilidad disminuye en función de la concentración de ramnolípidos en todas las cepas. Incluso se reportaron dos cepas (*Staphylococcus xylosus* y *Staphylococcus epidermidis*) que no presentaron halo de inhibición en ninguna de las concentraciones ensayadas, lo cual sugiere que este compuesto no es efectivo en todas las cepas bacterianas. También se observa este fenómeno en Sabarinathan et al., (2021) en bacterias productoras de biopelículas (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Aeromonas hydrophila*). En los estudios anteriores, estos ensayos se realizaron con aislamientos de los ramnolípidos producidos por *Pseudomonas sp.* en concentraciones muy altas, por lo que, en este trabajo la concentración de los exudados podría no ser suficiente para causar un efecto inhibitorio ni siquiera al incrementar esta concentración a 10x (Fig. 16 - 17).

Aunado a lo anterior, los mecanismos de resistencia de las cepas ensayadas podrían estar relacionados a la nula eficiencia de los exudados de *A. brasilense* y *P. aeruginosa* en sus dos concentraciones. En el caso de las Gramnegativas multirresistentes, se ha

observado que estas hacen uso de las 4 categorías de mecanismos de resistencia (I. Limitación del consumo de las sustancias en el medio, II. Modificación del sitio diana del medicamento, III. Inactivación del medicamento, IV. Bombas de salida), aunque las Grampositivas suelen hacer uso de solo 1 o 2 de estos mecanismos, siendo la limitación del consumo la más común (Chancey et al., 2012; Mahon et al., 2014). Sin embargo, en el caso de las cepas de manglar, todo parece indicar que sus mecanismos de resistencia se enfocan en antimicrobianos producidos por bacterias ambientales (Hibbing et al., 2010), lo cual es común en bacterias de la rizósfera de los mangles puesto que son ambientes con altos niveles de nutrientes y, por lo tanto, una mayor competencia (Sakhia et al., 2016). Estos mecanismos de resistencia podrían actuar sobre sustancias que alteran la tensión superficial de las membranas, como los ramnolípidos (Sekhon Randwana & Rahman, 2014), o sobre aquellos que interfieren en el transporte de iones, como los ramnolípidos (Ribeiro & Simões, 2019).

8. Conclusiones

Según los resultados obtenidos en este estudio y los análisis realizados, se puede concluir que, tanto *A. brasilense* como *P. aeruginosa*, no presentaron actividad inhibitoria de crecimiento en ninguno de los dos mecanismos ensayados. En general se podría decir que en el ensayo en cultivo no hubo inhibición por dos posibles causas: (1) que los metabolitos secundarios se produzcan en muy bajas concentraciones al no estar en fase estacionaria; (2) que los mecanismos de inhibición de *A. brasilense* y *P. aeruginosa* no sean capaces de contrarrestar los mecanismos de resistencia antimicrobiana y competencia de las cepas ensayadas. Pero en el caso de particular de *A. brasilense*, se podría agregar que esta no es capaz de producir metabolitos secundarios en ausencia de una planta hospedera y, por lo tanto, no podría desplazar a la otra bacteria por competencia ni inhibir su crecimiento a través de compuestos antimicrobianos. En cuanto al ensayo de inhibición de exudados, los resultados también se podrían explicar por el efecto de los mecanismos de competencia y resistencia antimicrobiana desarrollados por estas cepas. De manera que ambos ensayos denotan que, aunque se estén produciendo estos compuestos antimicrobianos, su concentración no es suficiente para inhibir el crecimiento de las cepas ensayadas.

