

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos Autor.

CICESE@ 2022. Todos los derechos reservados

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California**



---

**Maestría en Ciencias  
en Ciencias de la Vida  
con orientación en Biotecnología Marina**

---

**Identificación de péptidos antimicrobianos producidos por  
*Bacillus* con capacidad de inhibir el crecimiento de aislados  
clínicos de *Staphylococcus aureus***

Tesis  
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta:

**Iván Alexander Santos Cabrera**

Ensenada, Baja California, México  
2022

Tesis defendida por  
**Iván Alexander Santos Cabrera**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dr. Jorge Olmos Soto**  
Director de tesis

Miembros del Comité  
**Dr. Aldo Ulloa Moreno**

**Dr. Israel Rocha Mendoza**



---

**Dra. Ana Denise Re Araujo**  
Grado académico y nombre completo Coordinadora del  
Posgrado en Ciencias de la Vida

---

**Dr. Pedro Negrete Regagnon**  
Director de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Iván Alexander Santos Cabrera** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina

**Identificación de péptidos antimicrobianos producidos por *Bacillus* con capacidad de inhibir el crecimiento de aislados clínicos de *Staphylococcus aureus***

Resumen aprobado por:

---

Dr. Jorge Olmos Soto  
**Director de tesis**

Algunas especies del género *Staphylococcus* están asociadas a infecciones oportunistas de relevancia clínica. Las infecciones producidas por algunas especies como *S. haemolyticus* y *S. aureus*, se asocian con pacientes que sufren de un sistema inmunitario comprometido o en tratamiento con medicamentos inmunosupresores. Sin embargo, el aumento de la presencia de *S. aureus* resistentes a antibióticos de última generación, ha sido un tema de interés de salud pública y de preocupación mundial. La investigación de los beneficios del uso de probióticos en las enfermedades bacterianas, se ha llevado a cabo de forma intensa en los últimos años como alternativa a los tratamientos farmacológicos actuales. Las publicaciones demuestran que la aplicación de probióticos a las enfermedades bacterianas reduce las infecciones producidas por patógenos microbianos. La identificación de nuevos antibióticos es necesaria para reducir la presencia de cepas resistentes. Algunas especies de *Bacillus* tienen la capacidad de producir compuestos con actividad antimicrobiana principalmente de naturaleza peptídica denominados péptidos antimicrobianos (AMPs). En el presente trabajo, se evaluaron diferentes cepas *Bacillus* contra dos aislados clínicos provenientes de pacientes mayores de 40 años con infección urinaria, identificados como *S. haemolyticus* y *S. aureus*. La cepa B2 mostró una actividad contra ambas especies patógenas y fue seleccionada para la identificación de AMPs. La producción de péptidos antimicrobianos durante el crecimiento de la cepa B2 fue determinada mediante una curva de crecimiento, encontrándose que el punto de producción máxima se lleva a cabo en el tiempo  $T_2$  de la fase estacionaria. Las fracciones de bajo peso molecular (menor a 3 KDa) obtenidas mediante ultrafiltración mostraron termo-estabilidad a 37°C, resistencia a enzimas fisiológicas (tripsina y proteinasa K) y no fueron afectadas por las sales del medio de cultivo. Los análisis de cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (RP-HPLC), corroboraron la presencia de péptidos en la fracción de bajo peso molecular. La obtención de péptidos de bajo peso molecular, con ausencia de modificaciones postraduccionales y termo-resistentes, propone una alternativa al uso de antibióticos, para tratar infecciones ocasionadas por especies resistentes del género *Staphylococcus*.

**Palabras clave:** *Staphylococcus*, Probióticos, Microbiota, Péptidos Antimicrobianos (AMPs) Aminoácidos (AA)

Abstract of the thesis presented by **Ivan Alexander Santos Cabrera** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Marine Biotechnology

**Identification of antimicrobial peptides produced by *Bacillus* with inhibitory activity on growth *Staphylococcus aureus* clinical isolates**

Abstract approved by:

---

Dr. Jorge Olmos Soto  
**Thesis Director**

Some species of the genus *Staphylococcus* are associated with opportunistic infections of clinical relevance. Infections caused by some species, such as *S. haemolyticus* and *S. aureus*, are associated with patients suffering from a compromised immune system or taking immunosuppressive drugs. However, the increase in the presence of *S. aureus* resistant to the latest generation antibiotics has been a topic of public health interest and global concern. Investigation of the benefits of the use of probiotics in bacterial diseases has been intensively carried out in recent years as an alternative to current pharmacological treatments. The publications show that the application of probiotics to bacterial diseases reduces infections caused by microbial pathogens. The identification of new antibiotics is necessary to reduce the presence of resistant strains. Some *Bacillus* species have the ability to produce compounds with antimicrobial activity, mainly peptidic, called antimicrobial peptides (AMPs). In the present work, different *Bacillus* strains were evaluated against two clinical isolates from patients older than 40 years with urinary tract infections, identified as *S. haemolyticus* and *S. aureus*. Strain B2 showed activity against both pathogenic species and was selected for AMP identification. The production of antimicrobial peptides during the growth of strain B2 was determined using a growth curve, finding that the point of maximum production occurs at time T2 of the stationary phase. Low molecular weight fractions (less than 3 kDa) obtained by ultrafiltration showed thermostability at 37°C, resistance to physiological enzymes (trypsin and proteinase K) and were not affected by salts in the culture medium. Reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) analyses confirmed the presence of peptides in the low molecular weight fraction. Obtaining low molecular weight peptides, with the absence of post-translational and heat-resistant modifications, proposes an alternative to the use of antibiotics to treat infections caused by resistant species of the genus *Staphylococcus*.

**Keywords: Staphylococcus, Probiotics, Microbiota, Antimicrobial Peptides (AMP), Amino Acids (AA)**

## Dedicatoria

A mis padres y mi hermano por su eterno apoyo, gracias. Este logro no hubiera sido posible sin su ayuda y motivación. Les dedico esta tesis, por alentar siempre mi curiosidad desde niño a los fenómenos naturales que ocurrían a mí alrededor, por llevarme libros de dinosaurios y animales, por llevarme al campo y explorar, y por esas tardes de sábado para ver películas de ciencia ficción. Les dedico este trabajo, porque es resultado del amor eterno y correspondido.

Tengo la fortuna de haber conocido a esa persona que le dio color a todo a mi alrededor y que estar con esa persona es como una sinfonía perfecta, que me ha acompañado en las buenas y en las malas, esta tesis te la dedico a ti, Ixel. Gracias, y aunque no ha sido fácil, aquí estamos. Recuerdo que las primeras pláticas que tuvimos fueron acerca de las cosas que nos gustaría hacer y siempre me alentaste, me apoyaste cuando las puertas se me cerraban. En mi peor momento, lejos de casa, estuviste. Estar a tu lado me hace el hombre más feliz del mundo. Y me emociona todo lo que viene ahora.

Con amor, esta tesis también va para ti. Iv. *Juntos contra todo.*

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico brindado a través de la beca.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) y el Posgrado de Ciencias de la Vida por permitirme ser parte del gran centro de investigación y desarrollar en las instalaciones este proyecto de investigación.

Al Dr. Jorge Olmos Soto, por su apoyo a lo largo de estos dos años. Gracias por su paciencia y motivación cuando creía que ya no podía. Gracias por confiar en que yo podía sacar adelante este trabajo.

A mi comité de tesis, conformado por el Dr. Aldo Moreno Ulloa y el Dr. Israel Rocha Mendoza, por haber aceptado ser parte de este proyecto y que con sus atinadas observaciones ayudaron a pulir este trabajo.

A la maestra Rosalía Contreras Flores quien siempre con la mejor disposición me enseñó al aprendizaje en técnicas de microbiología, también a los buenos consejos académicos y humanos.

Al maestro Víctor Eduardo Mercado Guajardo, quien fue mi compañero de laboratorio. Gracias por tus observaciones que me permitieron mejorar mi trabajo, mi análisis y desarrollo crítico.

A mi triada perfecta, David, Alejandra, Octavio, gracias por su amistad. Los llevo en mi corazón, gracias por todos los recuerdos durante este último año.

A Octavio, porque me enseñó más de lo que creí que una persona puede enseñarme de la vida. Gracias por tu amistad y por esa hermandad. Eres correspondido y para cualquier cosa, sabes dónde encontrarme.

A mis amigos de años, quienes siempre a pesar de la distancia estuvimos siempre en contacto. Gracias por su eterna amistad.

A María Ixel Hernández Hernández que durante estos años estuvo apoyándome y entregándome su amor y cariño. Gracias por todo este tiempo.

Esta etapa llegó a su fin.

Espero volverlos a ver.



## Tabla de contenido

	Página
Resumen español.....	ii
Resumen inglés.....	iii
Dedicatoria .....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas .....	xi
<b>Capítulo 1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Antecedentes .....	3
1.1.1 Género <i>Staphylococcus</i> .....	3
1.1.2 <i>Staphylococcus aureus</i> y su incidencia en la salud humana .....	4
1.1.3 Efectos de la infección de SA en la salud humana .....	6
1.1.4 Bacterias probióticas, una fuente de moléculas con actividad antibiótica.....	8
1.1.5 <i>Bacillus</i> y su capacidad para la producción de AMPs contra especies patógenas .....	13
1.1.6 Producción de AMPs durante el crecimiento de <i>Bacillus</i> .....	14
1.1.7 Ultrafiltración para AMPs.....	16
1.1.8 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para AMPs.....	17
1.2 Justificación .....	20
1.3 Hipótesis.....	20
1.4 Objetivos .....	21
1.4.1 Objetivo general.....	21
1.4.2 Objetivos específicos.....	21
<b>Capítulo 2. Metodología.....</b>	<b>22</b>
2.1 Selección y cultivos de especies de <i>Staphylococcus</i> . .....	22

2.2	Selección de cepas de <i>Bacillus</i> .....	22
2.2.1	Obtención de sobrenadante. ....	22
2.3	Curva de crecimiento y determinación de producción máxima de AMPs.....	23
2.4	Prueba de inhibición y producción de AMPs .....	24
2.5	Prueba de efectos de sales en medio de cultivo para la producción de AMPs .....	24
2.6	Prueba de efectos de oxigenación en cultivo para la producción de AMPs .....	25
2.7	Obtención de fracciones de sobrenadante .....	25
2.8	Cuantificación de proteínas de fracciones de sobrenadante.....	26
2.9	Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizante.....	26
2.10	Tinción de proteínas con nitrato de plata AgNO <sub>3</sub> .....	27
2.11	Ensayos de digestión por proteasas.....	28
2.12	Cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC).....	28
2.13	Correlación inhibición-concentración .....	29
2.14	Estadística.....	29
<b>Capítulo 3. Resultados .....</b>		<b>30</b>
3.1	Obtención de cepa de <i>Bacillus</i> con actividad inhibitoria contra especies patógenas del género <i>Staphylococcus</i> .....	30
3.2	Evaluación de las fracciones de sobrenadante contra <i>S. aureus</i> .....	31
3.3	Efecto de la oxigenación en el medio de cultivo.....	32
3.4	Cuantificación de proteínas de las fracciones de sobrenadante .....	33
3.5	Evaluación de sales en medio de cultivo.....	33
3.6	Digestión de fracciones por proteasas.....	35
3.7	Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). ....	36
3.8	Curva de crecimiento de cepa <i>Bacillus</i> B2 y determinación de producción máxima de AMPs.....	38
3.9	HPLC Fase inversa (RP-HPLC).....	38
3.10	Correlación concentración-inhibición .....	41

<b>Capítulo 4. Discusión.....</b>	<b>42</b>
<b>Capítulo 5. Conclusiones .....</b>	<b>48</b>
<b>Literatura citada .....</b>	<b>49</b>

## Lista de figuras

Figura	Página
1. Infecciones provocadas por <i>S. aureus</i> .....	6
2. Afectaciones en la salud humana producidas por infecciones de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	7
3. Estructura química de la Nisina .....	10
4. Clasificación de los péptidos antimicrobianos (AMPs) producidos por bacterias.....	12
5. Actividad de los AMPs de <i>Bacillus</i> sp. en la respuesta contra patógenos.....	13
6. Etapas de crecimiento bacteriano. ....	15
7. Elementos principales de Cromatografía Líquida de Alto Resolución fase reversa (RP-HPLC)..	18
8. Mecanismo de ingreso de péptido a columna en fase móvil. ....	19
9. Actividad de sobrenadante de cepas de <i>Bacillus</i> B2, B3, B4 y N24 contra <i>S. haemolyticus</i> (A) y <i>S. aureus</i> (B).....	30
10. Actividad de fracciones 30, 10, 3 y >3 KDa de <i>Bacillus</i> B2 contra <i>S. haemolyticus</i> (A) y <i>S. aureus</i> (B). ....	31
11. Efecto de la oxigenación en el medio de producción del cultivo de la cepa B2 de <i>Bacillus</i> .....	32
12. Concentración de proteínas en fracciones 50, 30, 10, 3 y >3 KDa de sobrenadante cepa B2.	34
13. Efecto de sales en medio de crecimiento bacteriano en la producción de AMPs. ....	34
14. Efecto de proteasas tripsina y proteinasa K en fracciones de 10-3 KDa y >3 KDa contra <i>S. haemolyticus</i> y <i>S. aureus</i> . ....	35
15. Gel de poliacrilamida 15 % (SDS-PAGE) fracciones del sobrenadante cepa B2.. ....	36
16. A) Curva de crecimiento y tiempo de muestreo (marcas rojas) de <i>Bacillus</i> B2.....	37
17. Cromatograma de fracción >3 KDa de <i>Bacillus</i> B2.....	39
18. Análisis comparativo de efectos de oxígeno y tiempos de muestreo en la producción de AMPs de la fracción >3 KDa.....	40
19. Relación concentración de péptidos con halos de inhibición. ....	41

## Lista de tablas

Tabla	Página
1. Nomenclatura de fracciones obtenidas.....	26
2 Reactivos utilizados para el diseño de geles de acrilamida .....	27

## Capítulo 1. Introducción

---

El descubrimiento de la penicilina en el siglo XX, fue una alternativa que permitió el tratamiento de infecciones bacterianas, mejorando significativamente la recuperación y reduciendo la mortalidad de los pacientes (Zaffiri et al., 2012). Sin embargo, el surgimiento de especies bacterianas resistentes a la penicilina fue aumentando durante las primeras décadas de su descubrimiento. Las investigaciones durante la segunda mitad del siglo XX permitieron el desarrollo de nuevas moléculas con actividad antibiótica, pero eventos de selección natural evidenciaron la capacidad adaptativa de algunas especies bacterianas frente a estos antibióticos (Gould, 2016; Mohr, 2016).

El aumento en la incidencia de organismos resistentes a tratamientos con antibióticos, ha sido de gran importancia para la salud pública a nivel mundial (Whaley et al., 2017). La presencia de bacterias, protozoarios y hongos resistentes a antibióticos de última generación, es causada por acciones como la automedicación con antibióticos y mal seguimiento de tratamientos que se reflejan en la selección de cepas resistentes (Bongomin et al., 2017; Whaley et al., 2017).

Algunos géneros bacterianos como *Helicobacter*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella* y *Staphylococcus*, cuentan con mecanismos moleculares de resistencia basados en enzimas que degradan a los antibióticos y la capacidad para modificar la pared celular o proteínas celulares (Lobanovska y Pilla, 2017). El origen de esta capacidad es discutido actualmente; algunas características de resistencia tienen su origen en el material cromosómico de las especies y otras son adquiridas a través de materia genética extracromosómica como plásmidos (Turner et al., 2019).

*Staphylococcus* es un género bacteriano Gram positivo, de morfología esférica en una conformación agregada, similar a un racimo de uvas (Paharik y Horswill, 2016). Están presentes en tejidos humanos y animales de forma natural, principalmente en la piel y las mucosas (Dreno et al., 2017). Son anaerobios facultativos y no formadores de esporas e inmóviles. Se conocen alrededor de 50 especies que integran el género *Staphylococcus*, de las cuáles *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. aureus* son de relevancia clínica para el ser humano, por su capacidad para desarrollar infecciones oportunistas en diversos tejidos (Dreno et al., 2017; Paharik y Horswill, 2016). En casos más severos *S. aureus* puede causar meningitis, neumonía, infecciones de tracto urinario o provocar síndrome de shock tóxico con una alta tasa de mortalidad (Turner et al., 2019).

Durante los años 60s se detectaron cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA por sus siglas en inglés, *methicillin-resistant S. aureus*) cuya estructura química es similar a la penicilina (Harkins et al., 2017). Fue entonces que se mostraron las primeras evidencias de adaptación de las bacterias ante antibióticos. Actualmente, la *meticilina* no está designada como tratamiento de primera línea, debido a la presencia en la población mundial de MRSA (Davis et al., 2015). La relevancia de esta especie es su gran capacidad de adaptación a antibióticos, basados en *cluster* de genes de resistencia, además de mecanismos moleculares que aún no se han podido describir con exactitud (Tong et al., 2015). Se han detectado cepas resistentes a vancomicina (VRSA por si siglas en inglés, *vancomycin-resistance S. aureus*), antibiótico que funciona como última línea de defensa en presencia de cepas MRSA (McGuinness et al., 2017).

La búsqueda de moléculas con actividad antibiótica es de relevancia mundial. Una mayor gama de medicamentos contra especies bacterianas de importancia clínica para el ser humano, podrían reducir la probabilidad en la presencia de cepas resistentes o aumentar el tiempo en el que estos se adapten a tratamientos con antibióticos (Singh et al., 2017).

En años recientes se han investigado los beneficios de las bacterias probióticas contra organismos patógenos, incluyendo bacterias, protozoarios y hongos (Hill et al., 2014). Las bacterias probióticas son organismos que no presentan un riesgo para la salud humana y, al contrario, han demostrado efectos positivos sobre el mejoramiento de la absorción de nutrientes de la dieta, estimulación del sistema inmunitario y actividad antibiótica contra patógenos (Hill et al., 2014; Rubio et al., 2017).

*Bacillus* es un género bacteriano Gram positiva, distribuido en todo el mundo, y su nombre se debe a su morfología tipo bastón. Recientemente se ha demostrado que algunas especies del género *Bacillus* tienen beneficios para la salud humana (Olmos y Paniagua-Michel, 2014). La actividad contra patógenos como otras bacterias causantes de enfermedades en humanos, se ha relacionado principalmente en la producción de péptidos con actividad antimicrobiana (AMPs por las siglas en inglés, *Antimicrobial Peptides*) (Chen et al., 2008).

Estos péptidos se han clasificado de dos fuentes de síntesis, ribosomales y no ribosomales. Los péptidos ribosomales se han subdividido 3 clases mayores según el tamaño en Kilodalton (kDa) y a la presencia o ausencia de modificaciones postraduccionales que sufren en los aminoácidos de la cadena peptídica (Huan et al., 2020). La clase 1: péptidos lantibióticos, clase 2: no lantibióticos (sin modificaciones postraduccionales complejas), clase 3: péptidos bacteriolisinas, clase 4: péptidos con estructuras

complejas. Los mecanismos de acción descritos de los AMPs se basan en provocar la muerte directa del patógeno por medio de modificaciones en la permeabilidad de las membranas, inhibición de rutas metabólicas esenciales y estimulación de células del sistema inmunitario (Abriouel et al., 2011; Caulier et al., 2019).

La identificación de pequeños péptidos antimicrobianos (de hasta 3 KDa) y con ausencia de modificaciones post traduccionales, son una excelente alternativa a los antibióticos. Las ventajas en su producción y aplicación se reflejarían en la reducción de costos de síntesis debido a su corta secuencia de aminoácidos, ausencia de modificaciones. Además, la generación de nuevas moléculas de AMPs permite la reducción en la presencia de bacterianas resistentes a antibióticos. En este sentido, la capacidad de cepas de *Bacillus* en la producción de AMPs no han sido caracterizadas por completo y son una buena fuente en la búsqueda de estos compuestos.

## 1.1 Antecedentes

### 1.1.1 Género *Staphylococcus*

Las especies del género *Staphylococcus* son bacterias Gram-positivas, no formadoras de esporas, anaerobias facultativas, inmóviles, catalasa positivas o negativas dependiendo de la especie, con una morfología de bacterias esféricas de pares o racimos similares a uvas, de donde proviene el nombre; *Staphyl*, que significa racimo de uvas, y *kokkos*, que significa baya (Paharik y Horswill, 2016).

La mayoría de las especies que integran el género crecen en los alimentos y están presentes en los animales (Krismer et al., 2017; Laux et al., 2019). Pueden sobrevivir en un rango de 7 °C a 48 °C, con una temperatura óptima de crecimiento de 30-37 °C. Soportan pH ácidos de hasta 4.5, pero su rango óptimo de crecimiento es de 7,0 a 7,5 (Bastock et al., 2021). Una de las características más notables en la mayoría de las especies es la tolerancia a las sales (Vaish et al., 2018). Históricamente han sido responsables de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos contaminados (Hennekinne et al., 2012).

Aunque se han aislado más de 50 especies pertenecientes al género *Staphylococcus*, las especies mayormente presentes en el humano son *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* y *Staphylococcus aureus* (Paharik y Horswill, 2016).



Las infecciones nosocomiales (adquiridas en clínicas u hospitales) por *S. epidermidis* y *S. haemolyticus* han generado mucha atención durante años recientes. Estas dos especies son organismos presentes en la mayoría de los casos como parte de la microbiota (conjunto de microorganismos) de la piel que mantiene la relación comúnmente benigna con su huésped (Christensen y Brüggemann, 2014). No producen moléculas determinantes de virulencia agresivas, comparado con especies cercanas. De hecho, algunos factores que normalmente sustentan el estilo de vida comensal de *S. epidermidis* parecen dar un beneficio adicional en la defensa contra otros patógenos que pueden colonizar la piel humana (Glatthardt et al., 2020).

Especies como *S. epidermitis*, *S. aureus* y *S. haemolyticus* tienen una notable adaptación para sobrevivir en fomites (objetos inertes que pueden contaminarse) durante largos periodos de tiempo (Hamdan-Partida et al., 2022).

En contraste, la especie *S. aureus* también tiene una relación cercana con la microbiota de diversos tejidos humanos; sin embargo, su presencia se relaciona mayormente con infecciones bacterianas de relevancia clínica debido a la capacidad de producción de endotoxinas, colonización e infección en tejidos externos e internos llegando a provocar enfermedades de alto índice de mortalidad (Eells et al., 2014; Krismer et al., 2017).

En las últimas décadas ha obtenido relevancia por la capacidad de resistencia a antibióticos, situándose en el nivel de prioridad elevada de la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos según la Organización Mundial de la Salud (Tacconelli et al., 2018).

### 1.1.2 *Staphylococcus aureus* y su incidencia en la salud humana

Es una bacteria Gram positiva, presente en animales y humanos. Alrededor del 30 % de los humanos sanos la albergan en sus fosas nasales (Krismer et al., 2017; Paharik y Horswill, 2016). *S. aureus* es la causa principal de la enfermedad estafilocócica. La aparición de cepas de *S. aureus* patógenas resistentes a los antibióticos es un problema mundial en medicina clínica como se mencionó previamente (Tacconelli et al., 2018).