9. Referencias bibliográficas

1. Bachhawat, A. K., & Ghosh, S. (1987). Iron transport in *Azospirillum brasilense*: role of the siderophore spirilobactin. *Microbiology*, 133(7), 1759-1765.
2. Bakkar, M. R., Faraag, A. H. I., Soliman, E. R., Fouda, M. S., Sarguós, A. M. M., McLean, G. R., ... & Abo-Zeid, Y. (2021). Rhamnolipids nano-micelles as a potential hand sanitizer. *Antibiotics*, 10(7), 751.
3. Bashan, Y., & De-Bashan, L. E. (2002). Protection of tomato seedlings against infection by *Pseudomonas syringae* pv. tomato by using the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Applied and environmental microbiology*, 68(6), 2637-2643.
4. Bashan, Y., Holguin, G., & Lifshitz, R. (1993). Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria. *Methods in plant molecular biology and biotechnology*, 331-345.
5. Bashan, Y., Trejo, A., & de-Bashan, L. E. (2011). Development of two culture media for mass cultivation of *Azospirillum* spp. and for production of inoculants to enhance plant growth. *Biology and Fertility of Soils*, 47(8), 963-969.
6. Beijerinck, M. W. (1925). Über ein Spirillum, welches frei en Stick-stoff binden kann?. *Zentralbl. Bakteriol.*, 63, 353-359.
7. Benbrook, C. M. (2002). Antibiotic drug use in US aquaculture. *Institute for Agriculture and Trade Policy Report*, 2.
8. Bhattacharyya, A., Haldar, A., Bhattacharyya, M., & Ghosh, A. (2019). Anthropogenic influence shapes the distribution of antibiotic resistant

- bacteria (ARB) in the sediment of Sundarban estuary in India. *Science of the Total Environment*, 647, 1626-1639.
9. Bojórquez, C., Frías Espericueta, M. G., & Voltolina, D. (2016). Removal of cadmium and lead by adapted strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter cloacae*. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 32(4), 407-412.
 10. Boto, L., Pineda, M., & Pineda, R. (2019). Potential impacts of horizontal gene transfer on human health and physiology and how anthropogenic activity can affect it. *The FEBS Journal*, 286(20), 3959-3967.
 11. Bottinelli, N., Jouquet, P., Capowiez, Y., Podwojewski, P., Grimaldi, M., & Peng, X. (2015). Why is the influence of soil macrofauna on soil structure only considered by soil ecologists? *Soil and Tillage Research*, 146, 118-124.
 12. Boxall, A. B., Kolpin, D. W., Halling-Sørensen, B., & Tolls, J. (2003). Peer reviewed: are veterinary medicines causing environmental risks? *Environmental science & technology*, 37(15), 286A-294A.
 13. Buonocore, C., Tedesco, P., Vitale, G. A., Palma Esposito, F., Giugliano, R., Monti, M. C., ... & de Pascale, D. (2020). Characterization of a new mixture of mono-rhamnolipids produced by *Pseudomonas gessardii* isolated from Edmonson Point (Antarctica). *Marine drugs*, 18(5), 269.
 14. Carter, M. R., & Gregorich, E. G. (2007). *Soil sampling and methods of analysis*. CRC press.
 15. Cassan, F. D., Coniglio, A., Amavizca, E., Maroniche, G., Cascales, E., Bashan, Y., & de-Bashan, L. E. (2021). The *Azospirillum brasilense*

- Type VI secretion system promotes cell aggregation, biocontrol protection against phytopathogens and attachment to the microalgae *Chlorella sorokiniana*. *Environmental Microbiology*, 23(10), 6257-6274.
16. Castaño, C. (2002). *Páramos y ecosistemas alto andinos de Colombia en condición hotspot & global climatic tensor*. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales.
 17. Cervantes, C., Espino-Saldaña, A. E., Acevedo-Aguilar, F., León-Rodríguez, I. L., Rivera-Cano, M. E., Avila-Rodríguez, M., ... & Moreno-Sánchez, R. (2006). Interacciones microbianas con metales pesados. *Revista latinoamericana de microbiología*, 48(2), 203-210.
 18. Chancey, S. T., Zähler, D., & Stephens, D. S. (2012). Acquired inducible antimicrobial resistance in Gram-positive bacteria. *Future microbiology*, 7(8), 959-978.
 19. Christensen, B. T. (1992). Physical fractionation of soil and organic matter in primary particle size and density separates. In *Advances in soil science* (pp. 1-90). Springer, New York, NY.
 20. Christensen, B. T. (2001). Physical fractionation of soil and structural and functional complexity in organic matter turnover. *European journal of soil science*, 52(3), 345-353.
 21. Clark, D. P., Martinko, J. M., Madigan, M. T., & Dunlap, P. V. (2009). *Biología De Los Microorganismos* 12 Ed-Brock.
 22. Clewell, A., Aronson, J., & Winterhalder, K. (2004). The SER international primer on ecological restoration.
 23. Cohen, J. D., & Bandurski, R. S. (1982). Chemistry and physiology of the bound auxins. *Annual Review of Plant Physiology*, 33(1), 403-430.