*S. aureus* se identificó en 1880 por Alexander Ogston en fluidos de abscesos de piernas infectadas y al poco tiempo fue aislado por Rosenbach (Newsom, 2008). La presencia de infecciones provocadas por la bacteria

se relacionó entonces en el mal manejo de heridas y malas condiciones antisépticas de áreas de cirugía (Nakayama, 2018). Durante el siglo XX las condiciones en los hospitales mejoraron, sin embargo, la presencia de infecciones nosocomiales era evidente (J. Y. Liu y Dickter, 2020). Años más tarde el manejo en las infecciones bacterianas mejoró gracias al descubrimiento de la Penicilina en la década de los 40s, durante los primeros años de su aplicación, el antibiótico mejoró la calidad de vida y la reducción en la mortalidad por bacteriemia (bacterias en el torrente sanguíneo) (Mohr, 2016). Poco tiempo después, en la misma década, las primeras cepas de *S. aureus* resistentes a la penicilina fueron aisladas. Esta capacidad de resistencia fue ocasionada por la presencia del gen *blaZ* que traduce para la proteína  $\beta$ -lactamasa. Las betalactamasas son enzimas capaces de degradar los antibióticos de la familia betalactámicos (penicilinas, carbapenémicos, cefalosporinas y monobactámicos) (Harkins et al., 2017; Lobanovska y Pilla, 2017).

En los años 60s se desarrolló un análogo de la penicilina, denominado meticilina. Un año después de su uso como antibiótico fueron aislados *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA por siglas en inglés *Methicillin-resistant S aureus*) (Turner et al., 2019). La resistencia a antibióticos tiene su origen en el elemento genético móvil nombrado como "Cassette Cromosómico Estafilocócico" el cual contiene el gen *mecA*. La proteína resultante del gen *mecA* tiene una alta afinidad a la penicilina, lo cual le confiere la resistencia a un gran grupo de antibióticos beta lactámicos incluyendo la penicilina y meticilina (Harkins et al., 2017; McGuinness et al., 2017; Tong et al., 2015).

El manejo en las infecciones bacterianas provocadas por MRSA fue cada vez más complejo y evidenció la capacidad de resistencia por el agente infeccioso. Durante las décadas siguientes en el siglo XX, los aislados clínicos con resistencia a meticilina fueron más comunes (Lakhundi y Zhang, 2018). Actualmente, la prevalencia de MRSA es del 15 a 74% en diferentes estudios a nivel mundial (Köck et al., 2010). En 2005, las infecciones invasivas por MRSA en Estados Unidos, ocurrieron a una tasa de 31,8 por cada 100 000 personas y el 75 % de estas infecciones invasivas por MRSA involucraron bacteriemia provocada por *S. aureus* (Hassoun et al., 2017).

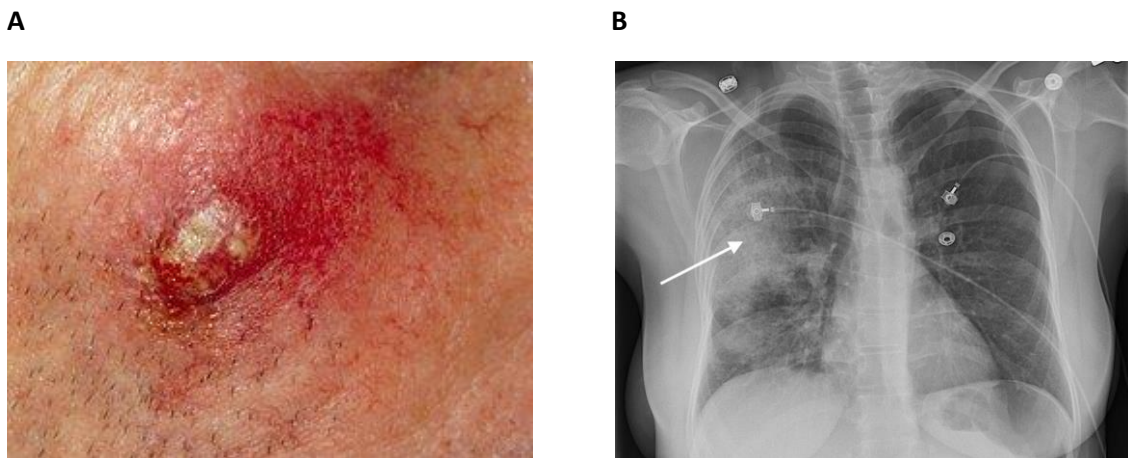
En México, no se tienen datos estadísticos homogéneos por la Secretaría de Salud Pública sobre la incidencia de SA, la mayor parte de las investigaciones son regionales o locales en hospitales generales. Un estudio reciente en el 2018 evaluó la incidencia de SA en la Clínica Médica Sur de la Ciudad de México. Se incluyeron pacientes hospitalizados de enero 2016 a enero 2018, en los cuales se aisló *S. aureus* en muestras analizadas en el Departamento de Microbiología. Se analizaron 128 aislados de los cuáles 81% eran aislados sensibles a meticilina (MSSA *methicillin-sensitive S. aureus*) y 19% fueron MRSA (Castañeda-Méndez, 2018)

En el estado de Baja California tampoco existe información sólida sobre la presencia de cepas resistentes de *S. aureus*. Una tesis en el 2016 evaluó aislados clínicos del Centro Oncológico Pediátrico de la ciudad de Tijuana, Baja California. Los resultados mostraron que de las 44 muestras clínicas de *S. aureus*, el 16% mostró resistencia a metilina (Carrillo Terrazas, 2016).

Aunque la circulación de cepas resistentes es en un porcentaje menor, es importante mencionar que la circulación de estas existe dentro de la población mexicana. La observación epidemiológica a nivel estatal, nacional y mundial es de suma importancia, debido al grado de relevancia por parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para efectuar tratamientos efectivos en un futuro.

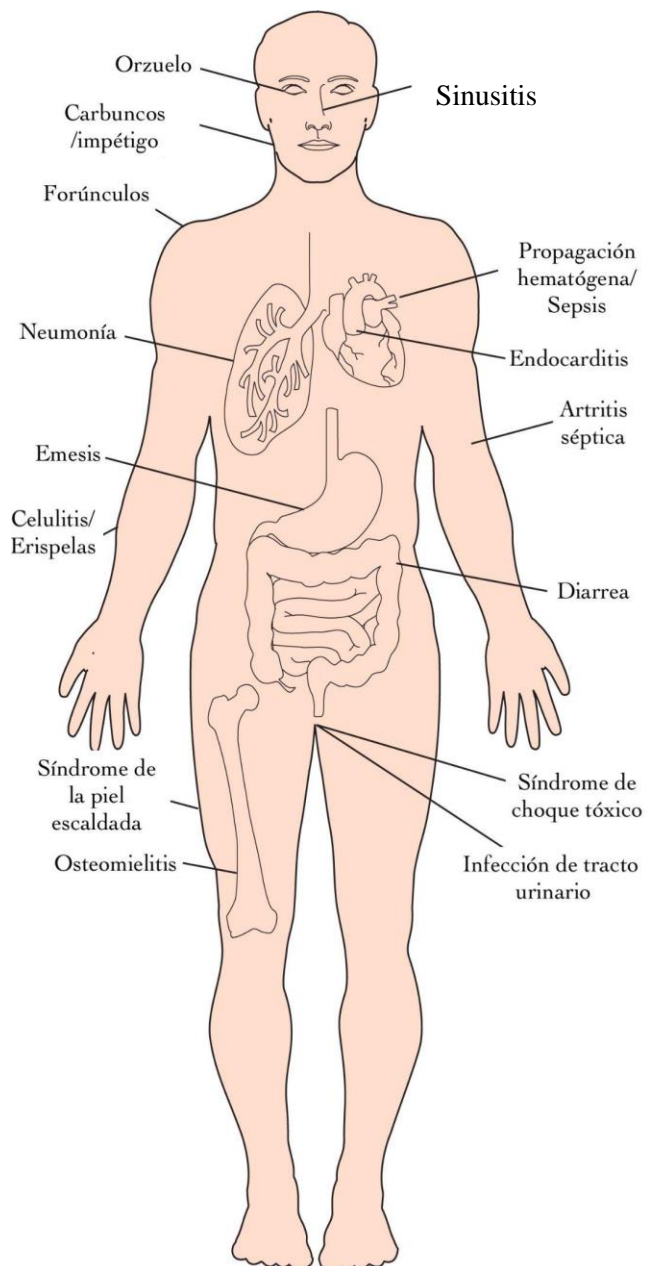
### 1.1.3 Efectos de la infección de SA en la salud humana

*Staphylococcus aureus* es una bacteria comensal, pero también puede actuar patógeno humano (Krismer et al., 2017). Las infecciones por *S. aureus* suelen aparecer en la piel como una bolsa de pus rodeada de piel roja y dolorosa (Figura 1A) (Leung et al., 2018). También pueden ocasionar intoxicación por ingestión de endotoxinas (Hennekinne et al., 2012). El mal manejo de las infecciones, así como pacientes con un sistema inmune comprometido puede ocasionar la infección severa aumentando el riesgo de mortalidad y morbilidad (Hassoun et al., 2017).



**Figura 1.** Infecciones provocadas por *S. aureus*. A) Infección leve en la dermis humana, B) Infección severa en los pulmones (desarrollo de neumonía).

Algunos de los casos severos ocasionados por *S. aureus* son: bacteriemia (infección en torrente sanguíneo), endocarditis infecciosa (EI), infecciones osteoarticulares, de piel y tejidos blandos, pleuropulmonares o neumonía (Figura 1B) (Miller et al., 2020). La bacteriemia es quizás la manifestación mejor descrita de la infección por *S. aureus*. Múltiples estudios han documentado la prevalencia, incidencia el pronóstico y la relación de la *Bacteriemia por S. aureus* (SAB) en las regiones industrializadas del mundo (van Hal et al., 2012).



**Figura 2.** Afectaciones en la salud humana producidas por infecciones de *Staphylococcus aureus*. Tomado y modificado de Wetheim et al., 2005.

La edad es una determinante clave de la incidencia de SAB, y las tasas más altas de infección ocurren en cualquier extremo de la vida, infantes o adultos mayores (Hassoun et al., 2017). Los estudios demuestran altas tasas en el primer año de vida, una baja incidencia durante la edad adulta temprana y un aumento gradual de la incidencia con el avance de la edad. SAB se puede clasificar como "complicado" o "no complicado". Estas designaciones tienen implicaciones significativas para la extensión y el tipo de evaluación diagnóstica, la duración del tratamiento antibiótico y el pronóstico general (Turner et al., 2019). Un estudio de un solo centro de 724 pacientes de SAB definió la infección complicada como aquella que resultó en mortalidad atribuible, debido a afectaciones en el sistema nervioso central (SNC). Debido a la presencia de *S. aureus* en diversos tejidos humanos, las patologías asociadas a la infección son variadas (Figura 2) y dependiendo del tipo de manifestación clínica es el tratamiento (Kourtis et al., 2019; Paharik y Horswill, 2016; Wertheim et al., 2005).

#### 1.1.4 Bacterias probióticas, una fuente de moléculas con actividad antibiótica

En años recientes se ha demostrado que bacterias probióticas aportan beneficios a la salud directa del portador, desde la salud nutricional, salud mental y combate contra patógenos (Olmos et al., 2020). La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de los Estados Unidos para la Agricultura y la Alimentación (NIFA) definen a los probióticos como "*microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped*" (Hill et al., 2014). La propiedad más importante de una cepa probiótica es que debe ser seguro para la salud humana o animales de interés, denominada certificación GRAS (por sus siglas en inglés: *Generally recognized as safe*). Por lo tanto, las cepas bacterianas de esta categoría podrían considerarse inofensivas y pueden incluirse en tratamientos humanos. Además, las bacterias probióticas deben tener capacidad de adherencia para competir con los patógenos por los sitios de unión en la mucosa del intestino (Rubio et al., 2017). Las bacterias seleccionadas deben ser capaces de soportar altas temperaturas y pH extremos para sobrevivir al proceso de ingestión. De manera óptima, los probióticos deben producir una gran diversidad de enzimas y péptidos antimicrobianos (AMPs) para poder eliminar patógenos oportunistas (Caulier et al., 2019).

Se han descrito *Lactobacillus salivarius* y *L.fermentum* con efectos antimicrobianos contra de *S. aureus* y otras bacterias patógenas (M. S. Kang et al., 2017). La especie *Lactobacillus plantarum* produce un péptido antimicrobiano denominado Tet213. Los efectos del péptido sobre *S. aureus* mostraron inhibición en la formación de biopelículas (Ming et al., 2015).

Recientemente se ha integrado a especies de *Bacillus* como bacteria probiótica (Olmos y Paniagua-Michel, 2014). Están presentes en la mayoría de los ecosistemas terrestres. Esta predominancia se ha reflejado en su capacidad de supervivencia en ambientes hostiles y de competencia por nutrientes. Desde su capacidad en la producción de AMPs, enzimas degradadoras de moléculas complejas, y mejoramiento en la diversidad de la microbiota intestinal de organismos pluricelulares (Caulier et al., 2019).

La mayoría han mostrado una carga catiónica debido a la presencia de aminoácidos con carga positiva como histidina, arginina y lisina. Sin embargo, se han aislado AMPs con carga aniónica debido a la presencia de ácido aspártico, ácido glutámico. Se ha observado un patrón en mayoría de los péptidos con una proporción significativa (aproximadamente 50%) de residuos hidrofóbicos (Haney et al., 2017; Huan et al., 2020).

La Gramicidina, fue el primer AMP que se descubrió en 1939 a partir de la bacteria del suelo *Bacillus brevis* y mostró actividad antibacteriana *in vitro* e *in vivo* contra muchas bacterias gran positivas (Dubos, 1939). Actualmente, se han identificado más de 3000 péptidos con actividad contra patógenos, la mayoría de ellos reportados en la base de datos *Antimicrobial Peptide Database* (APD3) (G. Wang et al., 2016). El aislamiento de los AMPs tiene su origen en plantas, mamíferos, anfibios, organismos acuáticos, insectos y microorganismos como levaduras o bacterias (Huan et al., 2020).

Debido al rápido aumento de microorganismos patógenos resistentes a los medicamentos, los AMPs de fuentes sintéticas y naturales han ganado interés como nuevos agentes terapéuticos (H. K. Kang et al., 2017). En este sentido, el género *Bacillus* ha mostrado una enorme diversidad en la producción de AMPs (Caulier et al., 2019)

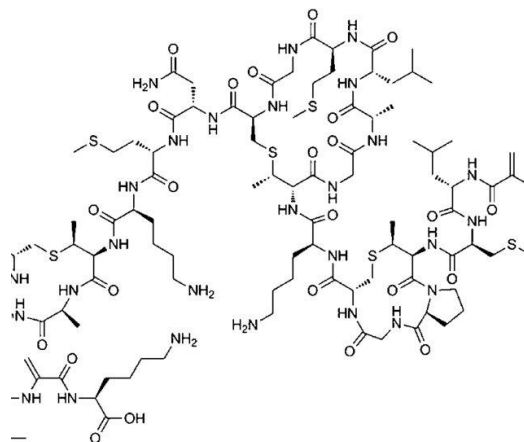
#### 1.1.4.1 Clasificación de los Péptidos antimicrobianos (AMPs) bacterianos

Aunque existen diversas clasificaciones para los AMPs basados en la estructura, actividad biológica y fuente de producción. La clasificación más aceptada para los péptidos producidos por bacterias se sustenta del peso molecular, modificaciones postraduccionales y su fuente bacteriana; Gram positiva o Gram negativa (Figura 4) (bin Hafeez et al., 2021)

### 1.1.4.2 AMPs Bacterias Gram positiva

Los AMP bacterianos sintetizados ribosomalmente se denominan bacteriocinas (Tajbakhsh et al., 2017). Las bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas; como las bacterias pertenecientes al género *Bacillus*, se pueden clasificar en cuatro clases: (1) lantibióticos, (2) no lantibióticos, (3) bacteriocinas de gran tamaño y (4) bacteriocinas de estructura única (Simons et al., 2020).

- Clase 1, también nombrados lantibióticos, son AMPs de una longitud promedio de 19 a 38 aminoácidos, con pesos moleculares menores a 5 KDa. Algunas características particulares son sus modificaciones postraduccionales (PTMs por sus siglas en inglés *post-translational modifications*) como adición de aminoácidos inusuales como lantionina o puentes de lisinoalanina (Xie y van der Donk, 2004). Estas modificaciones se reflejan en su estabilidad a temperaturas mayores de 60 °C, resistencia un amplio rango de pH y proteólisis. La clase I se divide en dos subclases (Islam et al., 2012; Sahl et al., 1995).
  - La subclase 1a: la mayoría de péptidos de esta subclase tienen una carga positiva y una estructura lineal con una actividad antimicrobiana dirigida a la formación de poros en las membranas bacterianas. De igual forma algunos péptidos pertenecientes a esta subclase inhiben la síntesis de la pared celular, uno de los más caracterizados es la nisina (Figura 3) (Bierbaum y Sahl, 2009; Salmieri et al., 2014).



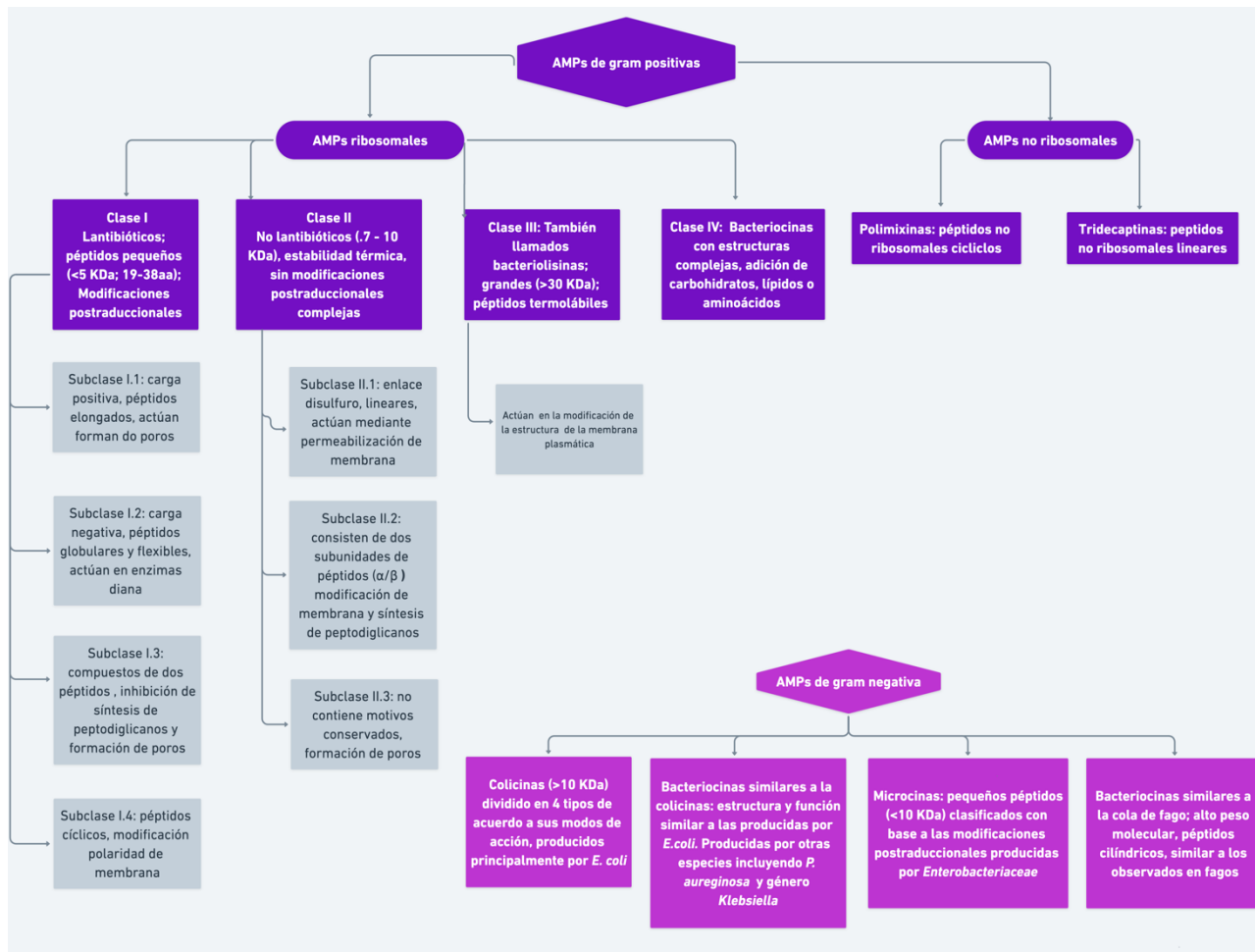
**Figura 3.** Estructura química de la Nisina. Tomado de Salmieri et al., 2004.

- La subclase 1b: consta de péptidos globulares, no flexibles con carga negativa que inhiben enzimas cruciales de las bacterias objetivo. Algunos péptidos pertenecientes a esta subclase son la citolisina y salivaricinas (Simons et al., 2020).
- Clase 2, incluyen péptidos pequeños (<10 kDa), lineales, resistentes al calor y a los tratamientos ácido-básicos (bin Hafeez et al., 2021). A diferencia de los antibióticos de Clase I, los AMP de Clase II son bacteriocinas que no contienen lantionina y experimentan modificaciones postraduccionales limitadas (principalmente unión mediante enlaces disulfuro) y, por lo tanto, no contienen aminoácidos inusuales (Fimland et al., 2005; Nissen-Meyer et al., 2010). Actúan como bacterias formadoras de poros/desestabilizadoras de membranas/aumentadoras de la permeabilidad (bin Hafeez et al., 2021). Las bacteriocinas de clase II se pueden clasificar en cuatro subclases
  - Subclase 2a: péptidos lineales con enlace disulfuro. La mayoría se ha asociado a mecanismos de modificación de la permeabilización de la membrana celular. PA-1, producido por *Lactobacillus plantar* actúa mediante la formación de poros (Fimland et al., 2005).
  - Subclase 2b: son péptidos constituidos por dos subunidades peptídicas en igual proporción que actúan exclusivamente en conjunto. Por ejemplo, Lactacina F. Actúa en la modificación de la permeabilidad específica de K<sup>+</sup> y fosfato (Nissen-Meyer et al., 2010).
  - Subclase 2c: péptidos de bajo peso molecular, menor a 10 KDa, comúnmente circulares, mediante la unión de los grupos N y C terminal. Algunos por ejemplo son la Gassericina A, lactociclina Q y Uberolisina. La mayoría actúa de forma similar mediante la permeabilización de la membrana, permitiendo la disipación de iones y modificando el potencial de membrana ocasionando la muerte celular (Nissen-Meyer et al., 2009; Sawa et al., 2009; van Belkum et al., 2011).
  - Subclase 2d: Son todas las bacteriocinas no caracterizadas, y no comparten una similitud con las secuencias de la clase II (Simons et al., 2020).
- Clase 3 de bacteriocinas, también llamadas bacteriocinas, consisten de péptidos termoestables, de peso molecular >30 KDa. Algunos identificados son las zoocina A y la enterolisina A. Investigaciones han expuesto que algunas de estos péptidos tienen efectos en la inhibición de síntesis de la pared celular (Cotter et al., 2005; Simons et al., 2020)



- Clase 4, son estructuras mayormente complejas debido a la presencia de monómeros de lípidos o carbohidratos. Algunos aislados son la lactocina 27 y la pediocina SJ-1, que actúan en la disrupción de la membrana celular (da Silva Sabo et al., 2014; Heng et al., 2007) .

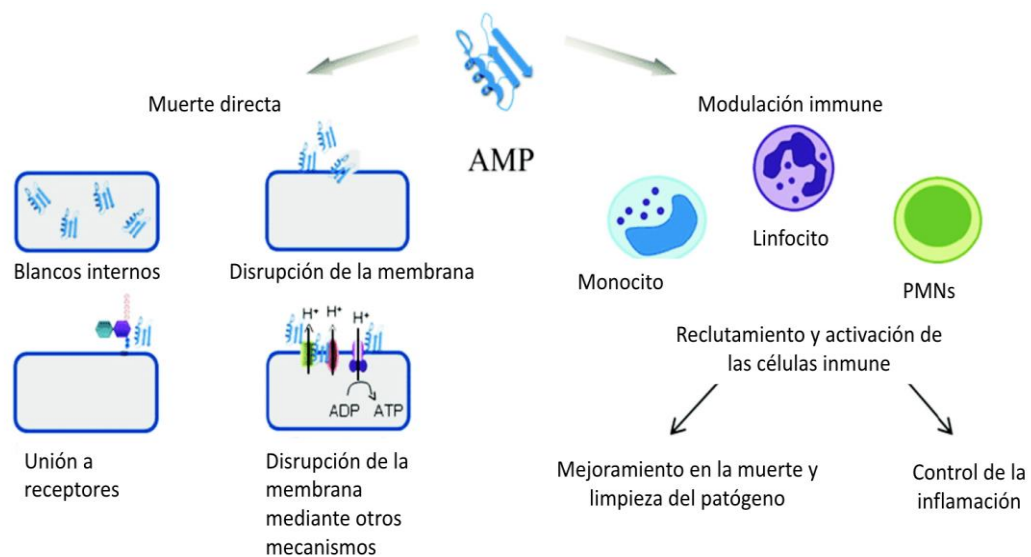
Las bacteriocinas no ribosomales son resultado de enzimas denominadas péptidos sintetetas no ribosómicos (NRPS), enzimas multimodulares que catalizan la síntesis de productos naturales muy diversos de origen bacteriano o fúngico, denominados péptidos no ribosómicos (NRPs) (Tajbakhsh et al., 2017). Algunos de las bacteriocinas que tienen este origen son las polimixinas: son lipopéptidos cíclicos no ribosomales, se han denominado así debido al primer aislado proveniente de *Paenibacillus polymyxa* y las Tridecaptinas (Galea et al., 2017).



**Figura 4.** Clasificación de los péptidos antimicrobianos (AMPs) producidos por bacterias. Tomado y modificado de Kumar et al., 2018.

### 1.1.5 *Bacillus* y su capacidad para la producción de AMPs contra especies patógenas

Las especies del género *Bacillus* se encuentran entre las bacterias más extendidas en todo el mundo; se puede encontrar en el suelo, agua dulce y marina, aire y diferentes tipos de alimentos (Olmos y Paniagua-Michel, 2014). Son bacterias Gram positiva, formadoras de esporas, con especies que pueden sobrevivir en condiciones de oxígeno (aerobias) y ausencia relativa de oxígeno (anaerobias facultativas) y su nombre se debe a su morfología tipo bastón (Mondol et al., 2013). Varias especies de *Bacillus* están aprobadas por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) porque no son tóxicas para los animales ni para los humanos, siendo *Bacillus subtilis*, la más empleada como bacteria probiótica. La mayoría de las enzimas de *Bacillus* se secretan al medio de cultivo, lo que facilita su purificación y aplicación como alimento (Chen et al., 2008). Algunas enzimas de *Bacillus* tienen la capacidad de degradar proteínas, carbohidratos y lípidos complejos de cualquier fuente, lo que permite su rápido crecimiento en casi cualquier fuente de carbono y nitrógeno (Olmos et al., 2020). Estas bacterias pueden crecer en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, en pH ácidos como los que se encuentran en el tracto digestivo. Se han descubierto una gran variedad de péptidos antimicrobianos, que pueden inhibir el desarrollo de patógenos (Caulier et al., 2019; Stein, 2005). Muchos de estos péptidos se han aislado de diversas especies de *Bacillus*, sin embargo, se ha observado que inclusive entre cepas distintas de la misma especie se producen péptidos con actividad específica contra patógenos (Mercado y Olmos, 2022).



**Figura 5.** Actividad de los AMPs de *Bacillus* sp. en la respuesta contra patógenos. Tomado y modificado de Kumar et al., 2018.

Algunas de las actividades que están relacionadas a los AMPs producidos por *Bacillus* son la modificación de la membrana celular mediante la formación de poros (Figura 5). Aunque es el mecanismo que mayormente se presenta provocado por AMPs también se ha demostrado que pueden tener acción en enzimas diana de importancia celular, por ejemplo, inhibición de enzimas de rutas metabólicas (Caulier et al., 2019; Haney et al., 2017; Kang et al., 2017). Un gran número péptidos identificados comparten algunas características principalmente estabilidad frente a condiciones físicas extremas, como termo tolerancia, pH extremos ácidos y básicos entre otros. Este patrón de estabilidad se ha relacionado con la capacidad de las bacterias pertenecientes al género a habitar diversos ambientes (Abriouel et al., 2011; Sumi et al., 2015).

Recientemente se ha relacionado que algunos AMPs de bacterias probióticas tienen la capacidad de estimular la respuesta inmune mediante la modulación de células del sistema inmunológico del humano. Las investigaciones de la importancia de los probióticos en la salud humana tienen una relación también en la presencia de AMPs específicos que permiten el mejoramiento en la respuesta inmune, control de la inflamación y la eliminación de los patógenos (Mohammed y Radey, 2021).

#### 1.1.6 Producción de AMPs durante el crecimiento de *Bacillus*

La producción de péptidos antimicrobianos tiene una relación con el crecimiento bacteriano. Estas han sido determinadas mediante la realización de curvas de crecimiento. Se componen de cuatro etapas principales (Figura 6). Las fases de crecimiento tienen características metabólicas y reproductivas distintas que son particulares para cada especie bacteriana.

- Fase latencia: es el periodo breve, comúnmente observada en el proceso de transición de medio de crecimiento. Presenta una alta actividad metabólica, sin embargo, bajo número de células. Con una baja producción de metabolitos secundarios
- Fase exponencial: o también denominada fase logarítmica, sus características particulares son la alta actividad metabólica, aumento en el número de células. Baja producción metabolitos secundarios. Se ha observado en diversas especies de *Bacillus* que a mitad de la de la etapa exponencial empieza la producción de AMPs (J. Li et al., 2014; X. Liu et al., 2015)

- Fase estacionaria: esta fase se caracteriza por el aumento de número células proporcional a la muerte de otras. El alcancé de esta etapa se debe a razones de agotamiento de nutrientes, número de células en medio de cultivo, presencia de productos tóxicos. La mayoría de los metabolitos secundarios son producidos en esta etapa, incluyendo péptidos antimicrobianos (AMPs).
- Fase de muerte: al reducirse drásticamente la presencia de nutrientes en el medio, así como el aumento de metabolitos secundarios, la tasa de reproducción disminuye y el número de células vivas son menores conforme al tiempo.

## Curva de crecimiento Bacteriano

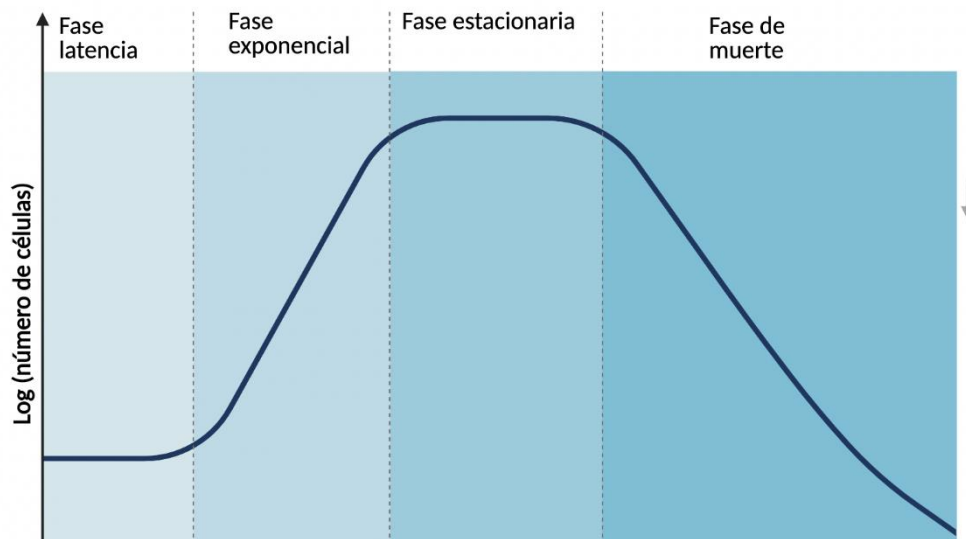


Figura 6. Etapas de crecimiento bacteriano.

Una característica particular de las especies que integran al género *Bacillus* es su capacidad para formar esporas. Este fenómeno tiene su origen durante la etapa estacionaria. Esta capacidad de algunas bacterias son mecanismos naturales que les permiten sobrevivir a los desafíos ambientales y nutricionales. La formación de esporas permite que el genoma bacteriano se mantenga en una estructura resistente de forma esférica (espora) hasta que mejoran las condiciones ambientales o nutricionales, momento en el que la espora germina rápidamente y vuelve al estado vegetativo. La estructura de la espora le permite

tener una resistencia a factores ambientales (pH, temperatura, sales) y biológicos (degradación por enzimas).

La mayoría de los metabolitos secundarios producidos por especies de *Bacillus* son producidos al término de la fase exponencial y durante en la fase estacionaria. Este comportamiento está vinculado con el medio de cultivo seleccionado y la formación de esporas, debido a las características nutricionales y de población celular. Algunos de los medios de cultivo más utilizados para la producción de AMPs son Luria Bertani (LB), Nutriente Broth (NB), Caldo de soja tríptico (TSB), Infusión cerebro-corazón (BHI), entre otras. La mayoría de los medios desarrollados tienen una restricción nutricional, que, debido a la ausencia de fuentes de carbono principales, como glucosa, se metaboliza otras fuentes como proteínas, al existir una competencia por nutrientes debido al número de células presentes en el medio, diversas rutas metabólicas y de expresión de genes se activan, aumentando la producción de diversos compuestos incluyendo péptidos antimicrobianos.

### 1.1.7 Ultrafiltración para AMPs

La mayor parte de los AMPs que se han identificado han sido mediante el empleo de herramientas que han facilitado el proceso de aislamiento y purificación, como técnicas de ultrafiltración a base filtros de celulosa y cromatografía líquida de alta de alta eficiencia (HPLC) (Tang et al., 2018).

La filtración es el proceso en el cual moléculas que se encuentran en solución acuosa pasan o se retienen a través de una membrana con un tamaño de poros conocido (Brose et al., 2002). El tamaño del poro define a la clasificación de filtración.

- Filtración simple de partículas: tamaño de poros de de 1 a 1000 micras ( $\mu\text{m}$ ) utilizada comúnmente para la eliminación de partículas grandes con peso molecular mayor de 500 Kilodalton (KDa) (Brose et al., 2002).
- Microfiltración: tamaño de poros de 10 a 0.1  $\mu\text{m}$ , con una retención de moléculas mayores a 100 KDa. (Brose et al., 2002).
- Ultrafiltración: tamaño de poros de 0.1 a 0.01  $\mu\text{m}$ , con una retención de moléculas que va desde 1 KDa a 100 KDa (Ghose, 1994).

- Nanofiltración: tamaño de poros de 0.01 a 0.001  $\mu\text{m}$ , con una retención desde los .200 a 1000 KDa. (Holdich et al., 2006).

La ultrafiltración es el proceso mayormente usado para la purificación de proteínas o péptidos, en el cual una solución que contiene estas moléculas pasa través de membrana impulsado por la presión generada por la fuerza centrífuga (Brose et al., 2002). Las membranas de ultrafiltración tienen poros con diversos diámetros que dependiente de este valor, son las moléculas que pueden atravesar la membrana, pueden ir desde los 0.1 a 0.01  $\mu\text{m}$  (Ghose, 1994). Aunque la ultrafiltración a menudo se ha visto como una separación puramente basada en el tamaño, por moléculas más grandes retinas que los poros de la membrana, la separación en la ultrafiltración en realidad ocurre debido a las diferencias en la tasa de filtración de diferentes componentes a través de la membrana en respuesta a una fuerza impulsora de presión dada, no ocurre de forma espontánea al aplicar la solución en el filtro (Holdich et al., 2006; Zumstein, 2001).

La selección de la membrana ideal dependerá del objetivo de purificación, previo a esto se requiere de un conocer el concepto corte de peso molecular (MWCO por sus siglas en inglés *Molecular weight cut-off*) es un método de caracterización utilizado en la filtración para describir la distribución del tamaño de los poros y las capacidades de retención de las membranas. Se define como el peso molecular más bajo (en Daltons) en el que la membrana retiene más del 90% de un soluto con un peso molecular conocido (Ghose, 1994).

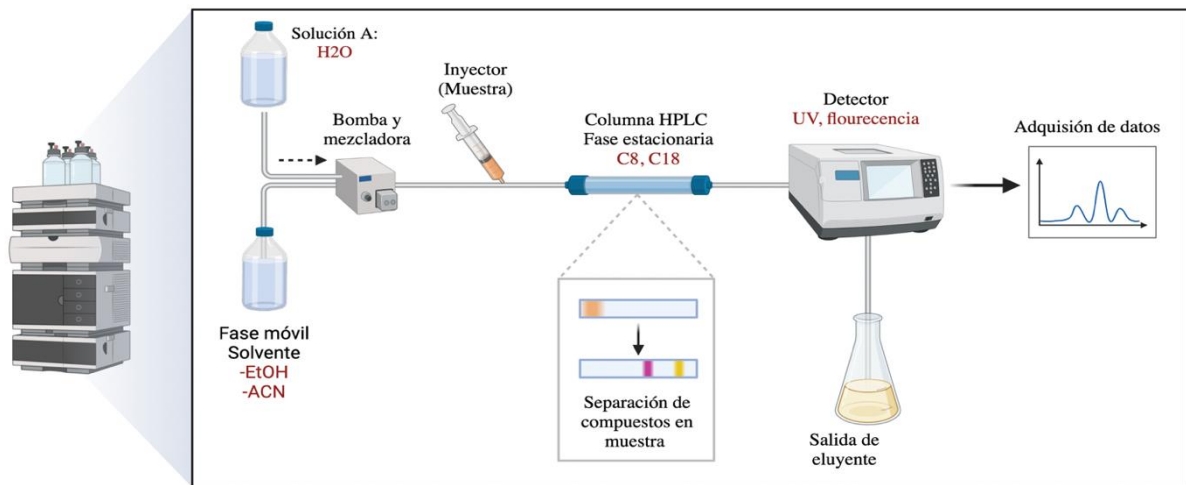
Al elegir el límite de peso molecular apropiado para aplicaciones específicas, se deben considerar muchos factores, incluida la concentración de la muestra, la composición, la forma molecular y las condiciones operativas, como la temperatura y la presión. La mayoría de las casas comerciales tienen a la venta dispositivos de ultrafiltración que van desde los 100, 50, 30, 10, 5 y 3 MWCO.

### 1.1.8 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para AMPs

La Cromatografía líquida de Alta Resolución o HPLC por sus siglas en inglés *High-performance liquid chromatography* es una técnica muy empleada para la purificación de diversas moléculas, incluyendo proteínas y péptidos (Josic y Kovac, 2010). Emplea un fundamento similar a la cromatografía líquida en columna. La separación de uno o varios compuestos que constituyen una muestra son eludidos debido a la diferencia en las afinidades relativas por la fase móvil y la fase estacionaria utilizada (Carr D., 2002).

Los elementos esenciales para el funcionamiento de HPLC son: una muestra o analito, una fase móvil (eluyente), una fase estacionaria (características de la columna) y una unidad de detección. Dependiente de la estructura química del analito, las moléculas se retardan mientras pasan por la fase estacionaria. Las interacciones intermoleculares específicas entre las moléculas y el material del relleno de la columna, definen su tiempo en la columna, esta característica principalmente es dada por las características de hidrofobicidad de la fase estacionaria y la muestra. Por lo tanto, los diferentes compuestos de una muestra se eluyen en tiempos diferentes debido a la modificación de las interacciones hidrofóbicas o hidrofílicas ocasionadas por la fase móvil (Blum, 2014; Mant et al., 2007)

Se dividen en dos tipos de HPLC, fase normal (NP-HPLC) y fase reversa (RP-HPLC). Esta clasificación se refiere a la polaridad de los elementos de la fase móvil y la fase estacionaria. En la fase normal la fase móvil son solventes de características no polares o polaridad baja, por ejemplo, heptano. La fase estacionaria presenta una alta polaridad. Los elementos eluidos mediante esta fase son inicialmente compuestos hidrofóbicos (Blum, 2014).

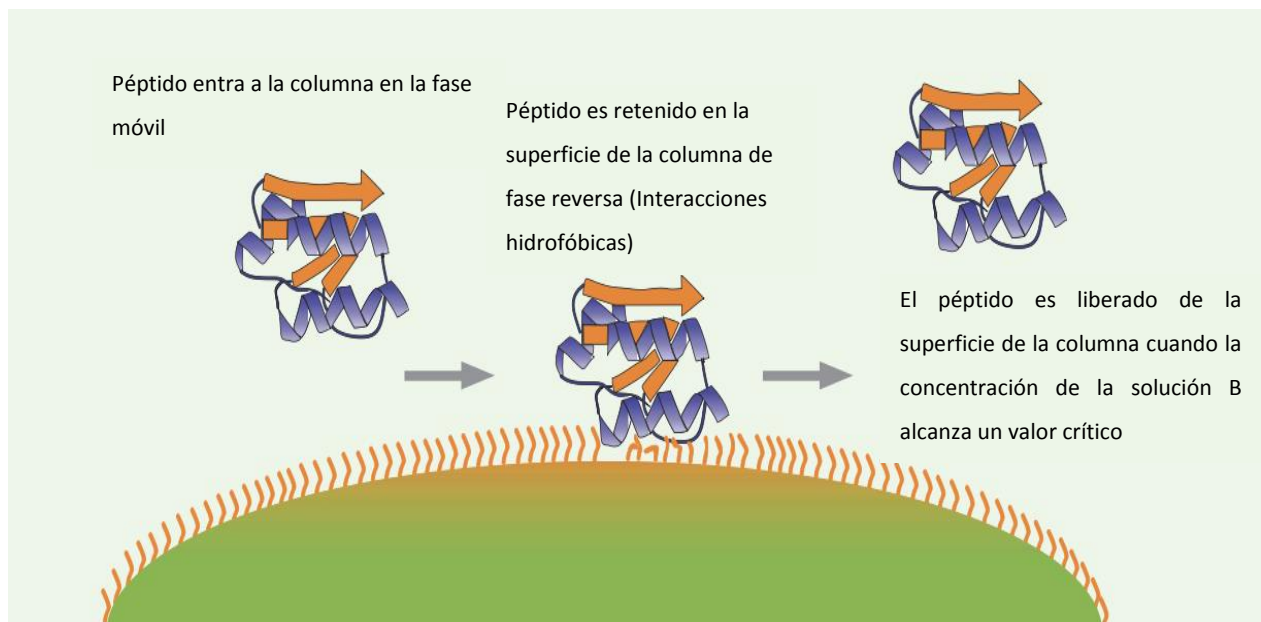


**Figura 7.** Elementos principales de Cromatografía Líquida de Alto Resolución fase reversa (RP-HPLC). Marcas rojas: soluciones y unidades usadas comúnmente para la purificación e identificación de péptidos.

Sin embargo, la fase reversa (RP-HPLC) es la que mayormente se ha empleado para la identificación proteínas y péptidos. A diferencia de la fase norma, la fase móvil son solventes de polaridad media a alta, como etanol (EtOH) o acetonitrilo (ACN) y una fase estacionaria de baja polaridad, comúnmente provista por cadenas de alcanos que dependiendo de la longitud de carbonos le permite tener propiedades de

retención de compuestos, por ejemplo, cadenas de alcanos de 8 carbonos (C8) o 18 carbonos (C18) anclados a superficie comúnmente de sílica. Para péptidos de bajo peso molecular >10 000 Daltons, se recomienda el empleo de columnas de C8. Las columnas C18 para moléculas por debajo de los 1000 (Figura 7) (Carr D., 2002; Mant et al., 2007).

La mayoría de los péptidos antimicrobianos (AMPs) tienen una región polar y otra no polar (anfipáticos). El empleo de RP-HPLC, permite la interacción de la región hidrofóbica de los péptidos con la cadena de carbonos de la fase estacionaria (Figura 8). La fase móvil más usada es acetonitrilo debido a su polaridad intermedia, lo que permite tener un mayor rango de resolución respecto a la hidrofobicidad de las moléculas presentes en la muestra



**Figura 8.** Mecanismo de ingreso de péptido a columna en fase móvil. Tomado y modificado de Carr D., 2002.

La unidad de detección varía dependiendo del tipo de muestra a analizar. Se clasifican en dos familias:

- Detectores basados en propiedad del soluto: responden a las propiedades del soluto, por ejemplo, detectores de absorbancia UV o fluorescencia. Las señales reportadas son entonces, proporcional a la intensidad de la presencia del compuesto en la muestra (Blum, 2014).



- Detector basado en propiedad en bloque: por ejemplo, detectores de HPLC de índice de refracción, se basan en el cambio del índice de refracción del eluyente de la columna con respecto a la fase móvil pura (Blum, 2014)

Para la detección de péptidos la unidad de detección mayormente empleada es de tipo luz ultravioleta (UV), esto es debido a que los enlaces peptídicos absorben fuertemente la luz en el ultravioleta lejano (UV) (<230 nm), proporcionando un medio conveniente de detección (generalmente entre 210 y 230 nm). Aunque también se utiliza la longitud de 280 basados en los residuos de aminoácidos aromáticos como tirosina, fenilalanina y triptófano absorben luz en el rango UV de 250 a 290 nm (Josic and Kovac, 2010; Lee et al., 2019; Selsted, 1997).

## 1.2 Justificación

Las especies del género *Bacillus* producen y secretan AMPs capaces de inhibir diversos patógenos. En este sentido y debido a la gran diversidad de AMPs producidos por especies del género, junto con la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento de infecciones bacterianas por *S. aureus*, los AMPs son una alternativa prometedora en el manejo de infecciones bacterianas. Este trabajo se enfoca en aislar, identificar y analizar pequeños péptidos antimicrobianos (AMPs) de la clase 2, subclase 3, que no tiene modificaciones postraduccionales, resistentes a pH y altas temperaturas, con capacidad inhibitoria frente a aislados clínicos de *S. aureus* y *S. haemolyticus*. La búsqueda de nuevos AMPs producidos por *Bacillus*, representan una fuente poco explorada para la generación de fármacos.