24. Corpocaldas. (2000) “Proyecto conservación y protección del Cóndor Andino en el Parque Nacional Natural Los Nevados”, Gestión Ambiental, no. 5.
25. Cycoń, M., Mrozik, A., & Piotrowska-Seget, Z. (2019). Antibiotics in the soil environment—degradation and their impact on microbial activity and diversity. *Frontiers in microbiology*, 10, 338.
26. De la Torre, A., Iglesias, I., Carballo, M., Ramírez, P., & Muñoz, M. J. (2012). An approach for mapping the vulnerability of European Union soils to antibiotic contamination. *Science of the Total Environment*, 414, 672-679.
27. De-Bashan, L. E., Moreno, M., Hernandez, J. P., & Bashan, Y. (2002). Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water research*, 36(12), 2941-2948.
28. Dufrêne, Y. F., Vermeiren, H., Vanderleyden, J., & Rouxhet, P. G. (1996). Direct evidence for the involvement of extracellular proteins in the adhesion of *Azospirillum brasilense*. *Microbiology*, 142(4), 855-865.
29. El-Sheshtawy, H. S., & Doheim, M. M. (2014). Selection of *Pseudomonas aeruginosa* for biosurfactant production and studies of its antimicrobial activity. *Egyptian journal of petroleum*, 23(1), 1-6.
30. Fatta-Kassinos, D., Meric, S., & Nikolaou, A. (2011). Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: current state of knowledge and future research. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 399(1), 251-275.

31. Feeney, D. S., Crawford, J. W., Daniell, T., Hallett, P. D., Nunan, N., Ritz, K., ... & Young, I. M. (2006). Three-dimensional microorganization of the soil–root–microbe system. *Microbial ecology*, 52(1), 151-158.
32. Feller, I. C., Lovelock, C. E., Berger, U., McKee, K. L., Joye, S. B., & Ball, M. C. (2010). Biocomplexity in mangrove ecosystems. *Annual review of marine science*, 2, 395-417.
33. Glick, B. R., & Bashan, Y. (1997). Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. *Biotechnology advances*, 15(2), 353-378.
34. Gottlieb, D., & Shaw, P. D. (2013). *Antibiotics: Volume I Mechanism of action*. Springer.
35. Grenni, P., Ancona, V., & Caracciolo, A. B. (2018). Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. *Microchemical Journal*, 136, 25-39.
36. Halling-Sørensen, B., Jacobsen, A. M., Jensen, J., SengeløV, G., Vaclavik, E., & Ingerslev, F. (2005). Dissipation and effects of chlortetracycline and tylosin in two agricultural soils: A field-scale study in southern Denmark. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 24(4), 802-810.
37. He, N., Wu, T., Jiang, J., Long, X., Shao, B., & Meng, Q. (2017). Toward high-efficiency production of biosurfactant rhamnolipids using sequential fed-batch fermentation based on a fill-and-draw strategy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 157, 317-324.