## 1.3 Hipótesis

Las especies del género *Bacillus* producen pequeños péptidos antimicrobianos con capacidad antibiótica contra especies del género *Staphylococcus*.

## 1.4 Objetivos

### 1.4.1 Objetivo general

Aislar y caracterizar péptidos antimicrobianos producidos por *Bacillus* con capacidad para inhibir aislados clínicos de *S. aureus* y *S. haemolyticus*.

### 1.4.2 Objetivos específicos

- Identificar cepas de *Bacillus* con capacidad para inhibir el crecimiento en placa de especies patógenas de *Staphylococcus*.
- Determinar el tiempo en el que se alcanza la máxima producción de péptidos antimicrobianos respecto a la curva de crecimiento de *Bacillus*.
- Caracterizar los péptidos antimicrobianos con efecto inhibitorio contra especies patógenas de *Staphylococcus*.

## Capítulo 2. Metodología

---

### 2.1 Selección y cultivos de especies de *Staphylococcus*.

Las especies de *Staphylococcus* aisladas de pacientes enfermos se obtuvieron de muestras provistas por el Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE) del departamento de parasitología. Dos especies fueron seleccionadas provenientes de infecciones urinarias de adultos mayores e identificados como *S. haemolyticus* (SH) y *S. aureus* (SA). La identificación fue realizada por el ISSSTE mediante el equipo VITEK 2 (VITEK 2 Compact, Biiomerieux). Los modelos patógenos SH y SA fueron trasladados a viales con glicerol a  $-70^{\circ}$ . Previo a las pruebas de difusión de agar, se sembraron en placas provenientes de los viales de glicerol para su posterior incubación durante 24 horas a  $30^{\circ}$  C en medio BHI (*Brain heart infusion*).

Debido a sus características nutricionales del medio BHI, se utilizan regularmente como medio para el hemocultivo y como principal medio para la identificación de *Streptococcus*, *Staphylococcus* y otras bacterias de relevancia clínica (M. S. Kang et al., 2017).

### 2.2 Selección de cepas de *Bacillus*

Las cepas de *Bacillus* fueron previamente aisladas de muestras de suelo y agua de sedimentos marinos ((Leonel Ochoa-Solano y Olmos-Soto, 2006). Se denominaron como cepas B2, B3, B4 y N24 provenientes de la colección de aislados de *Bacillus* del Departamento de Biotecnología Marina, de la División de Biotecnología experimental. Se cultivaron en placas con medio sólido de lisogenia (LB) durante 24 horas y se mantuvieron en refrigeración a  $4^{\circ}$  C.

#### 2.2.1 Obtención de sobrenadante.

La obtención de sobrenadante se hizo mediante el crecimiento de las cepas de *Bacillus* en medio Schaeffer. Se realizó un crecimiento en placa con medio sólido LB durante 12 horas. Se obtuvo una muestra mediante un asa bacteriológica para su crecimiento nocturno (overnight), en matraces de 250 mL con 30 mL de medio líquido LB a 250 revoluciones por minuto (rpm) durante 12 horas en una agitadora a  $37^{\circ}$ .

Posteriormente se tomó una muestra de 3 mL y fueron transferidas a matraces de 250 mL con 27 mL de medio líquido de esporulación Schaeffer y se mantuvieron durante 12 horas a los mismos parámetros del cultivo overnight. Se tomaron lecturas al finalizar el crecimiento overnight y el crecimiento en medio de producción. Las lecturas se realizaron tomando 100 µl de muestra en 900 µl de agua en una dilución 1:10, y se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 600 nanómetros en un espectrofotómetro HACH DR 5000.

El crecimiento en el medio de producción de las cepas de *Bacillus* se realizó con su réplica experimental. Los valores de absorbancia fueron multiplicados por el valor de dilución 1:10 para calcular su absorbancia real de las muestras. Los valores de absorbancia fueron transferidos al software Prism9 GraphPad® y graficados.

Posterior a las 12 horas de crecimiento se tomaron 10 mL de muestra de los diferentes medios. Los volúmenes se transfirieron en tubos *Falcon*<sup>TM</sup> de 50 mL y fueron llevados a centrifugación mediante una centrífuga (Eendorf® 5804-R) a 10 000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió mediante una jeringa de 10 mL y se adaptó al filtro disco de membrana de PTFE de 0.2 micras x 25 mm. El filtrado se trasladó a tubos Eendorf® de 1.5 ml y se llevaron al congelador a -4° C para su conservación y posterior utilización en las pruebas de inhibición.

### **2.3 Curva de crecimiento y determinación de producción máxima de AMPs.**

La determinación del tiempo de producción máxima de los AMPs se realizó mediante el muestreo en la curva de crecimiento de la cepa B2 que mostró mayor actividad antimicrobiana contra las especies *S. aureus* y *S. haemolyticus*. Se incubó una placa con medio LB con la cepa B2 durante 12 horas en matraz de 250 mL. Posteriormente se tomó una muestra y se inoculó en 30 mL medio líquido LB (Overnight). La incubación fue de 12 horas a 37° a 250 rpm. Al finalizar se midió la absorbancia mediante un espectrofotómetro a una longitud de onda única de 600 nm. Posteriormente se tomó una muestra de 3 mL para llevarlo a 27 mL medio Schaeffer para la adaptación metabólica a los mismos parámetros del cultivo Overnight. Se esperó hasta alcanzar la mitad de absorbancia del cultivo Overnight. Una vez alcanzada la absorbancia, se tomó una muestra de 3 mL y fueron transferidas a medio nuevo Schaeffer en un volumen de 27 mL. Las mediciones de absorbancia se realizaron cada hora y graficando al mismo tiempo para analizar la tendencia de la curva de crecimiento. Al alcanzar la tendencia estacionaria se indicó como tiempo 0 (T0). Se obtuvieron muestras en el inicio de la fase estacionaria indicado con las

anotaciones: T0, T2, T4 y T6, cada número representa la hora después del inicio de la fase estacionaria. El sobrenadante se filtró como se mencionó en el apartado 2.2.1. Las pruebas se hicieron por su réplica experimental.

La determinación de la producción máxima se seleccionó con la comparación en la actividad antimicrobiana de los tiempos de muestreo en las pruebas de difusión de agar, así como el análisis de los mismos en geles de poliacrilamida.

## **2.4 Prueba de inhibición y producción de AMPs**

Las pruebas de inhibición o también llamado difusión de agar por la formación de halo de inhibición en las placas de agar, se llevaron a cabo mediante el método modificado de Kirby-Bauer (Schoenknecht, 1973). Se realizaron en cajas Petri con medio BHI. Mediante una punta invertida de 1 mL de plástico se marcaron las circunferencias, donde se colocaron los sobrenadantes de las cepas, un control positivo Gibco™ Antibiótico-antimicótico y un control negativo con medio de producción sin bacteria. Se aplicaron 10 µl iniciales de los sobrenadantes y controles, esperando 30 minutos para su absorción, posteriormente se hizo la inoculación con las especies de *S. haemolyticus* y *S. aureus* en sus cajas respectivas, tomando una muestra con un hisopo de algodón de una caja petri de un crecimiento previó de las especies patógenas. Al finalizar se aplicaron otros 20 µl de cada sobrenadante sobre las circunferencias, un total de 30 µl por circunferencia. Una vez observada la absorción, se incubaron a 30° C durante 24 horas en una incubadora BOEKEL® Digital Incubator - 133730. Se evaluaron y midieron los diámetros de los halos de inhibición de los sobrenadantes de las cepas de *Bacillus*. La cepa con actividad fue seleccionada para para las técnicas de ultrafiltración mediante filtros de 10, 5 Y 3 KDa para obtener sus fracciones respectivas. Los filtrados se volvieron a probar mediante la misma técnica para la identificación del grupo activo en el cual se encuentran las moléculas con actividad inhibitoria con una reducción a 15 µl de fracciones. La obtención de la zona de inhibición (ZOI) fue en unidades de milímetros (mm). Las pruebas se realizaron por triplicado.

## **2.5 Prueba de efectos de sales en medio de cultivo para la producción de AMPs**

El medio Schaeffer es el medio comúnmente usado para la producción de metabolitos secundarios de *Bacillus* (Oludemi et al., 2022). En el laboratorio de microbiología molecular se ha modificado para aumentar la producción de otros metabolitos de interés. Las sales presentes en el medio son KCL, MgSO<sub>4</sub>,

FeSO<sub>4</sub>, NaSO<sub>4</sub>, MnCl<sub>2</sub>. La evaluación de los efectos de su presencia en el medio de cultivo Schaeffer, fue mediante la reducción porcentual en la preparación de los medios. Los medios de cultivos utilizados fueron: Schaeffer con sales normal, reducción del 50%, reducción del 25% y sin sales. La cosecha y producción fue mediante la misma técnica descrita en el subtema 2.2.1. Se cosechó los sobrenadantes y fueron puestos a prueba contra los aislados de *S. aureus* y *S. haemolyticus* con la técnica mencionada en el punto 2. 4. Las pruebas se realizaron por triplicado.

## **2.6 Prueba de efectos de oxigenación en cultivo para la producción de AMPs**

Se utilizó el medio Schaeffer normal sin modificaciones para la determinación de los efectos en la oxigenación del medio para el crecimiento de la cepa B2 de *Bacillus*. La inducción de oxigenación en el medio fue mediante agitación a una velocidad de 250 rpm de los matraces de cultivo. Se evaluaron 2 grupos de volúmenes diferentes de medio de producción, 200 y 30 mL con medio Schaeffer. De los cuales dos subgrupos se llevaron a cabo, cosecha y curva de crecimiento. En el subgrupo cosecha únicamente se realizó la obtención del sobrenadante de las 12 horas postinoculación y curva de crecimiento en el cual se realizaron lecturas mediante espectrofotómetro cada hora a partir de la segunda hora hasta llegar a la hora 12 postinoculación para la obtención de sobrenadante. Los sobrenadantes fueron sometidos a pruebas de difusión de agar, posteriormente fraccionados para la obtención de la fracción >3 KDa y analizados mediante HPLC. Las evaluaciones fueron realizadas por triplicado.

## **2.7 Obtención de fracciones de sobrenadante**

Las muestras de sobrenadante con mayor actividad se pasaron por filtros de celulosa Millipore-Amicon™ de 30, 10, 3 y >3 KDa de forma consecutiva (ultrafiltración) con la metodología del fabricante, mediante el uso una centrífuga (Eendorf® 5804-R). Las muestras filtradas de 3 y >3 KDa se volvieron a desafiar frente a los modelos patógenos en placas con medio BHI para confirmar su actividad con la misma técnica de la prueba de inhibición de sobrenadante.

## 2.8 Cuantificación de proteínas de fracciones de sobrenadante

Mediante la prueba de cuantificación de proteína con el método de Bradford, se analizaron las muestras de todas las fracciones correspondientes, así como la precipitación de sobrenadante crudo mediante el método de ácido tricloroacético (TCA). Una curva de calibración fue realizada previamente usando como control albúmina sérica bovina (BSA) a una concentración de 2.5 µg/ml a 15 µg/ml con un valor de coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de .998. Las muestras analizadas fueron: sobrenadante crudo sin fraccionar, fracción de 30 KDa, 10 KDa, 3 KDa y >3 KDa en una dilución 1:20 y ajustado al valor real en la gráfica de cuantificación de proteína. Las pruebas se hicieron por triplicado.

**Tabla 1.** Nomenclatura de fracciones obtenidas

Filtro y nomenclatura	Rango de pesos moleculares en fracción (KDa)
30	50-30
10	30-10
3	10-3
>3	>3

## 2.9 Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizante

Los pesos moleculares de las proteínas y péptidos de las fracciones provenientes del sobrenadante de la cepa seleccionada con actividad antimicrobiana, se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% (SDS-PAGE) de tipo desnaturizante. El dodecilsulfato sódico (SDS) es un detergente aniónico que se acompleja por absorción inespecífica a las proteínas y péptidos permitiendo así el flujo de las proteínas sobre una corriente eléctrica (Brunelle and Green, 2014)).

Los geles se diseñaron a un porcentaje de acrilamida al 15 % para la observación de proteínas menores a 20 KDa, como lo mencionan Brunelle and Green, 2014). Se utilizó beta-mercaptoetanol como agente reductor de los enlaces disulfuro y permitir la desnaturización de las proteínas y péptidos en las muestras. Los valores de reactivos para la preparación del gel concentrador y separador se mencionan en la siguiente tabla.

**Tabla 2** Reactivos utilizados para el diseño de geles de acrilamida

Reactivo	Gel Separador (15 % acrilamida)	Gel concentrador (4% acrilamida)
30% Acrilamida:0.8% Bis-acrilamida	7.5 mL	0.65 mL
<b>4x Tris-Cl/SDS</b> pH 8.5 - Gel separador pH 6.8 - Gel concentrador	3.75 mL	1.25 mL
H2Odd estéril	3.75 mL	3.05 mL
Persulfato de Amonio 10% (p/v)	70 µl	40 µl
TEMED	10 µl	8 µl

El gel se corrió a 30 Volts (V) durante 1 hora hasta que las muestras alcanzaron el inicio del gel separador, posteriormente se mantuvieron durante 3 horas a 75 V. Se utilizó como marcador de peso molecular el producto *Precision Plus Protein Dual Color Standards* (BIORAD).

Al finalizar el corrimiento del gel se realizó el revelado mediante tinción con nitrato de plata.

## 2.10 Tinción de proteínas con nitrato de plata AgNO<sub>3</sub>

Debido a las bajas concentraciones de las muestras obtenidas se seleccionó la tinción con nitrato de plata cuya sensibilidad permite la detección mínima de hasta 0.00025 µg de proteína en muestra (Chevallet et al., 2006). La detección de proteínas por tinción con plata es un método altamente sensible pero específico y selectivo para proteínas. Esto se debe a que la plata se une a las cadenas laterales o terminales químicas de los grupos amino, es decir, los grupos carboxilo y sulfhídrido. Produce una imagen con fondo reducido y menos interferencia de espectrometría de masas (Chevallet et al., 2006).

La metodología fue la siguiente. Se colocó el gel en una solución de ácido acético al 10% durante 20 minutos. Posteriormente dos lavados con agua destilada. Una incubación en Tiosulfato de Sodio al 0.02% durante un minuto. Lavados con agua destilada. Inmediatamente se aplicó nitrato de plata al 0.1% durante 20 minutos a 4°. El gel fue lavado con agua destilada. Una vez terminado los lavados se aplica carbonato



de sodio al 2 % activado con formaldehído al 37%. Se aplicó la solución en pequeños volúmenes hasta obtener la resolución deseada del gel. Al finalizar desechar la solución y aplicar solución de conservación de ácido acético al 5%.

### **2.11 Ensayos de digestión por proteasas**

Se aplicaron las proteasas Tripsina (0.03 mg/ml) y proteínasa K (0.03 mg/ml) a un volumen de 200 µl de las fracciones de 3 KDa y >3 KDa para evaluar la estabilidad y actividad de las mismas. Posterior a la aplicación de las proteasas, se mantuvieron en incubación a 37° durante 3 horas y se realizó la prueba de inhibición mediante el método mencionado en el apartado 2.3. Se midieron y compararon los halos de inhibición (ZOI). La prueba se realizó por triplicado y el control fue el sobrenadante libre de proteasas incubadas a la misma temperatura.

### **2.12 Cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC).**

Debido a las características generales de los péptidos antimicrobianos, estos cuentan con regiones hidrofóbicas ocasionado por la presencia residuos de aminoácidos con estas características. Una de las técnicas más utilizadas para la purificación de AMPs es mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC). Utiliza como fase estacionaria una columna con características hidrofóbicas no polares, y una fase móvil con solventes de polaridad media a alta como Metanol, Etanol o Acetonitrilo.

Las analizó la fracción >3 KDa que mostró actividad y que se asocian a pequeños péptidos antimicrobianos de clase II subtipo 3. La fracción se aplicó en un sistema RP-HPLC, utilizando una columna Agilent C8 (150 mm×2.6 mm), equilibrada con Buffer A (H<sub>2</sub>O, que contiene 0.25 % TFA).

La adición de TFA se utiliza como agente de separación de iones en la cromatografía de fase inversa para mejorar la forma y la resolución de los picos. La elución se realizó gradiente de un paso de 50 a 80% de solución B (Acetonitrilo con 0.01 % de TFA) a un flujo de 0.250 ml/min<sup>-1</sup>. La absorción ultravioleta que se utilizó para la detección fue 280 y 214 nm.

### 2.13 Correlación inhibición-concentración

Las lecturas proporcionadas por las absorbancias en los análisis de HPLC permiten relacionar el área con la concentración. Sin embargo, las lecturas que más se han utilizado para la relación de inhibición y concentración son las reportadas por la cuantificación y los halos de inhibición (Dolashki et al., 2020).

Los valores en milímetros de las pruebas de inhibición fueron multiplicados por los valores de cuantificación de proteínas ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ):

$$\text{Correlación I-C} = \text{Inhibición (mm)} * \text{Concentración}(\mu\text{g}/\text{mL})$$

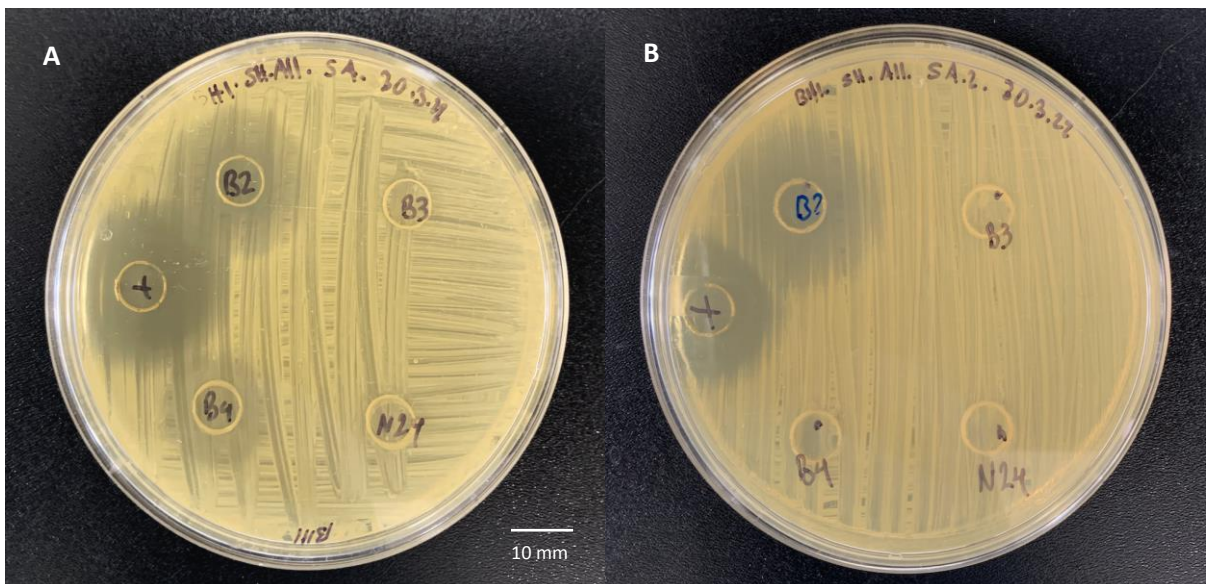
### 2.14 Estadística

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. Los datos fueron analizados a través de un análisis de varianzas (ANOVA) a través del software Prism9 GraphPad. Los valores de  $P < 0.05$  fueron considerados significativos como lo indica la literatura. Los análisis comparativos fueron realizados mediante prueba Dunnet. Compara las medias de varios grupos experimentales con el medio de un grupo control para observar la diferencia. La prueba Dunnet fue realizado después de ejecutar ANOVA para identificar los pares con diferencias significativas.

## Capítulo 3. Resultados

### 3.1 Obtención de cepa de *Bacillus* con actividad inhibitoria contra especies patógenas del género *Staphylococcus*

Los sobrenadantes obtenidos de las cepas de *Bacillus* B2, B3, B4 Y N24 fueron analizados mediante el método difusión de agar. Los sobrenadantes B3 y N24 no mostraron halo de inhibición contra los modelos patógenos. El sobrenadante de la cepa B4 mostró actividad únicamente contra la especie *S. haemolyticus*, sin embargo, no mostró actividad contra *S. aureus*. Los efectos en el crecimiento del patógeno provocado por la cepa B4 no son comparables con la cepa B2, cuya actividad se observa comparable con el control de antibiótico (Streptomycin 10000µg/ml; Penicilina 10000 µg/ml). Además, el sobrenadante B2 muestra actividad contra ambas especies con un valor ZOI (*Zone of inhibition*) promedio de 23 mm para *S. aureus* y 27 mm para *S. haemolyticus* (Figura 9). Las características de compuestos antimicrobianos producidos por *Bacillus* de las cepas evaluadas, muestran especificidad contra patógenos y particularmente contra especies del mismo género bacteriano.

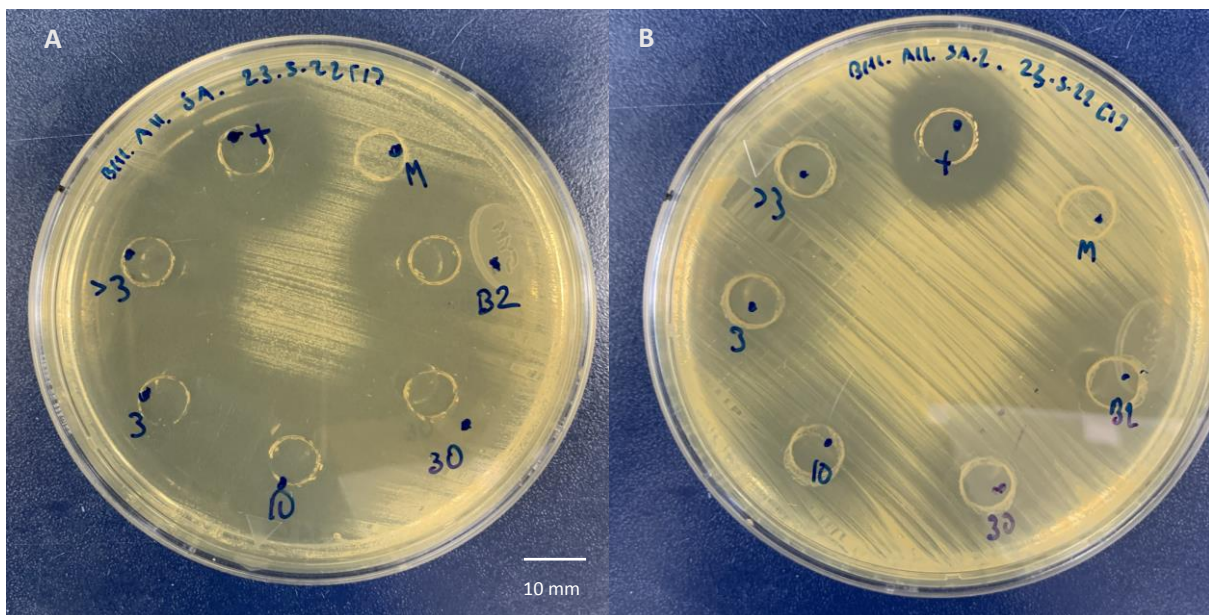


**Figura 9.** Actividad de sobrenadante de cepas de *Bacillus* B2, B3, B4 y N24 contra *S. haemolyticus* (A) y *S. aureus* (B). Control positivo (+): Gibco™ Antibiótico-antimicótico.