38. Hernández, D. R., & Lizarazo, L. M. (2015). Heterotrophic and oligotrophic bacteria in preserved and intervened areas of the paramo the Cortadera, Boyacá, Colombia. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 18(2), 475-483.
39. Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R., & Peterson, S. B. (2010). Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature reviews microbiology*, 8(1), 15-25.
40. Hider, R. C., & Kong, X. (2010). Chemistry and biology of siderophores. *Natural product reports*, 27(5), 637-657.
41. Hisatsuka, K. I., Nakahara, T., Sano, N., & Yamada, K. (1971). Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* and its function in hydrocarbon fermentation. *Agricultural and Biological Chemistry*, 35(5), 686-692.
42. Horinouchi, T., Maeda, T., Kotani, H., & Furusawa, C. (2020). Suppression of antibiotic resistance evolution by single-gene deletion. *Scientific reports*, 10(1), 1-9.
43. Horn, S. P., & Kappelle, M. (2009). Fire in the páramo ecosystems of Central and South America. In *Tropical fire ecology* (pp. 505-539). Springer, Berlin, Heidelberg.
44. Itoh, S., Honda, H., Tomita, F., & Suzuki, T. (1971). Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-paraffin (mixture of C12, C13 and C14 fractions). *The Journal of antibiotics*, 24(12), 855-859.
45. Jacoby, G. (2009). AmpC B-Lactamases Clin. *Microbiol Rev Jan*, 22, 161-182.

46. Kathiresan, K., & Bingham, B. L. (2001). Biology of mangroves and mangrove ecosystems.
47. Kennedy, A. C., & Papendick, R. I. (1995). Microbial characteristics of soil quality. *Journal of soil and water conservation*, 50(3), 243-248.
48. Koch, E. W., Barbier, E. B., Silliman, B. R., Reed, D. J., Perillo, G. M., Hacker, S. D., ... & Wolanski, E. (2009). Non-linearity in ecosystem services: temporal and spatial variability in coastal protection. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 7(1), 29-37.
49. Köck, R., Herr, C., Kreienbrock, L., Schwarz, S., Tenhagen, B. A., & Walther, B. (2021). Multiresistant Gram-Negative Pathogens: A Zoonotic Problem. *Deutsches Ärzteblatt International*, 118(35-36), 579.
50. Kumar, K., Gupta, S. C., Baidoo, S. K., Chander, Y., & Rosen, C. J. (2005). Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure. *Journal of environmental quality*, 34(6), 2082-2085.
51. Kyselková, M., Jirout, J., Chroňáková, A., Vrchotová, N., Bradley, R., Schmitt, H., & Elhottová, D. (2013). Cow excrements enhance the occurrence of tetracycline resistance genes in soil regardless of their oxytetracycline content. *Chemosphere*, 93(10), 2413-2418.
52. Larsson, D. J. (2014). Antibiotics in the environment. *Upsala journal of medical sciences*, 119(2), 108-112.
53. Li, Y. X., Zhang, X. L., Li, W., Lu, X. F., Liu, B., & Wang, J. (2013). The residues and environmental risks of multiple veterinary antibiotics in animal faeces. *Environmental monitoring and assessment*, 185(3), 2211-2220.

54. Li, Y., Li, Q., Zhou, K., Sun, X. L., Zhao, L. R., & Zhang, Y. B. (2016). Occurrence and distribution of the environmental pollutant antibiotics in Gaoqiao mangrove area, China. *Chemosphere*, 147, 25-35.
55. Liao, H., Friman, V. P., Geisen, S., Zhao, Q., Cui, P., Lu, X., ... & Zhou, S. (2019). Horizontal gene transfer and shifts in linked bacterial community composition are associated with maintenance of antibiotic resistance genes during food waste composting. *Science of the Total Environment*, 660, 841-850.
56. Lizarazo Medina, P. X., & Gómez Vásquez, D. L. (2015). Microbiota rizosférica de Espeletia spp. de los páramos de Santa Inés y de Frontino-Urrao en Antioquia, Colombia.
57. Luteyn, J.L. 1999. Páramos: a checklist of plant diversity, geographic distribution and botanical literature. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 84: 1– 278.
58. Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., ... & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection*, 18(3), 268-281.
59. Mahon, C. R., Lehman, D. C., & Manuselis, G. (2014). Antimicrobial agent mechanisms of action and resistance. *Textbook of Diagnostic Microbiology, St. Louis: Saunders*, 254-273.
60. Mohammed, A. A. (1997). Study on biosurfactants produced by hydrocarbon-utilizing microorganism (s) (Ph. D. thesis), Botany Dept. *Faculty of Girls, for arts, science and education, Ain shams University*.

61. Navarro, F., Calvo, J., Cantón, R., Fernández-Cuenca, F., & Mirelis, B. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enfermedades Infecciosas y microbiología clínica*, 29(7), 524-534.
62. Nielsen, M. N., Winding, A., Binnerup, S., & Hansen, B. M. (2002). Microorganisms as indicators of soil health.
63. Nosko, P., Bliss, L. C., & Cook, F. D. (1994). The association of free-living nitrogen-fixing bacteria with the roots of high arctic graminoids. *Arctic and Alpine Research*, 26(2), 180-186.
64. NTC 3656. (1994). Toma de muestras de suelo para determinar contaminación
65. Ojala, V., Laitalainen, J., & Jalasvuori, M. (2013). Fight evolution with evolution: plasmid-dependent phages with a wide host range prevent the spread of antibiotic resistance. *Evolutionary applications*, 6(6), 925-932.
66. Ojeda-Morales, M. E., Domínguez-Domínguez, M., Hernández-Rivera, M. A., & Zavala-Cruz, J. (2015). Biosurfactant production by strains of *Azospirillum* isolated from petroleum-contaminated sites. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226(12), 1-15.
67. Okon, Y., Albrecht, S. L., & Burris, R. H. (1977). Methods for growing *Spirillum lipoferum* and for counting it in pure culture and in association with plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 33(1), 85-88.
68. Pankhurst, C. E., Hawke, B. G., McDonald, H. J., Kirkby, C. A., Buckerfield, J. C., Michelsen, P., ... & Doube, B. M. (1995). Evaluation of soil biological properties as potential bioindicators of soil

- health. *Australian journal of experimental Agriculture*, 35(7), 1015-1028.
69. Parte, A. C. (2018). LPSN–List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio. net), 20 years on. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 68(6), 1825-1829.
70. Pop-Vicas, A. E., & D'Agata, E. M. (2005). The rising influx of multidrug-resistant gram-negative bacilli into a tertiary care hospital. *Clinical infectious diseases*, 40(12), 1792-1798.
71. Prakash, J. Awasthi, G., Chester, A., & Chaturvedi, R. (2015). Study on role of *Pseudomonas aeruginosa* on heavy metal bioremediation. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 3(4), 92-100.
72. Rabot, E., Wiesmeier, M., Schlüter, S., & Vogel, H. J. (2018). Soil structure as an indicator of soil functions: A review. *Geoderma*, 314, 122-137.
73. Ramsar, C. O. P. (2008). Estrategia regional de conservación y uso sostenible de los humedales altoandinos. *Quito, Ecuador: Gobiernos de Ecuador y Chile, CONDESAN, TNC-Chile*.
74. Ribeiro, M., & Simões, M. (2019). Advances in the antimicrobial and therapeutic potential of siderophores. *Environmental Chemistry Letters*, 17(4), 1485-1494.
75. Ruiz, J. (2003). Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(5), 1109-1117.