### 3.2 Evaluación de las fracciones de sobrenadante contra *S. aureus*

Las evaluaciones de las cepas de *Bacillus* permitieron identificar a la cepa B2 como mejor candidato a las siguientes pruebas, debido a su acción inhibitoria contra ambos modelos patógenos. Las siguientes pruebas de fraccionamiento fueron utilizando el sobrenadante de la cepa B2. Las fracciones fueron evaluadas y puestas a prueba de nuevo contra de *S. aureus* y *S. haemolyticus*. Todas las fracciones mostraron actividad inhibitoria del patógeno (Figura 10). Es importante mencionar que las fracciones agrupan moléculas respecto a sus filtrados, por ejemplo, la fracción de 10 KDa corresponde a moléculas que agrupan de 10 KDa a 30 KDa (Veáse Tabla 2).

Las pruebas de inhibición de las fracciones fueron comparadas con el control positivo Gibco™ Antibiótico-antimicótico; Streptomycin 10000µg/ml; Penicilina 10000 µg/ml y el control negativo compuesto por medio de crecimiento Schaeffer. La especie *S. haemolyticus* muestra una mayor sensibilidad a las fracciones que *S. aureus*. El control negativo no evidenció actividad inhibitoria, por lo que se descarta que la actividad sea debido a las características del medio de crecimiento de la bacteria y que la actividad es debido a la producción de biomoléculas activas de la cepa B2.



**Figura 10.** Actividad de fracciones 30, 10, 3 y >3 KDa de *Bacillus* B2 contra *S. haemolyticus* (A) y *S. aureus* (B). Control +: Gibco™ Antibiótico-antimicótico: Streptomycin 10000µg/ml; Penicilina 10000 µg/ml, Control negativo (M): medio de producción sin bacteria. Fracciones 30, 10, 3 y >3 KDa.

### 3.3 Efecto de la oxigenación en el medio de cultivo.

La inducción de oxígeno en el medio de producción de AMPs son evaluaciones poco caracterizadas en la literatura. Sin embargo, debido al nicho ecológico de la cepa de *Bacillus*, es posible que el efecto del oxígeno pueda estimular o reprimir la producción de ciertos metabolitos de interés. En los siguientes resultados se evidencia que los cultivos con volúmenes de 30 mL producen una mayor cantidad de AMPs observándose un halo de inhibición mayor (Figura 11). Dentro de los cultivos del subgrupo, los que no fueron manipulados durante el crecimiento (cosecha) tuvieron un mayor efecto inhibitorio contra ambos modelos patógenos comprado con aquellos que fueron muestreados durante el crecimiento de la cepa B2 (curva). La diferencia de volúmenes y tamaño de matraces tiene una estrecha relación con la capacidad de flujo de oxigenación en el medio, a esto se le ha denominado Velocidad de transmisión de oxígeno o *Oxygen Transfer Rate* (OTR) por sus siglas en inglés, siendo los matraces de diámetro de gran tamaño, los que tienen una mayor presencia de moléculas de oxígeno debido al área que tiene el líquido para distribuirse en el matraz y por consiguiente, un aumento en la presencia de oxígeno. Los resultados muestran una posible estimulación en la producción de AMPs en volúmenes de 30 mL en un flujo de oxígeno reducido y una represión en la producción en matraces con volúmenes mayores con un flujo de oxígeno elevado (Figura 11: análisis comparativo de subgrupos\*).

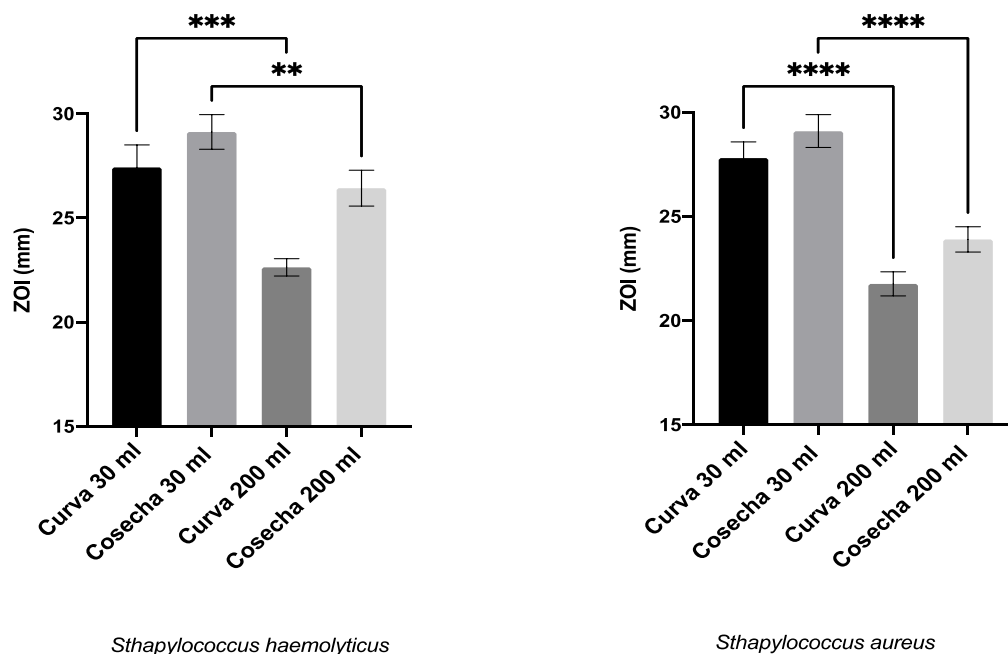


Figura 11. Efecto de la oxigenación en el medio de producción del cultivo de la cepa B2 de *Bacillus*..

### 3.4 Cuantificación de proteínas de las fracciones de sobrenadante

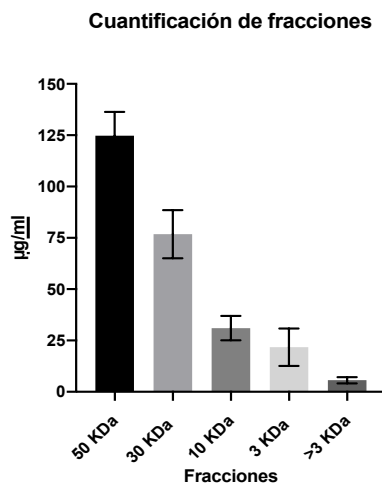
Mediante la prueba de cuantificación de proteína con el método de Bradford, se analizaron las fracciones obtenidas del sobrenadante de la cepa B2. Se incluyó también la cuantificación de precipitación de proteínas con el método de ácido tricloroacético (TCA). Las evaluaciones corresponden a la cuantificación de 1 mL de muestra de sobrenadante. El reactivo de Bradford permite la interacción del agente Coomassie® Azul brillante G 250 con los aminoácidos arginina, histidina y lisina en una interacción no covalente. La intensidad del cambio de color de café a azul es proporcional a las proteínas o péptidos en la muestra. Las evaluaciones fueron analizadas con una curva de estandarización de albúmina sérica bovina (BSA). La muestra de precipitación TCA tiene una concentración de proteínas 115.95 µg/ml. Esta muestra incluye todas las proteínas en 1 mL de sobrenadante B2 filtrado únicamente a 50 KDa. La concentración de las fracciones disminuye conforme al procesamiento de ultrafiltrados. Sin embargo, las fracciones de 3 y menores de 3 KDa muestran una concentración promedio de 14.24 y 7.2 µg/ml respectivamente. Ambas fracciones han mostrado actividad en las pruebas de inhibición de placa. Existen presencia de péptidos en la fracción menor de 3 KDa con base en los datos de cuantificación obtenidos (Figura 12).

Es importante mencionar que los siguientes experimentos se realizaron utilizando las fracciones 3 y >3 KDa, debido al objetivo de identificar péptidos de la clase II subtipo 3 de pequeño peso molecular. Los valores de concentración de las fracciones reflejan una alta actividad de las moléculas con actividad inhibitoria comparado con la concentración del antibiótico (Streptomycin 10000µg/ml; Penicilina 10000 µg/ml) cuya concentración es mayor para tener una actividad observable.

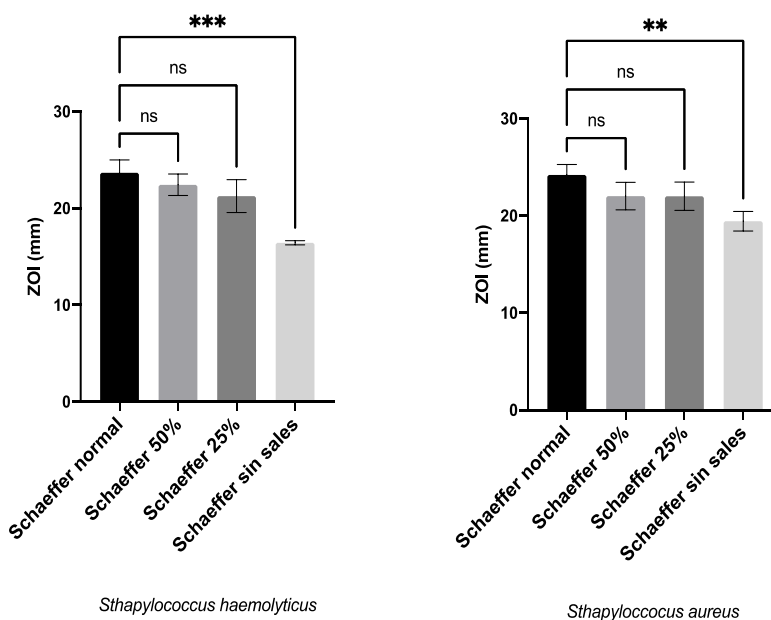
### 3.5 Evaluación de sales en medio de cultivo

La evaluación de presencia sales en el medio de crecimiento Schaeffer permitió identificar el medio adecuado para la mayor producción de péptidos antimicrobianos de *Bacillus B2*, además de probar la estabilidad de los péptidos con sales presentes en el medio de cultivo, algunos artículos han relacionado una reducción en su actividad debido a la presencia de sales (Kandasamy y Larson, 2006; Xian et al., 2022). La actividad antimicrobiana se presenta en todos los sobrenadantes contra *S. aureus* y *S. haemolyticus*, lo que demuestra una tolerancia a sales por parte de los compuestos producidos por la cepa B2. La presencia de sales en el medio de cultivo estimula la producción de péptidos por parte de la cepa B2 (Schaeffer normal), la reducción al 50 y 25 % de sales tiene una tendencia de reducción en la zona de inhibición. Halos

de inhibición promedio de 25 mm son observados en Schaeffer normal, mientras que en Schaeffer sin sales un promedio de 15 mm. La ausencia de sales muestra una reducción significativa comparada contra el medio con sales del medio normal desarrollada en el laboratorio de microbiología molecular (Figura 13). El patrón de reducción del diámetro de inhibición tiene una tendencia similar a la reducción de sales en los diferentes medios de cultivos evaluados.



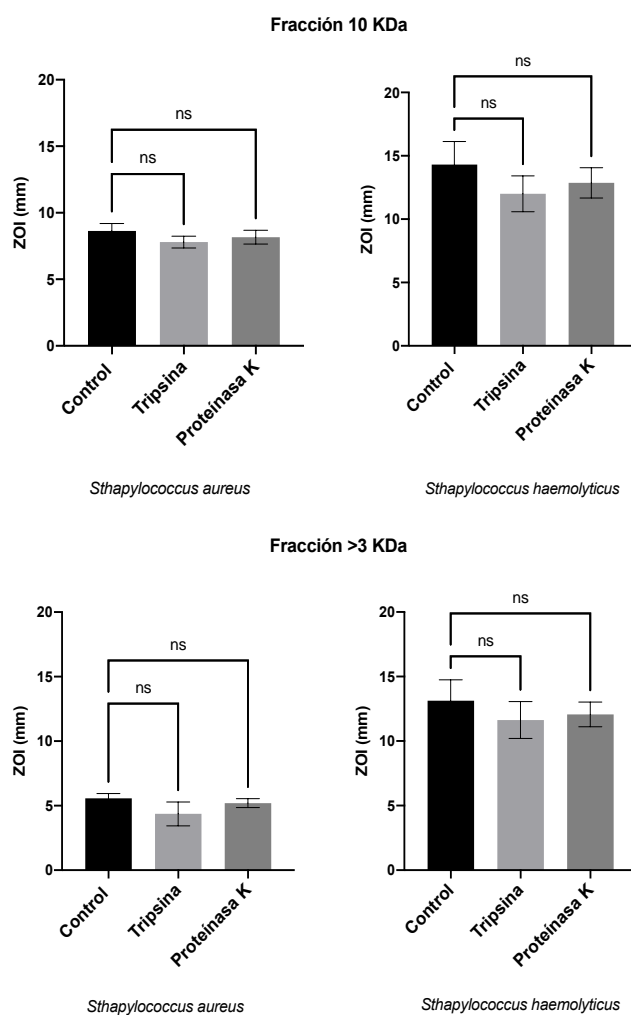
**Figura 12.** Concentración de proteínas en fracciones 50, 30, 10, 3 y >3 KDa de sobrenadante cepa B2.



**Figura 13.** Efecto de sales en medio de crecimiento bacteriano en la producción de AMPs. Significancia \* determinada por prueba de comparación estadística Dunnet.

### 3.6 Digestión de fracciones por proteasas

Algunos AMPs producidos por cepas de *Bacillus* tienen una alta resistencia a digestión por proteasas. Debido a esto se realizó la prueba de digestión para analizar la estabilidad de las fracciones menores (Choyam et al., 2021). Se realizó la aplicación de tripsina y proteinasa K a una concentración de 0.03  $\mu\text{g/ml}$ . Las muestras digeridas mostraron una reducción mínima en la actividad inhibitoria en una incubación de 3 horas con las proteasas. Sin embargo, no hay una reducción significativa en la inhibición de *S. aureus* y *S. haemolyticus* (Figura 14). Los resultados de los péptidos de bajo peso molecular producidos por la cepa B2 de *Bacillus* muestran actividad inhibitoria contra *S. aureus* y *S. haemolyticus* a pesar de la presencia de las dos proteasas, además, la incubación a una temperatura de 37° no redujo la actividad de las fracciones por lo que existe una termoestabilidad, similar a la observada en la temperatura corporal humana.



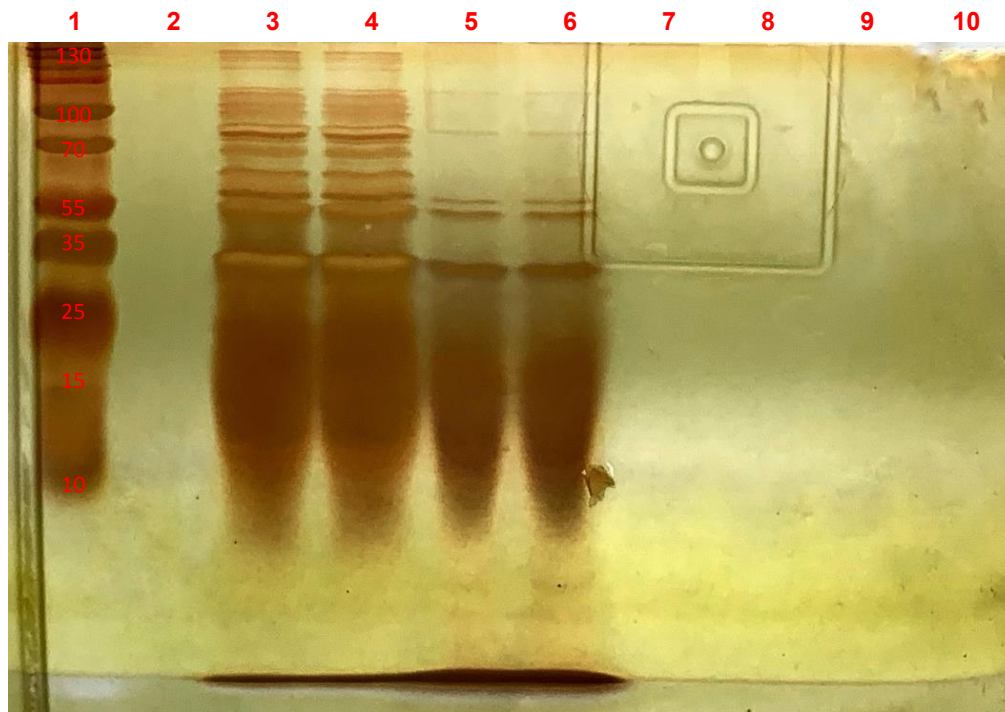
**Figura 14.** Efecto de proteasas tripsina y proteinasa K en fracciones de 10-3 KDa y >3 KDa contra *S. haemolyticus* y *S. aureus*.



### 3.7 Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

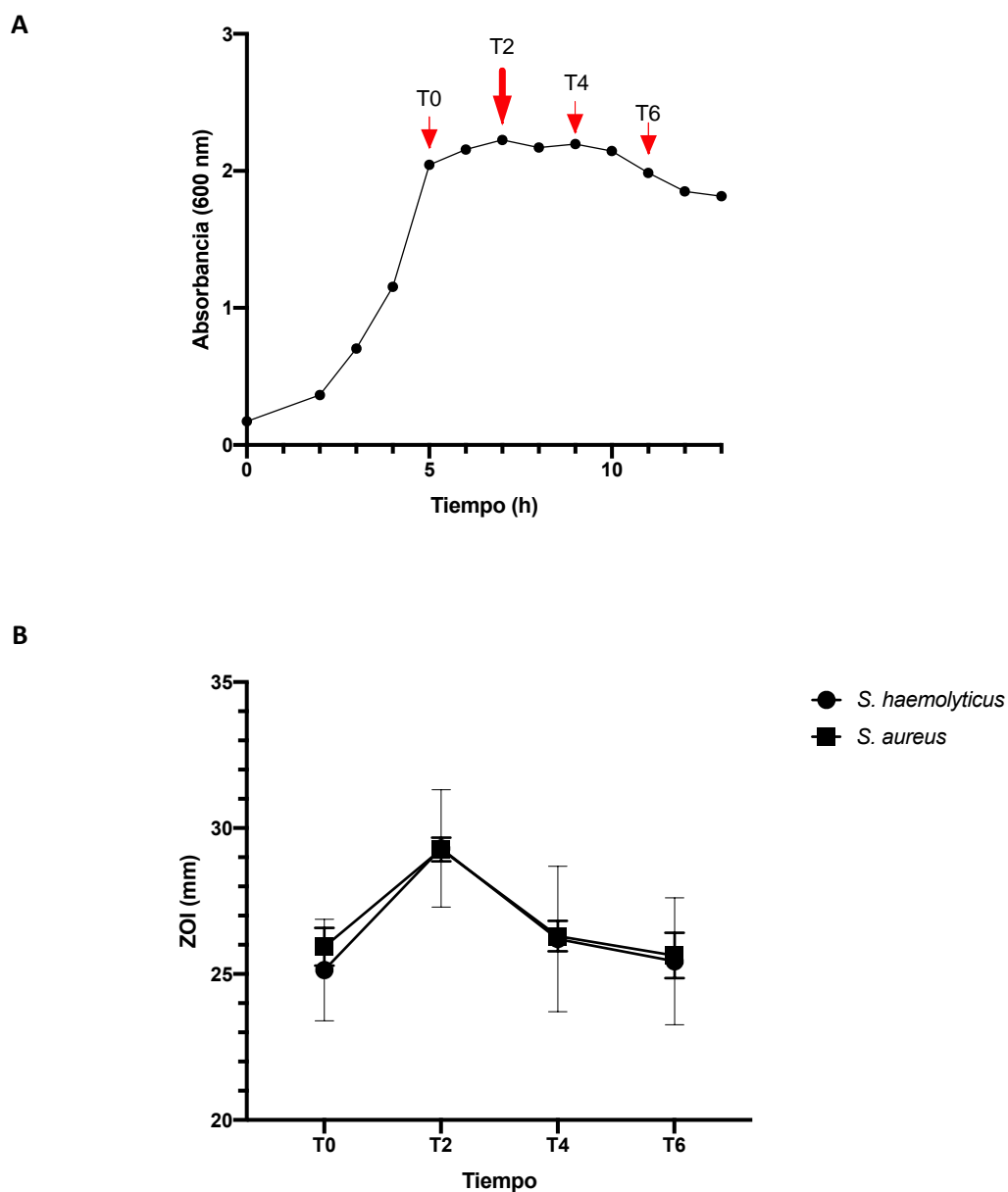
Las muestras de fracciones filtradas a 50, 30, 10, 3 y >3 KDa fueron evaluadas en un gel de poliacrilamida al 15% para observar las proteínas y péptidos en las muestras. Las bandas observadas en las muestras permiten distinguir la mezcla compleja de proteínas producidas por la cepa B2 de *Bacillus*. De igual manera bandas menores de 10 KDa se evidencian comparando con el marcador de peso molecular de menor peso.

Se utilizaron filtros AMICON® de mayor volumen de procesamiento; 15 ml; esto permite el fraccionamiento de mayores cantidades de muestra, los MWCO son de 50, 30 y 5 KDa. La fracción obtenida de 5 KDa fue fraccionada nuevamente mediante AMICON de 2 mL de procesamiento de MWCO de 3 KDa. Las fracciones obtenidas fueron entonces fracciones que corresponden de 50-30 KDa, 30-5 KDa, 5-3 KDa, >3 KDa (Figura 15). La fracción >3 fue evaluada con prueba de difusión de agar para verificar la actividad antimicrobiana contra SA y SH. De igual forma se realizó la cuantificación de las fracciones obtenidas con los filtros AMICON® de 15 ml. Los valores de cuantificación tienen una tendencia similar a las obtenidas en las fracciones previas con los filtros AMICON® de 2 ml.



**Figura 15.** Gel de poliacrilamida 15 % (SDS-PAGE) fracciones del sobrenadante cepa B2. Carril 1: marcador de peso molecular (KDa), carril 2: control negativo, carriles 3-4: fracción 50-30 KDa, carriles 5-6: fracciones 30-5 KDa, carriles 7-8: fracción 5-3 KDa, carriles 9-10: fracción >3 KDa.

La fracción que corresponde de 30-5 KDa se observan dos bandas tenues, que de igual forma están por debajo del último marcador de peso molecular (Figura 14, carril 5:6). La presencia de esta banda se puede observar de forma muy tenue en los otros carriles que corresponden a pequeños péptidos presentes en las muestras. Sin embargo, no se pudieron visualizar bandas claras en las fracciones >3 KDa. Posiblemente por corrimiento o salida de la muestra del gel ocasionada por péptidos de un peso molecular menor que azul de bromofenol (.668 KDa). Para verificar la presencia de péptidos de la fracción se realizaron posteriormente el análisis mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución de fase reversa (RP-HPLC).



**Figura 16.** A) Curva de crecimiento y tiempo de muestreo (marcas rojas) de *Bacillus* B2. B) Actividad inhibitoria de tiempos de muestreo contra *S. aureus* y *S. haemolyticus*

### 3.8 Curva de crecimiento de cepa *Bacillus* B2 y determinación de producción máxima de AMPs.

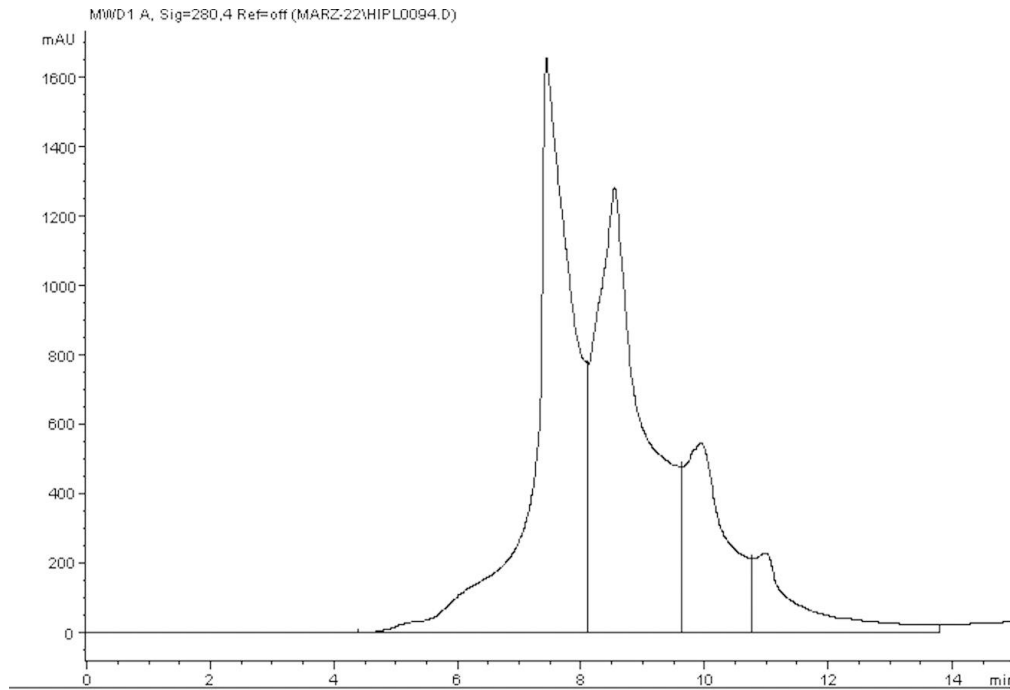
Para conocer los tiempos de producción máxima de las moléculas con actividad inhibitoria, se desarrolló la curva de crecimiento de la cepa B2. Alcanzando una absorbancia máxima de 2.2. La curva mantiene la tendencia teórica de una curva bacteriana de crecimiento, el patrón de la réplica siguió el mismo comportamiento. Los experimentos fueron realizados por su réplica experimental y fueron obtenidas 4 muestras para su análisis y determinación al inicio de la fase estacionaria (Figura 16: marcas rojas).

Las muestras de los sobrenadantes obtenidos indicaron que la producción máxima de los AMPs es cercana al inicio de la fase estacionaria. La muestra T2 tiene un aumento en la actividad en las pruebas de difusión de agar, las pruebas fueron realizadas por triplicado. Esta actividad de la muestra T2 se presenta en *S. aureus* y *S. haemolyticus* (Figura 15B).

### 3.9 HPLC Fase inversa (RP-HPLC)

Debido a que el objetivo del estudio es la obtención de péptidos antimicrobianos de la clase 2 subtipo 3, menores a 3 KDa. Se realizaron análisis de cromatografía líquida de alta resolución fase reversa (RP-HPLC) con las fracciones menores de 3 KDa con actividad antimicrobiana. Los análisis fueron desarrollados mediante el empleo de una columna C8. Aunque se realizaron diversas modificaciones en los protocolos usando metodologías utilizadas para péptidos antimicrobianos, fue imposible la separación de los picos observados en el patrón de la muestra la fracción analizada. La separación de los picos permite el análisis individual de los picos en los tiempos de retención, para su posterior recolección y prueba de difusión de agar. Sin embargo, al evaluar diferentes gradientes de porcentaje de solvente B (Acetonitrilo) los picos no se lograron separar.

Debido a las limitaciones técnicas para el empleo de columnas que permitieran una mayor resolución de péptidos menores de 3 KDa, como columnas C18 como lo indica la literatura. Los siguientes resultados fueron la obtención de firmas de cromatogramas obtenidos de la fracción >3 KDa con actividad. Se observaron 4 picos en la fracción, de los cuales, existe un pico mayor, y 3 picos coeluidos. Los tiempos de retención para el pico mayor oscila en promedio en 7.30-7.50 minutos a un flujo de .250 en un gradiente de 50-90% de ACN.



**Figura 17.** Cromatograma de fracción >3 KDa de *Bacillus* B2.

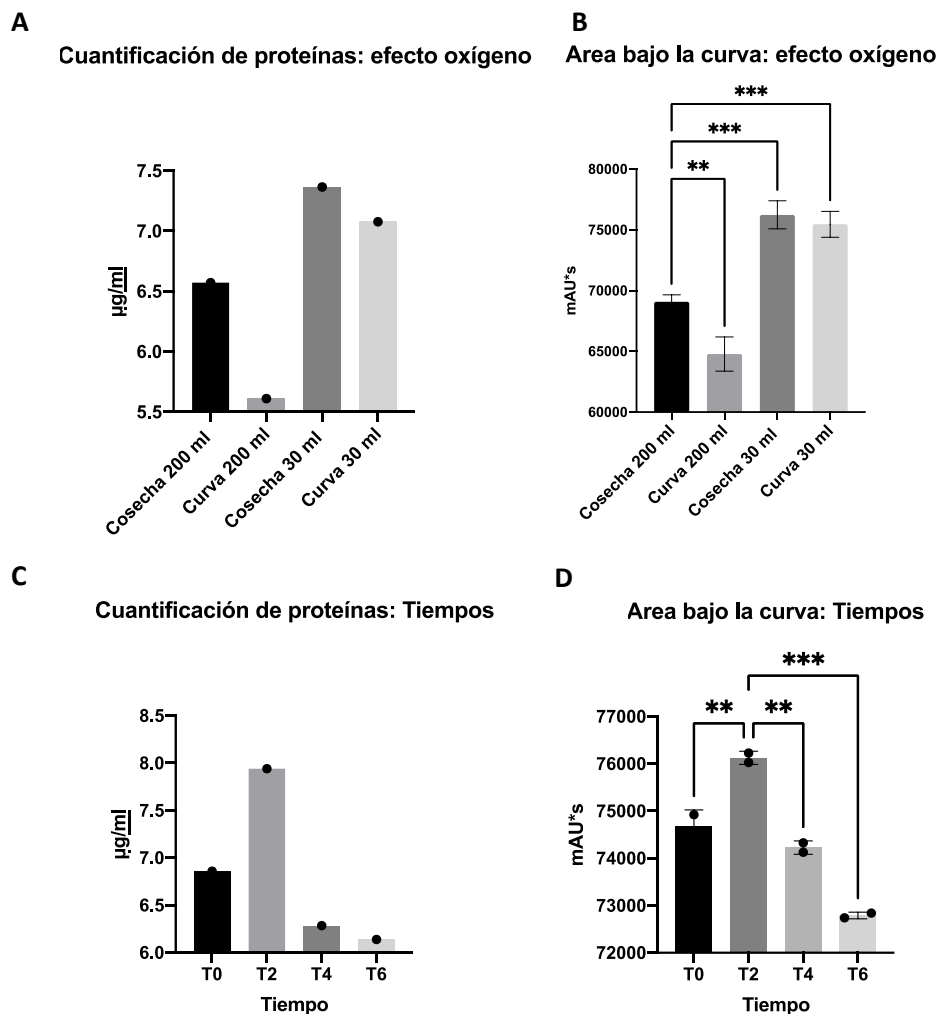
El área bajo la curva representa un valor teórico con respecto a la absorbancia y el tiempo de retención de las moléculas. Los valores obtenidos del pico mayor fueron analizados y comparados con las fracciones >3 KDa provenientes de los experimentos de efectos de oxigenación y tiempos de muestreo en la curva de crecimiento de la cepa B2 de *Bacillus* (Figura 18). Los resultados fueron comparados y correlacionados con dos experimentos, prueba de difusión de agar (Figura 16B), y cuantificación de proteínas.

Los datos obtenidos indican un aumento significativo en la producción de AMPs en la T2, siendo la muestra que obtuvo un mayor halo de inhibición y una mayor cantidad de proteínas en los experimentos mencionados (Figura 18 A,B). Posteriormente hay una reducción en su presencia conforme avanza el tiempo, siendo la T6 la muestra que mostró una tendencia a reducción según lo indica la gráfica lineal.

Se obtuvieron las lecturas del valor de área bajo la curva para comparar con los resultados de cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford. Las fracciones >3 KDa obtenidas del experimento de efecto de oxígeno mostraron una relación respecto a la concentración en  $\mu\text{g}/\text{ml}$  con los valores de absorbancia  $\text{mAU} \cdot \text{s}$ . Como se mencionó previamente, los cultivos realizados en volúmenes menores 30 mL existe una menor velocidad de transferencia de oxígeno (OTR) y tienen una mayor concentración de péptidos asociados a sus halos de inhibición observados. Los valores de concentración

en cultivo de volúmenes de 30 mL están en valores de 7.2-7  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en promedio, mientras que los cultivos en volúmenes de 200 mL van de 6.5-5.  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . El área bajo la curva de los cultivos de 30 mL, oscila en los valores de 75 000 mAU\*s, y los volúmenes de 200 en los 6900 mAU\*s (Figura 18 C,D).

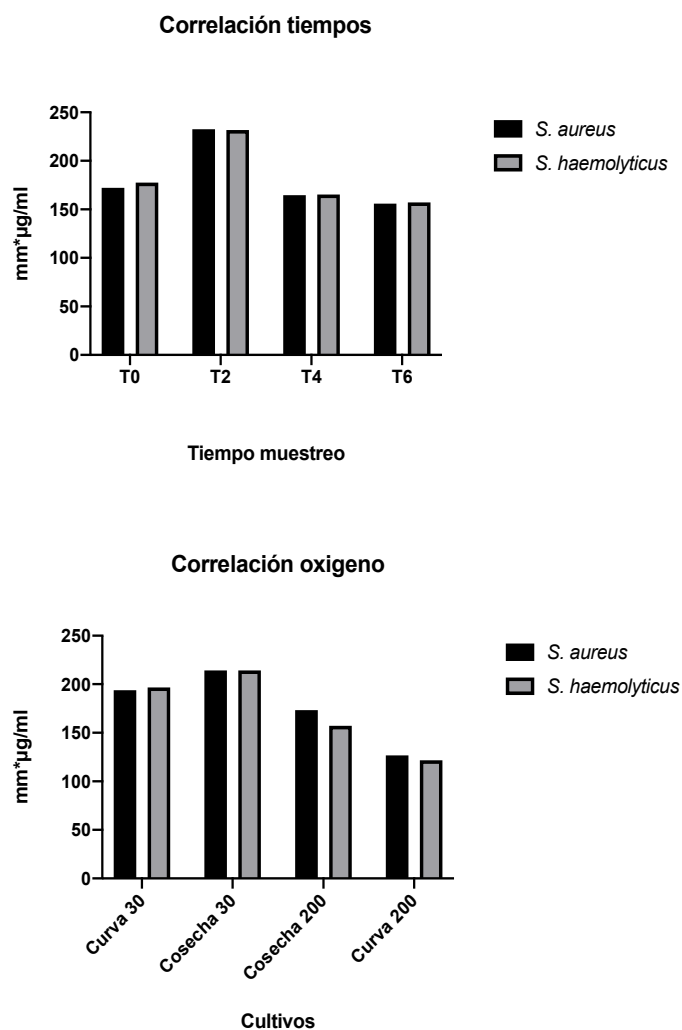
De igual manera hay un aumento en la concentración en aquellos matraces que no fueron manipulados previo a la cosecha del sobrenadante (subgrupo cosecha). Los matraces de curva de crecimiento muestran una reducción en la concentración de péptidos, aproximadamente 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de diferencia con los matraces de cosecha para los volúmenes de 200 ml. Y .5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de diferencia entre los matraces de volumen de 30 mL entre los subgrupos cosecha vs curva de crecimiento.



**Figura 18.** Análisis comparativo de efectos de oxígeno y tiempos de muestreo en la producción de AMPs de la fracción >3 KDa. A) Cuantificación de proteínas mediante método Bradford de cultivos de evaluación de efectos de oxígeno B) Área bajo la curva del pico mayor de los cultivos de evaluación de efectos de oxígeno obtenido mediante HPLC. C) Cuantificación de proteínas de tiempos de muestreo de curva de crecimiento. D) Área bajo la curva de muestras de tiempos de muestreo.

### 3.10 Correlación concentración-inhibición

Las lecturas proporcionadas por las absorbancias en los análisis de HPLC permiten relacionar el área con la concentración. Sin embargo, las lecturas que más se han utilizado para la relación de inhibición y concentración son las reportadas por la cuantificación y los halos de inhibición (Dolashki et al., 2020). Los resultados tienen el mismo patrón que los experimentos anteriores. La fracción >3 KDa de la cepa B2 de *Bacillus* tiene una mayor producción en la muestra T2, dos horas después del inicio de la fase estacionaria, y gradualmente se presenta una reducción en su actividad contra ambas especies patógenas utilizadas (Figura 19A). Los cultivos en volúmenes de 30 mL tienen una mayor producción de péptidos antimicrobianos que los volúmenes de 200, posiblemente relacionado al flujo de oxígeno presente en los medios de cultivo. Los cultivos que no son interrumpidos (cosecha) tienen una mayor producción de péptidos mostrados en su actividad inhibitoria en las pruebas de difusión (Figura 19B).



**Figura 19.** Relación concentración de péptidos con halos de inhibición. Unidades en mm\*µg/ml.

## Capítulo 4.      Discusión

---

La dinámica ecológica de microorganismos como levaduras y bacterias se ve reflejado en sus mecanismos de adaptación que a lo largo del tiempo han desarrollado durante su evolución (L. J. Zhang y Gallo, 2016). Desde su capacidad para sobrevivir a ambientes extremos o colonizar distintos tipos de ambientes, como suelos, mantos acuíferos o tejidos de otros organismos superiores. La producción de biomoléculas que eliminen o impidan el crecimiento de otros microorganismos es una de las capacidades que diversas bacterias han mostrado, la cual se ha asociado principalmente con la producción de AMPs (Huan et al., 2020; Simons et al., 2020).

Las cepas evaluadas comprenden a aislados provenientes de muestras ambientales, todas ellas identificadas como *Bacillus subtilis* (Leonel Ochoa-Solano y Olmos-Soto, 2006). Las pruebas de difusión de agar sugieren a la cepa B2 y B4 como ¿microorganismos con la capacidad de producir compuestos antimicrobianos? Sin embargo, la cepa B2, únicamente, tiene actividad *contra S. aureus y S. haemolyticus*, mientras que la cepa B4, únicamente *contra S. haemolyticus*. Diferentes cepas de *Bacillus* han mostrado una enorme variedad de AMPs que están relacionados con sus nichos ecológicos (L. J. Zhang y Gallo, 2016). Los AMPs tienen características particulares, incluyendo una alta especificidad contra especies que pertenezcan inclusive al mismo género como *Staphylococcus* (Haney et al., 2017; Mercer et al., 2020). La mayoría de los AMP producidos por *Bacillus* son de tipo anfipáticos con carácter catiónicos e hidrofóbicos (regiones polares y no polares) provocado por residuos con carga positiva, tales como histidina, arginina y lisina y con regiones hidrofóbicas debido a la presencia de residuos de alanina, valina, leucina o prolina (Abriouel et al., 2011). Alrededor del 50% de los aminoácidos que constituyen a los AMPs son hidrofóbicos (Nakano y Zuber, 1990). La carga positiva de los residuos permite la interacción con las cargas negativas que tienen la mayoría de los microorganismos en su membrana celular. Las regiones hidrofóbicas por su parte, interactúan con la doble membrana, provocando así la inserción por mecanismos de interacciones hidrofóbicas (Mercado y Olmos, 2022). Aunque es un patrón asociado a los péptidos, la especificidad es ocasionada por el plegamiento local asociado a las secuencias de los AMPs (Huan et al., 2020). El mecanismo de acción no solo se reduce a la generación de poros en la membrana celular, sino también a la inhibición de rutas metabólicas, como la inhibición en la síntesis de la pared celular de algunas células (Kumar et al., 2018).

Como se mencionó, la producción de los AMPs tiene una función relevante que a lo largo de la evolución ha permitido la defensa y competencia de nutrientes de los microorganismos productores, contra otros

que pudieran aprovechar las fuentes de carbono (L. J. Zhang y Gallo, 2016). Las limitaciones nutricionales, así como factores físicos como el pH, la oxigenación y temperatura, estimulan procesos de *Quorum sensing* que es el mecanismo de la regulación de la expresión génica de microorganismos en respuesta a las fluctuaciones en la densidad de población celular (Kaspar et al., 2019). Estas limitaciones se ven reflejadas en la producción de diversos metabolitos de interés, principalmente aquellos que permitan la supervivencia de las bacterias, por ejemplo, en la síntesis de AMPs (Turovskiy et al., 2007). Se ha descrito en *bacterias ácido lácticas* (LAB) que la producción de bacteriocina es controlada una manera dependiente de la densidad celular, utilizando una feromona peptídica secretada para la detección de Quórum en medios de cultivo restrictivos nutricionalmente (Eijsink et al., 2002).

Solo algunos reportes han utilizado medio de esporulación o también llamado medio Schaeffer para bacterias del género *Bacillus*. El medio empleado en la presente investigación tiene como base de fuente de carbono *nutrient broth* pero con la adición de otras sales como KCL, MgSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, NaSO<sub>4</sub>, MnCl<sub>2</sub> (Olmos et al., 2020; Olmos y Paniagua-Michel, 2014). Este medio fue desarrollado para la producción de esporas de *Bacillus* pero también se ha observado como un medio eficaz en la producción de AMPs (Olmos et al., 2020; Olmos y Paniagua-Michel, 2014). Al ser la esporulación un mecanismo de resistencia a limitaciones nutricionales y factores físicos limitantes, el medio induce también la producción de metabolitos secundarios, por ejemplo, AMPs como mecanismo de defensa y adaptación por parte de las bacterias (J. Zhang et al., 2022). Poco se ha descrito sobre los efectos del medio de cultivo y factores ambientales que influyen en la producción de AMPs por parte de las bacterias, lo cual está estrechamente relacionado con la densidad celular (Mercado y Olmos, 2022). La selección del medio de cultivo permite la producción de diferentes metabolitos de interés. Para la producción de AMPs principalmente se ha usado medios de cultivo con fuentes de carbono alternativas a glucosa, siendo usado mayormente el medio de cultivo a base de *nutrient broth*, cuya fuente de carbono es provista de proteínas provenientes de extracto de carne, extracto de levadura, peptona y la sal cloruro de sodio. Al no ser glucosa la principal fuente de carbono en aquel medio, estos son comúnmente restrictivos desde una perspectiva nutricional, lo cual estimula la esporulación y producción de metabolitos secundarios (Muhammad et al., 2015). Se han desarrollado modificaciones, como adición de sales inorgánicas o adición, reducción o ausencia de otras fuentes de carbono (Muhammad et al., 2015). Algunos autores han desarrollado medios exclusivos para el crecimiento de ciertas bacterias, como el medio Man, Rogosa y Sharpe (MRS) cuyas características permiten el crecimiento selectivo de bacterias del género *Lactobacillus* y, además, aumento en la producción de AMPs (Modiri et al., 2021). Otros medios como medio de soya tripticasa, medio Mueller Hinton Broth (M-H Broth) o inclusive medios de cultivo de células mamíferas como el medio Roswell Park



Memorial Institute (RPMI) han mostrado una alta estabilidad de AMPs contra bacterias como *S. aureus* y *P. aeruginosa* (Mercer et al., 2020; Schwab et al., 1999).

En la presente investigación evidenciamos que el medio Schaeffer normal, con presencia de sales, presenta una mayor producción de AMPs (Figura 13), la reducción de sales reduce significativamente la producción de AMPs, esta observación está relacionada con la estimulación de la esporulación debido a la presencia de las sales presentes en el medio de cultivo. Algunos autores han descrito la importancia de las sales inorgánicas en la formación de esporas. La adición de sales inorgánicas al medio, como altas concentraciones de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , estimulan la formación de esporas de *Bacillus subtilis* (Hageman et al., 1984). La adición de  $\text{MgSO}_4$  ha mostrado ser la sal inorgánica que tiene un efecto mayor en la densidad total de colonias y esporas. Esto puede estar relacionado con el hecho de que  $\text{Mg}^{2+}$  puede estabilizar el complejo de ribosomas, que puede cambiar la sensibilidad de las bacterias a las limitaciones nutricionales mediante mecanismos aún no caracterizados (Nierhaus, 2014; Tian et al., 2022).

Las evaluaciones de los efectos de sales en el medio de cultivo Schaeffer (Figura 13) mostraron que, además de ser un medio efectivo en la estimulación de la producción de AMPs, también presentan tolerancia a sales, que se refleja en la estabilidad del sobrenadante producido por la cepa B2. Se ha relacionado también los efectos de sales; específicamente de iones de tipo cationes (carga positiva), influyen en la estabilidad y acción de AMPs (Kandasamy y Larson, 2006). La presencia de algunos cationes monovalentes como  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  y divalentes como  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  a concentraciones superiores de 500 mM, inhiben la acción del péptido tanatina proveniente del insecto hemíptero *Podisus maculiventris* contra *E. coli* (Wu et al., 2008). La interacción del péptido y la membrana bacteriana es un paso crítico para la acción de AMPs, la presencia de cationes puede evitar que los péptidos interactúen con la membrana y, posteriormente, impedir la capacidad de los péptidos para matar bacterias (Kandasamy y Larson, 2006). Estudios de simulación informática han mostrado también que, en concentraciones altas de sal, existe una reducción del área de la región polar de los fosfolípidos, lo que conduce a un empaquetamiento más estrecho de los lípidos presentes en la membrana celular, este fenómeno provoca en una reducción en la capacidad de los AMPs en la interacción con la membrana y realizar su acción antimicrobiana (Łoboda et al., 2018).

Aunque en el presente estudio no se llevó a cabo la secuenciación del péptido que muestra actividad contra ambas cepas patógenas, es posible que la presencia de histidinas o aminoácidos relacionados en la tolerancia salina estén presentes en la secuencia de los péptidos producidos por la cepa B2. Se ha relacionado que residuos de histidinas juegan un rol relevante en la tolerancia de AMPs en condiciones de

altas concentraciones de sales. Las histidinas pueden formar enlaces de hidrógeno con un fosfato; presente en la bicapa lipídica y coordinarse simultáneamente con un metal para neutralizar la carga de fosfato, lo que facilita los enlaces a los grupos de cabeza de lípidos para generar una curvatura de silla de montar, un requisito previo para la formación de poro (Xian et al., 2022).