76. Russo, A., Vettori, L., Felici, C., Fiaschi, G., Morini, S., & Toffanin, A. (2008). Enhanced micropropagation response and biocontrol effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 on *Prunus cerasifera* L. clone Mr. S 2/5 plants. *Journal of Biotechnology*, 134(3-4), 312-319.
77. Ryan, K. J., & Ray, C. G. (2004). Medical microbiology. *McGraw Hill*, 4(370).
78. Sabarinathan, D., Vanaraj, S., Sathiskumar, S., Poorna Chandrika, S., Sivarasan, G., Arumugam, S. S., ... & Chen, Q. (2021). Characterization and application of rhamnolipid from *Pseudomonas plecoglossicida* BP03. *Letters in Applied Microbiology*, 72(3), 251-262.
79. Sakhia, N., Prajapati, S., Shetty, V., Bhatt, S., & Bhadalkar, A. (2016). Study of bacterial diversity of mangroves rhizosphere. *Open Journal of Marine Science*, 6(01), 23.
80. Sekhon Randhawa, K. K., & Rahman, P. K. (2014). Rhamnolipid biosurfactants—past, present, and future scenario of global market. *Frontiers in microbiology*, 5, 454.
81. Sepúlveda-Correa, A., Daza-Giraldo, L. V., Polanía, J., Arenas, N. E., Muñoz-García, A., Sandoval-Figueroa, A. V., & Vanegas, J. (2021). Genes associated with antibiotic tolerance and synthesis of antimicrobial compounds in a mangrove with contrasting salinities. *Marine Pollution Bulletin*, 171, 112740.
82. Shackelford, N., Hobbs, R. J., Burgar, J. M., Erickson, T. E., Fontaine, J. B., Laliberté, E., ... & Standish, R. J. (2013). Primed for change: developing ecological restoration for the 21st century. *Restoration Ecology*, 21(3), 297-304.

83. Shah, S., Karkhanis, V., & Desai, A. (1992). Isolation and characterization of siderophore, with antimicrobial activity, from *Azospirillum lipoferum* M. *Current Microbiology*, 25(6), 347-351.
84. Sun, D., Jeannot, K., Xiao, Y., & Knapp, C. W. (2019). Horizontal gene transfer mediated bacterial antibiotic resistance. *Frontiers in microbiology*, 10, 1933.
85. Talon, D. (1999). The role of the hospital environment in the epidemiology of multi-resistant bacteria. *Journal of Hospital Infection*, 43(1), 13-17.
86. Tortora, M. L., Díaz-Ricci, J. C., & Pedraza, R. O. (2011). *Azospirillum brasiliense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. *Archives of microbiology*, 193(4), 275-286.
87. Tran, N. H., Reinhard, M., & Gin, K. Y. H. (2018). Occurrence and fate of emerging contaminants in municipal wastewater treatment plants from different geographical regions-a review. *Water research*, 133, 182-207.
88. Uribe, C. C., & Franco, C. (2004). Rey, “. *Proyecto Atlas Mundial de los Páramos*”, Quito: Global Peatland Initiative/NCIUCN/EcoCiencia.
89. Vázquez-Lule, A., Colditz, R., Herrera-Silveira, J., Guevara, M., Rodríguez-Zúñiga, M. T., Cruz, I., ... & Vargas, R. (2019). Greenness trends and carbon stocks of mangroves across Mexico. *Environmental Research Letters*, 14(7), 075010.
90. Viramontes-Ramos, S., Portillo-Ruiz, M. C., Ballinas-Casarrubias, M. D. L., Torres-Muñoz, J. V., Rivera-Chavira, B. E., & Nevárez-Moorillón, G. V. (2010). Selection of biosurfactan/bioemulsifier-producing bacteria

- from hydrocarbon-contaminated soil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(3), 668-675.
91. Walters, B. B., Rönnbäck, P., Kovacs, J. M., Crona, B., Hussain, S. A., Badola, R., ... & Dahdouh-Guebas, F. (2008). Ethnobiology, socio-economics and management of mangrove forests: A review. *Aquatic Botany*, 89(2), 220-236.
 92. World Bank. (2017). *Drug-resistant infections: a threat to our economic future*. World Bank.
 93. Wu, Y., Chung, A., Tam, N. F. Y., Pi, N., & Wong, M. H. (2008). Constructed mangrove wetland as secondary treatment system for municipal wastewater. *Ecological Engineering*, 34(2), 137-146.
 94. Xie, W. Y., Shen, Q., & Zhao, F. J. (2018). Antibiotics and antibiotic resistance from animal manures to soil: a review. *European journal of soil science*, 69(1), 181-195.
 95. Zapién Chavarría, K. A. (2021). Aislamiento e identificación de cepas resistentes a antibióticos en manglares aridó-tropicales, Universidad Autónoma de Chihuahua
 96. Zhao, H., Yan, B., Mo, X., Li, P., Li, B., Li, Q., ... & Jiang, C. (2019). Prevalence and proliferation of antibiotic resistance genes in the subtropical mangrove wetland ecosystem of South China Sea. *MicrobiologyOpen*, 8(11), e871.
 97. Zhu, Y. G., Zhao, Y., Zhu, D., Gillings, M., Penuelas, J., Ok, Y. S., ... & Banwart, S. (2019). Soil biota, antimicrobial resistance and planetary health. *Environment International*, 131, 105059.