Los cultivos realizados a volumen de 30 mL de medio de cultivo, mostraron un aumento significativo de los halos de inhibición contra los modelos patógenos comparado contra los sobrenadantes de los matraces con 200 ml de medio de cultivo, siendo este grupo en el que hay una mayor presencia de oxígeno. Esto es ocasionado por al área que tiene el medio de cultivo líquido para deslizarse en el matraz de mayor tamaño, por lo que las interacciones entre moléculas de oxígeno del aire y el medio aumenta la capacidad de transferencia de oxígeno (OTR), de forma inversa, en áreas menores hay menor transferencia de oxígeno en el medio (Figura 11)(Meier et al., 2016). Los subgrupos de cosecha y curva mostraron diferencias en la misma prueba, siendo los sobrenadantes del subgrupo cosecha los que tuvieron mayor actividad. Hay muy poca literatura acerca de los efectos del oxígeno en la producción de AMPs. Algunas investigaciones únicamente han relacionado mecanismos de regulación de la expresión génica de especies bacterianas del género *Bacillus* dependientes de oxígeno(Ramos et al., 2000). Reents y colaboradores (2006) encontraron un regulador transcripcional llamado *Fnr* en *Bacillus subtilis* requerida para la adaptación metabólica en baja presencia de oxígeno. Es posible que algunos mecanismos moleculares de regulación transcripcional en la producción de AMPs sean dependientes de oxígeno, sin embargo, no existe literatura que vincule a nivel molecular la regulación por oxígeno en la producción de AMPs, con este experimento se observa una relación entre los volúmenes-tipos de manejo de los medios de producción y la presencia de oxígeno como supresor en la producción de AMPs de la cepa B2.

La fracción 3-5 KDa y >3 Kda no redujeron significativamente su actividad al incubarse con proteasas tripsina y proteínasa k a una concentración de 0.03 mg/ml (Figura 14). Las proteasas celulares, como la tripsina, proteínasa k, pepsina entre otras, pueden conducir a la degradación e inactivación de los péptidos antimicrobianos (Y. Li et al., 2019). Estas proteasas son una de las barreras que impiden la aplicación clínica de péptidos antimicrobianos. Algunos péptidos antimicrobianos han mostrado resistencia a proteasas celulares a concentraciones de 0.1 mg/mL. (Zhong et al., 2019). Es relevante mencionar que la tripsina escinde los péptidos en el lado C-terminal de los residuos de aminoácidos de lisina y arginina, salvo cuando hay una prolina en?. La proteínasa K escinde los enlaces peptídicos junto al terminal carboxilo de los aminoácidos aromáticos, los aminoácidos hidrófobos y los aminoácidos sulfúricos, dentro de la cadena polipeptídica (Lough et al., 1985). La resistencia a proteasas celulares se ha relacionado en la presencia de modificaciones en la cadena peptídica. Algunas de estas modificaciones incluyen N-acetilación, C-

amidación, ciclación, sustitución de aminoácidos no naturales o análogos de aminoácidos, PEGilación, lipopéptidos y peptidomiméticos (Shao et al., 2019). Sin embargo, los péptidos ciclados de la columna vertebral, que se forman por un enlace disulfuro a través de dos cisteínas o el enlace amida entre el residuo C-terminal y el residuo N-terminal, aumentan la resistencia de AMPs contra algunas enzimas proteolíticas (Ong et al., 2014). La ciclación entra en la categoría de pequeñas modificaciones de la clase II de la clasificación de AMPs y muy presente en los péptidos producidos por especies de *Bacillus* (Kaspar et al., 2019). Aunque la secuencia de los péptidos observados en las fracciones menores no pudo ser obtenidas, la evaluación a concentraciones mayores de 10 mg/ml, como lo realizado por Wang y colaboradores (2019) podría mostrar una inhibición de nuestras fracciones para corroborar la resistencia a proteasas a altas concentraciones.

La determinación de curva de crecimiento de la cepa B2, permitió observar la cinética de crecimiento de la bacteria en el medio de cultivo Schaeffer y determinar el tiempo de producción máxima de los péptidos de bajo peso molecular. Los resultados mostraron que hay una mayor producción a inicio de la fase estacionaria, siendo la muestra T2 que mostró mayor actividad en las pruebas de difusión de agar, cuantificación de proteínas y área bajo la curva en las pruebas de RP-HPLC. En casi todos los casos, la producción de bacteriocinas depende del crecimiento y, por lo general, comienza durante la mitad de la fase logarítmica y alcanza su punto máximo en la transición entre las fases logarítmica y estacionaria (Willey y van der Donk, 2007). Liu y colaboradores (2015) determinaron el tiempo de producción máxima del péptido BacEMD4 (3.5 KDa) durante el inicio de la fase estacionaria producida por la cepa EMD4 de *Bacillus subtilis*, proveniente de muestra de salsa de soja. La cepa SLYY-3 de *Bacillus subtilis* proveniente de sedimentos de la bahía de Jiaozhou, Qingdao, China, produce el péptido BLIS (66 KDa) durante toda la fase estacionaria, sin embargo, su mayor actividad contra bacterias Gram-positivas se sitúa a inicios de la fase estacionaria, 12 horas posterior al inicio de la curva de crecimiento (J. Li et al., 2014). Kindoli y colaboradores (2012) determinaron que la producción máxima del péptido antimicrobiano BacH7 (4.9 KDa) producido por *Bacillus subtilis* H27 con actividad contra *Listeria monocytogenes*, se sitúa a finales de la fase estacionaria (52 horas post inoculación de curva de crecimiento) en el medio de infusión corazón-cerebro, sin embargo, cuando evaluaron el medio luria-broth, la producción máxima fue durante el inicio de la fase estacionaria (24 horas post inoculación). La selección de medio de cultivo influye en la producción de péptidos antimicrobianos (Mercado y Olmos, 2022)

Los análisis de RP-HPLC de la fracción >3 KDa mostraron la presencia de 4 péptidos en las muestras provenientes del sobrenadante de la cepa B2 (Figura 18). La especie *Bacillus subtilis* tiene una notable capacidad de adaptación a diferentes ambientes, puede estar presente en muestras de suelo, mantos

acuíferos como ríos, lagunas o incluso en muestras marinas (Olmos et al., 2020; Olmos y Paniagua-Michel, 2014). Esta adaptación que a lo largo de la evolución ha desarrollado, se refleja también en la familia de metabolitos secundarios que produce para su capacidad de resistencia y competencia contra otros microorganismos (Mercado y Olmos, 2022). Algunos péptidos de bajo peso molecular (.2- 5 KDa) con actividad antimicrobiana han sido aislados de cepas de *Bacillus*. Un péptido de clase II (1.4 KDa) producido por *Bacillus paralicheniformis* y proveniente de muestras de alimento fermentado tradicional indio, mostró termoestabilidad (4,0–125 °C), tolerancia al pH (pH 2,0–9,0) y resistencia a enzimas fisiológicas (tripsina, quimotripsina, pepsina, proteinasa K, proteasa y catalasa) así a las sales metálicas que no inhiben la actividad contra *Salmonella typhi* y *Listeria monocytogenes* (Choyam et al., 2021). Varias cepas de *B. subtilis* producen AMPs con actividad contra otros organismos como hongos y también bacterias Gram-positivas, por ejemplo, la iturina, bacilomicina y la fengicina. Estos lipopéptidos anfipáticos tienen una masa molecular que oscila entre 1 028 y 2 000 Daltons, y son sintetizados por grandes complejos multienzimáticos con dominios catalíticos dispuestos modularmente (Schallmey et al., 2004; Sumi et al., 2015). La bacilina, un dipéptido que contiene l-alanina de un peso de .270 KDa, es uno de los antibióticos peptídicos más simples y es producido por la cepa *B. subtilis* Marburg 168 (Nakano y Zuber, 1990). Algunos péptidos antimicrobianos pertenecientes a la familia de las surfactinas también han demostrado su potencial como agente antitumoral, antiviral, antibacteriano e hipocolesterolémico, siendo otro campo de investigación prometedor para la aplicación clínica de los AMPs (Schallmey et al., 2004).

Muchas de las características de los péptidos identificados de la fracción >3 KDa de la cepa B2 se comparten con otros péptidos purificados de otras cepas de *Bacillus*. En este sentido, es relevante mencionar la diversidad de AMPs que diferentes cepas de *Bacillus* pueden producir, reflejándose en la acción contra diversos patógenos. Es por ello la importancia en la evaluación de los péptidos antimicrobianos identificados con otras especies patógenas de relevancia clínica.

## Capítulo 5. Conclusiones

---

En el presente proyecto de investigación se analizaron diversas cepas de *Bacillus* provenientes de muestras ambientales. De las cuatro cepas evaluadas, la cepa B2 mostró actividad contra las especies patógenas de aislados clínicos identificadas como de *S. aureus* y *S. haemolyticus*. La determinación del medio de cultivo adecuado para la producción de AMPs fue el medio Schaeffer normal con presencia de sales, en medios de cosecha directa y en volúmenes de 30 ml. Algunos artículos han mostrado la inhibición de péptidos catiónicos debido a la presencia de sales, sin embargo, las evaluaciones de estabilidad y producción revelaron una resistencia a sales metálicas, así como resistencia a degradación de las proteasas celulares tripsina y proteinasa k y termoestabilidad a 37° C. La identificación del tiempo de producción máxima de los AMPs producidos por la cepa B2, se lleva a cabo al final de la fase exponencial y a inicios de la fase estacionaria, aproximadamente (5-7 horas post inoculación en medio de producción). Mediante el análisis de la muestra de la fracción menor se evidenció la presencia de péptidos de peso molecular menor a 3KDa. Sin embargo, debido a factores de infraestructura, la secuenciación de los péptidos no se pudo llevar a cabo. Los datos de los resultados permiten tener un flujo de trabajo para su futura purificación y secuenciación.

Algunas características de estabilidad se han mostrado también en otros péptidos identificados de otras cepas de *Bacillus*, lo que evidencia la ventaja en la búsqueda de compuestos en este género bacteriano debido a su capacidad para adaptarse y sobrevivir a diversos ambientes. Para futuras investigaciones, la secuenciación del o los AMPs mostrarían los residuos de aminoácidos que pudieran estar involucrados en la estabilidad. Además, se podría realizar innovaciones en el campo del diseño de AMPs mediante la modificación de residuos que permitieran una mayor estabilidad y nuevas dianas en el tratamiento de patógenos.

Las evaluaciones en otros modelos patógenos, permitiría aumentar el margen de aplicación de estos compuestos. Por ejemplo, las evaluaciones con otras bacterias patógenas Gram-positivas y Gram-negativas, hongos, o inclusive en analizar si tiene una actividad inmunomoduladora en células humanas para contrarrestar infecciones virales o en la respuesta contra células cancerígenas como han mostrado algunos otros péptidos antimicrobianos.

## Literatura citada

---

- Abriouel, H., Franz, C. M. A. P., Omar, N. ben, y Galvez, A. 2011. Diversity and applications of Bacillus bacteriocins. *FEMS Microbiology Reviews*. Oxford Academic, 35(1). 201–232. doi: 10.1111/J.1574-6976.2010.00244.X
- Bastock, R. A., Marino, E. C., Wiemels, R. E., Holzschu, D. L., Keogh, R. A., Zapf, R. L., Murphy, E. R., y Carroll, R. K. 2021. Staphylococcus aureus Responds to Physiologically Relevant Temperature Changes by Altering Its Global Transcript and Protein Profile. *MSphere*. mSphere, 6(2). doi: 10.1128/MSPHERE.01303-20
- Bierbaum, G. y Sahl, H.-G. 2009. Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. Curr Pharm Biotechnol, 10(1). 2–18. doi: 10.2174/138920109787048616
- bin Hafeez, A., Jiang, X., Bergen, P. J., y Zhu, Y. 2021. Antimicrobial Peptides: An Update on Classifications and Databases. *International Journal of Molecular Sciences*. Int J Mol Sci, 22(21). doi: 10.3390/IJMS222111691
- Blum, F. 2014. High performance liquid chromatography. *British Journal of Hospital Medicine (London, England : 2005)*. Br J Hosp Med (Lond), 75(2). doi: 10.12968/HMED.2014.75.SUP2.C18
- Brose, D. J., Dosmar, M., y Jornitz, M. W. 2002. Membrane filtration. *Pharmaceutical Biotechnology*. Pharm Biotechnol, 14. 213–279. doi: 10.1007/978-1-4615-0549-5\_5
- Brunelle, J. L. y Green, R. 2014. One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE). *Methods in Enzymology*. Methods Enzymol, 541. 151–159. doi: 10.1016/B978-0-12-420119-4.00012-4
- Carrillo Terrazas, M. 2016. Aislamiento e identificación de Staphylococcus aureus resistente a meticilina (SARM) en una población de un centro oncológico pediátrico en la ciudad de Tijuana, Baja California. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California, 139.
- Castañeda-Méndez PF, Hernández-Juarez D, y Muños-López M. 2018. Frecuencia de infecciones por S. aureus en pacientes hospitalizados en un hospital privado de tercer nivel de la Ciudad de México. Consultado el 20 de agosto de 2022, de [https://redib.org/Record/oai\\_articulo1669192-frecuencia-de-infecciones-por-s-aureus-en-pacientes-hospitalizados-en-un-hospital-privado-de-tercer-nivel-de-la-ciudad-de-m%C3%A9xico](https://redib.org/Record/oai_articulo1669192-frecuencia-de-infecciones-por-s-aureus-en-pacientes-hospitalizados-en-un-hospital-privado-de-tercer-nivel-de-la-ciudad-de-m%C3%A9xico)
- Caulier, S., Nannan, C., Gillis, A., Licciardi, F., Bragard, C., y Mahillon, J. 2019. Overview of the Antimicrobial Compounds Produced by Members of the Bacillus subtilis Group. *Frontiers in Microbiology*. Front Microbiol, 10(FEB). doi: 10.3389/FMICB.2019.00302

- Chen, H., Wang, L., Su, C. X., Gong, G. H., Wang, P., y Yu, Z. L. 2008. Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. *Letters in Allied Microbiology. Lett AI Microbiol*, 47(3). 180–186. doi: 10.1111/J.1472-765X.2008.02412.X
- Chevallet, M., Luche, S., y Rabilloud, T. 2006. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature Protocols. Inserm*, 1(4). 1852. doi: 10.1038/NPROT.2006.288
- Choyam, S., Jain, P. M., y Kammara, R. 2021. Characterization of a Potent New-Generation Antimicrobial Peptide of *Bacillus*. *Frontiers in Microbiology. Frontiers Media S.A.*, 12. 2236. doi: 10.3389/FMICB.2021.710741/BIBTEX
- Christensen, G. J. M. y Brüggemann, H. 2014. Bacterial skin commensals and their role as host guardians. *Beneficial Microbes. Wageningen Academic Publishers*, 5(2). 201–215. doi: 10.3920/BM2012.0062
- Cotter, P. D., Hill, C., y Ross, R. P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews. Microbiology. Nat Rev Microbiol*, 3(10). 777–788. doi: 10.1038/NRMICRO1273
- da Silva Sabo, S., Vitolo, M., González, J. M. D., y Oliveira, R. P. de S. 2014. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*. *Food Res Int*, 64. 527–536. doi: 10.1016/J.FOODRES.2014.07.041
- Davis, J. S., Hal, S. van, y Tong, S. Y. C. 2015. Combination antibiotic treatment of serious methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine. Semin Respir Crit Care Med*, 36(1). 3–16. doi: 10.1055/S-0034-1396906
- Dolashki, A., Velkova, L., Daskalova, E., Zheleva, N. N., Topalova, Y., Atanasov, V., Voelter, W., y Dolashka, P. 2020. Antimicrobial Activities of Different Fractions from Mucus of the Garden Snail *Cornu aspersum*. *Biomedicines. Biomedicines*, 8(9). doi: 10.3390/BIOMEDICINES8090315
- Dreno, B., Martin, R., Moyal, D., Henley, J. B., Khammari, A., y Seité, S. 2017. Skin microbiome and acne vulgaris: *Staphylococcus*, a new actor in acne. *Experimental Dermatology. Exp Dermatol*, 26(9). 798–803. doi: 10.1111/EXD.13296
- Dubos, R. J. 1939. Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus : i. Preparation of the agent. Its activity in vitro. *The Journal of Experimental Medicine. J Exp Med*, 70(1). 1–10. doi: 10.1084/JEM.70.1.1
- Eells, S. J., David, M. Z., Taylor, A., Ortiz, N., Kumar, N., Sieth, J., Boyle-Vavra, S., Daum, R. S., y Miller, L. G. 2014. Persistent environmental contamination with USA300 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other pathogenic strain types in households with *S. aureus* skin infections. *Infection Control and Hospital Epidemiology. Infect Control Hosp Epidemiol*, 35(11). 1373–1382. doi: 10.1086/678414
- Eijsink, V. G. H., Axelsson, L., Diep, D. B., Håvarstein, L. S., Holo, H., y Nes, I. F. 2002. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie van Leeuwenhoek. Antonie Van Leeuwenhoek*, 81(1–4). 639–654. doi: 10.1023/A:1020582211262

- Fimland, G., Johnsen, L., Dalhus, B., y Nissen-Meyer, J. 2005. Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. *Journal of Peptide Science : An Official Publication of the European Peptide Society*. *J Pept Sci*, 11(11). 688–696. doi: 10.1002/PSC.699
- Castañeda-Méndez PF, Hernández-Juarez D, y Muños-López M. 2018. Frecuencia de infecciones por *S. aureus* en pacientes hospitalizados en un hospital privado de tercer nivel de la Ciudad de México. s/f. Recuperado el 16 de noviembre de 2022, a partir de [https://redib.org/Record/oai\\_articulo1669192-frecuencia-de-infecciones-por-s-aureus-en-pacientes-hospitalizados-en-un-hospital-privado-de-tercer-nivel-de-la-ciudad-de-m%C3%A9xico](https://redib.org/Record/oai_articulo1669192-frecuencia-de-infecciones-por-s-aureus-en-pacientes-hospitalizados-en-un-hospital-privado-de-tercer-nivel-de-la-ciudad-de-m%C3%A9xico)
- Ghose, T. K. 1994. Ultrafiltration membranes in biotechnology. *Hindustan Antibiotics Bulletin*, 36(3–4). 173–190.
- Glatthardt, T., Curityba de Mello Campos, J., Chamon, R. C., Freitas de Sá Coimbra, T., de Almeida Rocha, G., Figueira de Melo, M. A., Parente, T. E., Lobo, L. A., Antunes, L. C. M., Santos, K. R. N. dos, y Ferreira, R. B. R. 2020. Small molecules produced by commensal staphylococcus epidermidis disrupt formation of biofilms by staphylococcus aureus. *Alid and Environmental Microbiology*. *American Society for Microbiology*, 86(5). doi: 10.1128/AEM.02539-19
- Gould, K. 2016. Antibiotics: From prehistory to the present day. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Oxford University Press, 71(3). 572–575. doi: 10.1093/jac/dkv484
- Hageman, J. H., Shankweiler, G. W., Wall, P. R., Franich, K., McCowan, G. W., Cauble, S. M., Grajeda, J., y Quinones, C. 1984. Single, chemically defined sporulation medium for *Bacillus subtilis*: growth, sporulation, and extracellular protease production. *Journal of Bacteriology*, 160(1). 438–441. doi: 10.1128/JB.160.1.438-441.1984
- Hamdan-Partida, A., González-García, S., Martínez-Ruíz, F. J., Zavala-Sánchez, M. Á., Bustos-Hamdan, A., y Bustos-Martínez, J. 2022. Molecular Characterization of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Mobile Phones. *Microorganisms*. MDPI, 10(3). doi: 10.3390/microorganisms10030669
- Haney, E. F., Mansour, S. C., y Hancock, R. E. W. 2017. Antimicrobial Peptides: An Introduction. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.). *Methods Mol Biol*, 1548. 3–22. doi: 10.1007/978-1-4939-6737-7\_1
- Harkins, C. P., Pichon, B., Doumith, M., Parkhill, J., Westh, H., Tomasz, A., de Lencastre, H., Bentley, S. D., Kearns, A. M., y Holden, M. T. G. 2017. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged long before the introduction of methicillin into clinical practice. *Genome Biology*. *Genome Biol*, 18(1). doi: 10.1186/S13059-017-1252-9
- Hassoun, A., Linden, P. K., y Friedman, B. 2017. Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations—a review of recent developments in MRSA management and treatment. *Critical Care*. *BioMed Central*, 21(1). 211. doi: 10.1186/S13054-017-1801-3



- Heng, N. C. K., Wescombe, P. A., Burton, J. P., Jack, R. W., y Tagg, J. R. 2007. The Diversity of Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria. *Bacteriocins*. Springer, Berlin, Heidelberg. 45–92. doi: 10.1007/978-3-540-36604-1\_4
- Hennekinne, J. A., de Buyser, M. L., y Dragacci, S. 2012. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Reviews*. *FEMS Microbiol Rev*, 36(4). 815–836. doi: 10.1111/J.1574-6976.2011.00311.X
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., y Sanders, M. E. 2014. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 11(8). 506–514. doi: 10.1038/NRGASTRO.2014.66
- Holdich, R., Kosvintsev, S., Cumming, I., y Zhdanov, S. 2006. Pore design and engineering for filters and membranes. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. Royal Society, 364(1838). 161–174. doi: 10.1098/rsta.2005.1690
- Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., y Yi, H. 2020. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Frontiers in Microbiology*. *Frontiers Media S.A.*, 11. 2559. doi: 10.3389/FMICB.2020.582779/BIBTEX
- Islam, M. R., Nagao, J. I., Zendo, T., y Sonomoto, K. 2012. Antimicrobial mechanism of lantibiotics. *Biochemical Society Transactions*, 40(6). 1528–1533. doi: 10.1042/BST20120190
- Josic, D. y Kovac, S. 2010. Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography of proteins. *Current Protocols in Protein Science*. *Curr Protoc Protein Sci*, Chapter 8. doi: 10.1002/0471140864.PS0807S61
- Kandasamy, S. K. y Larson, R. G. 2006. Effect of salt on the interactions of antimicrobial peptides with zwitterionic lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. Elsevier, 1758(9). 1274–1284. doi: 10.1016/J.BBAMEM.2006.02.030
- Kang, H. K., Kim, C., Seo, C. H., y Park, Y. 2017. The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*. *J Microbiol*, 55(1). doi: 10.1007/S12275-017-6452-1
- Kang, M. S., Lim, H. S., Oh, J. S., Lim, Y. J., Wuertz-Kozak, K., Harro, J. M., Shirtliff, M. E., y Achermann, Y. 2017. Antimicrobial activity of *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus fermentum* against *Staphylococcus aureus*. *Pathogens and Disease*. *Pathog Dis*, 75(2). doi: 10.1093/FEMSPD/FTX009
- Kaspar, F., Neubauer, P., y Gimpel, M. 2019. Bioactive Secondary Metabolites from *Bacillus subtilis*: A Comprehensive Review. *Journal of Natural Products*. American Chemical Society, 82(7). 2038–2053. doi: 10.1021/ACS.JNATPROD.9B00110/ASSET/IMAGES/MEDIUM/NP-2019-00110P\_0017.GIF