10. Anexos

Anexo I. Preparación de medio BTB para Azospirillum brasilense y Pseudomonas aeruginosa (Bashan et al., 2011)

Gramos por 1000	
Solución	mL
NaCl	1.2
MgSO ₄ H ₂ O	0.25
K ₂ HPO ₄	0.13
CaCl ₂	0.22
K ₂ SO ₄	0.17
NH ₄ Cl	1
Na ₂ SO ₄	2.4
NaHCO ₃	0.09
EDTA (FeIII)	0.07
Tryptona	5
Gluconato	5
Extracto de levadura	5

Se ajusta el pH a 7 después de esterilizar

Anexo II. Preparación de medio OAB para Azospirillum brasilense (Okon et al., 1977)

Gramos por 1000	
Solución	mL
KOH	4.8
Ácido málico	5
NaCl	1.2
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.25
K ₂ HPO ₄	0.13
CaCl ₂	0.22
K ₂ SO ₄	0.17
Na ₂ SO ₄	2.4
NaHCO ₃	0.5
Na ₂ CO ₃	0.09
EDTA (FeIII)	0.07

Anexo III. Preparación de medio M9 para Pseudomonas aeruginosa (Viramontes-Ramos et al., 2010)

Gramos por 1000	
Solución	mL
Na ₂ HPO ₄	6
KH ₂ PO ₄	3
NaCl	0.5
NH ₄ Cl	1

Se agregaron 2 mL de MgSO₄*7H₂O 1M y 0.1 mL de CaCl₂ 1M

Anexo IV. Antibiograma de las cepas obtenidas de la muestra de suelo conservado.

TETR= Tetraciclina; PEN.G=Penicilina G; CEF= Cefalexina; AMOX= Amoxicilina; OXI= Oxitetraciclina; AMP=Ampicilina; STRP= Estreptomicina; RIF= Rifampicina.

Cepa	AMP	PEN.G	STRP	TETR	CEF	RIF	AMOX	OXI
M1C	R	S	S	S	S	S	S	S
M2C	R	S	S	S	S	S	S	S
M3C	S	S	S	S	S	S	S	S
M4C	S	S	S	S	S	S	S	S
M5C	R	S	R	S	S	S	R	S

Anexo V. Antibiograma de las cepas obtenidas de la muestra de suelo intervenido por ganadería. TETR= Tetraciclina; PEN.G=Penicilina G; CEF= Cefalexina; AMOX= Amoxicilina; OXI= Oxitetraciclina; AMP= Ampicilina; STRP= Estreptomicina; RIF= Rifampicina.

Cepa	AMP	PEN.G	STRP	TETR	CEF	RIF	AMOX	OXI
M1I	S	S	S	S	S	S	S	S
M2I	S	S	S	S	S	S	S	S
M3I	S	S	S	S	S	S	S	S
M4I	R	R	R	S	S	S	S	S
M5I	S	S	S	S	S	S	S	S
M6I	S	R	S	S	S	S	S	S

Anexo VI. Pruebas bioquímicas de las cepas aisladas.

Cepas	Catalasa	Oxidasa	Citrato	Indol	Rojo Metilo	Fermentación de carbohidratos
M4I	-	-				
M1C	+	-	-	+	+	+
M2C	+	-	-	+	+	+
M5C	+	-	-	+	+	+
77	+	-	-	+	+	+
80	-	-	-	+	+	+
47	+	-				
36	-	-				