- Kindoli, S., Lee, H. A., Heo, K., y Kim, J. H. 2012. Properties of a bacteriocin from *Bacillus subtilis* H27 isolated from Cheonggukjang. *Food Science and Biotechnology* 2012 21:6. Springer, 21(6). 1745–1751. doi: 10.1007/S10068-012-0232-9
- Köck, R., Becker, K., Cookson, B., van Gemert-Pijnen, J. E., Harbarth, S., Kluytmans, J., Mielke, M., Peters, G., Skov, R. L., Struelens, M. J., Tacconelli, E., Torné, A. N., Witte, W., y Friedrich, A. W. 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro Surveillance: Bulletin European Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*. *Euro Surveill*, 15(41). 1–9. doi: 10.2807/ESE.15.41.19688-EN
- Kourtis, A. P., Hatfield, K., Baggs, J., Mu, Y., See, I., Epton, E., Nadle, J., Kainer, M. A., Dumyati, G., Petit, S., Ray, S. M., Ham, D., Capers, C., Ewing, H., Coffin, N., McDonald, L. C., Jernigan, J., y 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*. Centers for Disease Control MMWR Office, 68(9). 214–219. doi: 10.15585/mmwr.mm6809e1
- Krismer, B., Weidenmaier, C., Zierer, A., y Peschel, A. 2017. The commensal lifestyle of *Staphylococcus aureus* and its interactions with the nasal microbiota. *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 15(11). 675–687. doi: 10.1038/nrmicro.2017.104
- Kumar, P., Kizhakkedathu, J. N., y Straus, S. K. 2018. Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo. *Biomolecules*. *Biomolecules*, 8(1). doi: 10.3390/BIOM8010004
- Lakhundi, S. y Zhang, K. 2018. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clinical Microbiology Reviews*. *Clin Microbiol Rev*, 31(4). doi: 10.1128/CMR.00020-18
- Laux, C., Peschel, A., y Krismer, B. 2019. *Staphylococcus aureus* Colonization of the Human Nose and Interaction with Other Microbiome Members. *Microbiology Spectrum*. *Microbiol Spectr*, 7(2). doi: 10.1128/MICROBIOLSPEC.G3-0029-2018
- Lee, P. C., Chu, C. C., Tsai, Y. J., Chuang, Y. C., y Lung, F. di. 2019. Design, synthesis, and antimicrobial activities of novel functional peptides against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Chemical Biology & Drug Design*. *Chem Biol Drug Des*, 94(2). 1537–1544. doi: 10.1111/CBDD.13535
- Leonel Ochoa-Solano, J. y Olmos-Soto, J. 2006. The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. *Food Microbiology*. *Food Microbiol*, 23(6). 519–525. doi: 10.1016/J.FM.2005.10.004
- Leung, A. K. C., Barankin, B., y Leong, K. F. 2018. Staphylococcal-scalded skin syndrome: evaluation, diagnosis, and management. *World Journal of Pediatrics: WJP*. *World J Pediatr*, 14(2). 116–120. doi: 10.1007/S12519-018-0150-X
- Li, J., Li, H., Zhang, Y., Duan, X., y Liu, J. 2014. Characterization of a bacteriocin-like substance produced from a novel isolated strain of *Bacillus subtilis* SLYY-3. *Journal of Ocean University of China* 2014 13:6. Springer, 13(6). 995–999. doi: 10.1007/S11802-014-2547-Z

- Li, Y., Liu, T., Liu, Y., Tan, Z., Ju, Y., Yang, Y., y Dong, W. 2019. Antimicrobial activity, membrane interaction and stability of the D-amino acid substituted analogs of antimicrobial peptide W3R6. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology. J Photochem Photobiol B*, 200. doi: 10.1016/J.JPHOTOBIO.2019.111645
- Liu, J. Y. y Dickter, J. K. 2020. Nosocomial Infections: A History of Hospital-Acquired Infections. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America. Gastrointest Endosc Clin N Am*, 30(4). 637–652. doi: 10.1016/J.GIEC.2020.06.001
- Liu, X., Lee, J. Y., Jeong, S. J., Cho, K. M., Kim, G. M., Shin, J. H., Kim, J. S., y Kim, J. H. 2015. Properties of a Bacteriocin Produced by *Bacillus subtilis* EMD4 Isolated from Ganjang (Soy Sauce). *Journal of Microbiology and Biotechnology. J Microbiol Biotechnol*, 25(9). 1497–1505. doi: 10.4014/JMB.1502.02037
- Lobanovska, M. y Pilla, G. 2017. Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? *The Yale Journal of Biology and Medicine. Yale J Biol Med*, 90(1). 135–145. Recuperado el 2 de julio de 2022, a partir de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28356901/>
- Łoboda, D., Kozłowski, H., y Rowińska-Zyrek, M. 2018. Antimicrobial peptide–metal ion interactions – a potential way of activity enhancement. *New Journal of Chemistry. The Royal Society of Chemistry*, 42(10). 7560–7568. doi: 10.1039/C7NJ04709F
- Lough, J., Wrenn, D. S., Miziorko, H. M., y Auer, H. E. 1985. Differential sensitivity of chicken MM-creatine kinase to trypsin and proteinase-K. *The International Journal of Biochemistry*, 17(3). 309–318. doi: 10.1016/0020-711X(85)90205-8
- Mant, C. T., Chen, Y., Yan, Z., Popa, T. v., Kovacs, J. M., Mills, J. B., Tripet, B. P., y Hodges, R. S. 2007. HPLC analysis and purification of peptides. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.). Methods Mol Biol*, 386. 3–55. doi: 10.1007/978-1-59745-430-8\_1
- McGuinness, W. A., Malachowa, N., y DeLeo, F. R. 2017. Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *The Yale Journal of Biology and Medicine. Yale J Biol Med*, 90(2). 269–281. doi: 10.1201/9780849340574-15
- Meier, K., Klöckner, W., Bonhage, B., Antonov, E., Regestein, L., y Büchs, J. 2016. Correlation for the maximum oxygen transfer capacity in shake flasks for a wide range of operating conditions and for different culture media. *Biochemical Engineering Journal. Elsevier*, 109. 228–235. doi: 10.1016/J.BEJ.2016.01.014
- Mercado, V. y Olmos, J. 2022. Bacteriocin Production by *Bacillus* Species: Isolation, Characterization, and Application. *Probiotics and Antimicrobial Proteins. Probiotics Antimicrob Proteins*. doi: 10.1007/S12602-022-09966-W
- Mercer, D. K., Torres, M. D. T., Duay, S. S., Lovie, E., Simpson, L., von Köckritz-Blickwede, M., de la Fuente-Nunez, C., O'Neil, D. A., y Angeles-Boza, A. M. 2020. Antimicrobial Susceptibility Testing of Antimicrobial Peptides to Better Predict Efficacy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. Frontiers Media SA*, 10. 326. doi: 10.3389/FCIMB.2020.00326

- Miller, L. S., Fowler, V. G., Shukla, S. K., Rose, W. E., y Proctor, R. A. 2020. Development of a vaccine against *Staphylococcus aureus* invasive infections: Evidence based on human immunity, genetics and bacterial evasion mechanisms. *FEMS Microbiology Reviews*. *FEMS Microbiol Rev*, 44(1). 123–153. doi: 10.1093/FEMSRE/FUZ030
- Ming, L., Zhang, Q., Yang, L., y Huang, J. A. 2015. Comparison of antibacterial effects between antimicrobial peptide and bacteriocins isolated from *Lactobacillus plantarum* on three common pathogenic bacteria. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. e-Century Publishing Corporation, 8(4). 5806. Recuperado el 10 de agosto de 2022, a partir de /pmc/articles/PMC4483923/
- Modiri, S., Kermanshahi, R. K., Soudi, M. R., Dad, N., Ebadi, M., Zahiri, H. S., y Noghabi, K. A. 2021. Growth Optimization of *Lactobacillus acidophilus* for Production of Antimicrobial Peptide Acidocin 4356: Scale up from Flask to Lab-Scale Fermenter. *Iranian Journal of Biotechnology*. *Iran J Biotechnol*, 19(3). 10–19. doi: 10.30498/IJB.2021.218725.2686
- Mohammed, E. S. I. y Radey, R. 2021. Immunomodulation of Antimicrobial Peptides Expression in the Gastrointestinal Tract by Probiotics in Response to Stimulation by *Salmonella minnesota* Lipopolysaccharides. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 13(4). 1157–1172. doi: 10.1007/S12602-021-09746-Y
- Mohr, K. I. 2016. History of Antibiotics Research. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 398. 237–272. doi: 10.1007/82\_2016\_499
- Mondol, M. A. M., Shin, H. J., y Islam, M. T. 2013. Diversity of Secondary Metabolites from Marine *Bacillus* Species: Chemistry and Biological Activity. *Marine Drugs*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 11(8). 2846. doi: 10.3390/MD11082846
- Muhammad, N., Akbar, A., Shah, A., Abbas, G., Hussain, M., y Khan, T. A. 2015. Isolation optimization and characterization of antimicrobial peptide producing bacteria from soil. *JAPS, Journal of Animal and Plant Sciences*. *Pakistan Agricultural Scientists Forum*, 25(4). 1107–1113.
- Nakano, M. M. y Zuber, P. 1990. Molecular biology of antibiotic production in *Bacillus*. *Critical Reviews in Biotechnology*. *Crit Rev Biotechnol*, 10(3). 223–240. doi: 10.3109/07388559009038209
- Nakayama, D. K. 2018. Antisepsis and asepsis and how they shaped modern surgery. *American Surgeon*. *Southeastern Surgical Congress*, 84(6). 766–771. doi: 10.1177/000313481808400616
- Newsom, S. W. B. 2008. Ogston's coccus. *The Journal of Hospital Infection*. *J Hosp Infect*, 70(4). 369–372. doi: 10.1016/J.JHIN.2008.10.001
- Nierhaus, K. H. 2014. Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, and the Ribosome. *Journal of Bacteriology*. American Society for Microbiology 1752 N St., N.W., Washington, DC, 196(22). 3817–3819. doi: 10.1128/JB.02297-14

- Nissen-Meyer, J., Oegård, C., Rogne, P., Haugen, H. S., y Kristiansen, P. E. 2010. Structure and Mode-of-Action of the Two-Peptide (Class-IIb) Bacteriocins. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 2(1). 52–60. doi: 10.1007/S12602-009-9021-Z
- Nissen-Meyer, J., Rogne, P., Oegard, C., Haugen, H., y Kristiansen, P. 2009. Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. *Curr Pharm Biotechnol*, 10(1). 19–37. doi: 10.2174/138920109787048661
- Olmos, J., Acosta, M., Mendoza, G., y Pitones, V. 2020. *Bacillus subtilis*, an ideal probiotic bacterium to shrimp and fish aquaculture that increase feed digestibility, prevent microbial diseases, and avoid water pollution. *Archives of Microbiology*. *Arch Microbiol*, 202(3). 427–435. doi: 10.1007/S00203-019-01757-2
- Olmos, J. y Paniagua-Michel, J. 2014. *Bacillus subtilis* A Potential Probiotic Bacterium to Formulate Functional Feeds for Aquaculture. *J Microb Biochem Technol*, 6(7). 361–365. doi: 10.4172/1948-5948.1000169
- Oludemi, T., Reis, F. S., Tian, Z., Hou, L., Hu, M., Gao, Y., Li, D., Fan, B., Wang, F., y Li, S. 2022. Optimization of Sporulation Conditions for *Bacillus subtilis* BSNK-5. *Processes* 2022, Vol. 10, Page 1133. *Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 10(6). 1133. doi: 10.3390/PR10061133
- Ong, Z. Y., Wiradharma, N., y Yang, Y. Y. 2014. Strategies employed in the design and optimization of synthetic antimicrobial peptide amphiphiles with enhanced therapeutic potentials. *Advanced Drug Delivery Reviews*. *Adv Drug Deliv Rev*, 78. 28–45. doi: 10.1016/J.ADDR.2014.10.013
- Paharik, A. E. y Horswill, A. R. 2016. The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, Regulation, and Host Response. *Microbiology Spectrum*. *Microbiol Spectr*, 4(2). doi: 10.1128/MICROBIOLSPEC.VMBF-0022-2015
- Ramos, H. C., Hoffmann, T., Marino, M., Nedjari, H., Presecan-Siedel, E., Dreesen, O., Glaser, P., y Jahn, D. 2000. Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expression. *Journal of Bacteriology*. *J Bacteriol*, 182(11). 3072–3080. doi: 10.1128/JB.182.11.3072-3080.2000
- Reents, H., Münch, R., Dammeyer, T., Jahn, D., y Härtig, E. 2006. The Fnr Regulon of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. *American Society for Microbiology (ASM)*, 188(3). 1103. doi: 10.1128/JB.188.3.1103-1112.2006
- Rubio, V. P., Bravo, A., y Olmos, J. 2017. Identification of a *Bacillus thuringiensis* Surface Layer Protein with Cytotoxic Activity against MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. *J Microbiol Biotechnol*, 27(1). 36–42. doi: 10.4014/JMB.1607.07020
- Sahl, H.-G., Jack, R. W., y Bierbaum, G. 1995. Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. *European Journal of Biochemistry*. *Eur J Biochem*, 230(3). 827–853. doi: 10.1111/J.1432-1033.1995.TB20627.X

- Salmieri, S., Islam, F., Khan, R. A., Hossain, F. M., Ibrahim, H. M. M., Miao, C., Hamad, W. Y., y Lacroix, M. 2014. Antimicrobial nanocomposite films made of poly(lactic acid)-cellulose nanocrystals (PLA-CNC) in food applications: part A—effect of nisin release on the inactivation of *Listeria monocytogenes* in ham. *Cellulose* 2014 21:3. Springer, 21(3). 1837–1850. doi: 10.1007/S10570-014-0230-6
- Sawa, N., Zendo, T., Kiyofuji, J., Fujita, K., Himeno, K., Nakayama, J., y Sonomoto, K. 2009. Identification and characterization of lactocyclin Q, a novel cyclic bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. strain QU 12. *Applied and Environmental Microbiology*. *Appl Environ Microbiol*, 75(6). 1552–1558. doi: 10.1128/AEM.02299-08
- Schallmeyer, M., Singh, A., y Ward, O. P. 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*. *Can J Microbiol*, 50(1). 1–17. doi: 10.1139/W03-076
- Schwab, U., Gilligan, P., Jaynes, J., y Henke, D. 1999. In Vitro Activities of Designed Antimicrobial Peptides against Multidrug-Resistant Cystic Fibrosis Pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. *American Society for Microbiology (ASM)*, 43(6). 1435. doi: 10.1128/AAC.43.6.1435
- Selsted, M. E. 1997. HPLC methods for purification of antimicrobial peptides. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. *Methods Mol Biol*, 78. 17–33. doi: 10.1385/0-89603-408-9:17
- Shao, C., Zhu, Y., Lai, Z., Tan, P., y Shan, A. 2019. Antimicrobial peptides with protease stability: progress and perspective. *Future Medicinal Chemistry*. *Future Med Chem*, 11(16). 2047–2050. doi: 10.4155/FMC-2019-0167
- Simons, A., Alhanout, K., y Duval, R. E. 2020. Bacteriocins, Antimicrobial Peptides from Bacterial Origin: Overview of Their Biology and Their Impact against Multidrug-Resistant Bacteria. *Microorganisms*. *Microorganisms*, 8(5). doi: 10.3390/MICROORGANISMS8050639
- Singh, S. B., Young, K., y Silver, L. L. 2017. What is an “ideal” antibiotic? Discovery challenges and path forward. *Biochemical Pharmacology*. *Biochem Pharmacol*, 133. 63–73. doi: 10.1016/J.BCP.2017.01.003
- Stein, T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*. *Mol Microbiol*, 56(4). 845–857. doi: 10.1111/J.1365-2958.2005.04587.X
- Sumi, C. D., Yang, B. W., Yeo, I. C., y Hahm, Y. T. 2015. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: A new era for antibiotics. *Canadian Journal of Microbiology*. *Canadian Science Publishing*, 61(2). 93–103. doi: 10.1139/CJM-2014-0613/ASSET/IMAGES/CJM-2014-0613TAB2.GIF
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outterson, K., Patel, J., Cavalieri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet. Infectious Diseases*. *Lancet Infect Dis*, 18(3). 318–327. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3

- Tajbakhsh, M., Karimi, A., Fallah, F., y Akhavan, M. M. 2017. Overview of ribosomal and non-ribosomal antimicrobial peptides produced by Gram positive bacteria. Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France). Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 63(10). doi: 10.14715/CMB/2017.63.10.4
- Tang, S. S., Prodhan, Z. H., Biswas, S. K., Le, C. F., y Sekaran, S. D. 2018. Antimicrobial peptides from different plant sources: Isolation, characterisation, and purification. Phytochemistry. Phytochemistry, 154. 94–105. doi: 10.1016/J.PHYTOCHEM.2018.07.002
- Tian, Z., Hou, L., Hu, M., Gao, Y., Li, D., Fan, B., Wang, F., y Li, S. 2022. Optimization of Sporulation Conditions for *Bacillus subtilis* BSNK-5. Processes 2022, Vol. 10, Page 1133. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 10(6). 1133. doi: 10.3390/PR10061133
- Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., y Fowler, V. G. 2015. Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. Clinical Microbiology Reviews. Clin Microbiol Rev, 28(3). 603–661. doi: 10.1128/CMR.00134-14
- Turner, N. A., Sharma-Kuinkel, B. K., Maskarinec, S. A., Eichenberger, E. M., Shah, P. P., Carugati, M., Holland, T. L., y Fowler, V. G. 2019a. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: an overview of basic and clinical research. Nature Reviews. Microbiology. Nat Rev Microbiol, 17(4). 203–218. doi: 10.1038/S41579-018-0147-4
- Turovskiy, Y., Kashtanov, D., Paskhover, B., y Chikindas, M. L. 2007. Quorum Sensing: Fact, Fiction, and Everything in Between. Advances in Allied Microbiology. NIH Public Access, 62. 191. doi: 10.1016/S0065-2164(07)62007-3
- Vaish, M., Price-Whelan, A., Reyes-Robles, T., Liu, J., Jereen, A., Christi, S., Alonzo, F., Benson, M. A., Torres, V. J., y Krulwicha, T. A. 2018. Roles of Staphylococcus aureus Mnh1 and Mnh2 Antiporters in Salt Tolerance, Alkali Tolerance, and Pathogenesis. Journal of Bacteriology. J Bacteriol, 200(5). doi: 10.1128/JB.00611-17
- van Belkum, M. J., Martin-Visscher, L. A., y Vederas, J. C. 2011. Structure and genetics of circular bacteriocins. Trends in Microbiology. Trends Microbiol, 19(8). 411–418. doi: 10.1016/J.TIM.2011.04.004
- van Hal, S. J., Jensen, S. O., Vaska, V. L., Espedido, B. A., Paterson, D. L., y Gosbell, I. B. 2012. Predictors of mortality in Staphylococcus aureus Bacteremia. Clinical Microbiology Reviews. Clin Microbiol Rev, 25(2). 362–386. doi: 10.1128/CMR.05022-11
- Wang, G., Li, X., y Wang, Z. 2016. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. Nucleic Acids Research. Nucleic Acids Res, 44(D1). D1087–D1093. doi: 10.1093/NAR/GKV1278
- Wang, J., Song, J., Yang, Z., He, S., Yang, Y., Feng, X., Dou, X., y Shan, A. 2019. Antimicrobial Peptides with High Proteolytic Resistance for Combating Gram-Negative Bacteria. Journal of Medicinal Chemistry. American Chemical Society, 62(5). 2286–2304. doi: 10.1021/ACS.JMEDCHEM.8B01348/SUL\_FILE/JM8B01348\_SI\_003.AVI

- Wertheim, H. F. L., Melles, D. C., Vos, M. C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H. A., y Nouwen, J. L. 2005. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *The Lancet Infectious Diseases*. Elsevier, 5(12). 751–762. doi: 10.1016/S1473-3099(05)70295-4
- Willey, J. M. y van der Donk, W. A. 2007. Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annual Review of Microbiology*. *Annu Rev Microbiol*, 61. 477–501. doi: 10.1146/ANNUREV.MICRO.61.080706.093501
- Wu, G., Ding, J., Li, H., Li, L., Zhao, R., Fan, X., y Shen, Z. 2008. Effects of Cations and PH on Antimicrobial Activity of Thanatin and s-Thanatin against *Escherichia coli* ATCC25922 and *B. subtilis* ATCC 21332. *Nature Precedings* 2008. Nature Publishing Group. 1–1. doi: 10.1038/npre.2008.2006.1
- Xian, W., Hennefarth, M. R., Lee, M. W., Do, T., Lee, E. Y., Alexandrova, A. N., y Wong, G. C. L. 2022. Histidine-Mediated Ion Specific Effects Enable Salt Tolerance of a Pore-Forming Marine Antimicrobial Peptide. *Angewandte Chemie International Edition*. John Wiley & Sons, Ltd, 61(25). e202108501. doi: 10.1002/ANIE.202108501
- Xie, L. y van der Donk, W. A. 2004. Post-translational modifications during lantibiotic biosynthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*. *Curr Opin Chem Biol*, 8(5). 498–507. doi: 10.1016/J.CBPA.2004.08.005
- Zaffiri, L., Gardner, J., y Toledo-Pereyra, L. H. 2012. History of antibiotics. From salvarsan to cephalosporins. *Journal of Investigative Surgery : The Official Journal of the Academy of Surgical Research*. *J Invest Surg*, 25(2). 67–77. doi: 10.3109/08941939.2012.664099
- Zhang, J., Luo, X., Pang, X., Li, X., Lu, Y., y Sun, J. 2022. Promoted Spore Formation of *Bacillus amyloliquefaciens* fmbJ by its Secondary Metabolite Bacillomycin D Coordinated with Mn<sup>2+</sup>. *Indian Journal of Microbiology* 2022, Pages 1-9. Springer Nature. 1–9. doi: 10.1007/S12088-022-01026-9
- Zhang, L. J. y Gallo, R. L. 2016. Antimicrobial peptides. *Current Biology*. Cell Press, 26(1). R14–R19. doi: 10.1016/j.cub.2015.11.017
- Zhong, C., Liu, T., Gou, S., He, Y., Zhu, N., Zhu, Y., Wang, L., Liu, H., Zhang, Y., Yao, J., y Ni, J. 2019. Design and synthesis of new N-terminal fatty acid modified-antimicrobial peptide analogues with potent in vitro biological activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*. *Eur J Med Chem*, 182. doi: 10.1016/J.EJMECH.2019.111636
- Zumstein, L. 2001. Dialysis and ultrafiltration. *Current Protocols in Molecular Biology*. *Curr Protoc Mol Biol*, Aendix 3(1). doi: 10.1002/0471142727.MBA03CS41