



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE
METABOLITOS PRODUCIDOS POR *Bacillus subtilis*
CONTRA BACTERIAS GRAM NEGATIVAS**

**DETERMINATION OF THE ANTAGONISTIC ACTIVITY OF
METABOLITES PRODUCED BY *Bacillus subtilis* AGAINST
GRAM-NEGATIVE BACTERIA**

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

ANGEL IVAN SALMERÓN SANDOVAL

DIRECTORA Y ASESORA DE TESIS:
NORMA ELENA ROJAS RUIZ

COORDIRECTOR:
LUIS RAMIRO CASO VARGAS



ENERO 2026



DEDICATORIA

A mis padres y hermanos, quienes creen que el futuro como licenciado en biotecnología no se limita a dar espectáculos en fiestas infantiles. Y a mi directora de tesis, Dra. Norma Elena Rojas Ruiz, quien ha sido el más grande ejemplo de continuar con un propósito con una actitud positiva a pesar de cualquier dificultad.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y a la Facultad de Ciencias Biológicas por brindarme la formación y los recursos necesarios para la realización de este trabajo de tesis.

Expreso un especial agradecimiento a mi directora de tesis, Dra. Norma Rojas Ruiz, por su guía, paciencia y valiosas aportaciones científicas, así como por la confianza depositada en mí durante el desarrollo del proyecto.

Agradezco también a mi codirector de tesis, Dr. Luis Ramiro Caso Vargas por su apoyo y asesoría en la parte molecular del proyecto, y a mis compañeros del laboratorio Marlen Serrano y Rubén Ortiz, por su colaboración y el ambiente de trabajo brindado.

A mi familia, les agradezco profundamente su apoyo incondicional, comprensión y motivación constante a lo largo de mi formación académica.

Finalmente, agradezco a todas aquellas personas que de manera directa o indirecta contribuyeron a la realización de este trabajo.

RESUMEN

Debido al creciente desarrollo de resistencia a antibióticos y antimicrobianos, las infecciones bacterianas representan una amenaza cada vez mayor para la salud humana. Las bacterias Gram negativas han adoptado esta característica de forma destacada, y actualmente son consideradas patógenos críticos por su elevada mortalidad y limitada respuesta terapéutica. Una de las estrategias alternativas ante las dificultades asociadas al desarrollo de nuevos antibióticos consiste en el aprovechamiento de compuestos antimicrobianos de origen natural, debido a su potencial para combatir cepas multirresistentes sin los efectos adversos asociados a muchos fármacos convencionales. *Bacillus subtilis* es un organismo modelo reconocido por su capacidad de producir metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas.

El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antagónica de los metabolitos de *B. subtilis* frente a bacterias Gram negativas. Para ello, se utilizaron las cepas 49.1, 49.2 y 49.3, de las cuales se obtuvieron metabolitos secundarios mediante microfiltración. Estos metabolitos fueron empleados en ensayos de antagonismo empleando el método de difusión por goteo, aplicados sobre cultivos de las cepas S5, S9, S10 y S11 de *Salmonella* spp. y de las cepas Sh1, Sh2, Sh3 y Sh6 de *Shigella* spp. Los medios de cultivo utilizados para los ensayos fueron agar LB y agar MacConkey.

Los resultados indicaron la ausencia de actividad antagónica en los ensayos desarrollados en medio agar LB. En contraste, los resultados obtenidos en el medio de cultivo agar MacConkey revelaron inhibición del crecimiento en las cepas S9, S10 y S11 de *Salmonella* spp., así como en todas las cepas de *Shigella* spp. evaluadas. Para corroborar la identidad de las cepas 49.1, 49.2 y 49.3 a la especie de *B. subtilis*, las cepas fueron identificadas mediante la secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S, los porcentajes de identidad indicaron la pertenencia de las tres cepas a esta especie.

ABSTRACT

Due to the increasing development of resistance to antibiotics and antimicrobial agents, bacterial infections represent a growing threat to human health. Gram-negative bacteria have notably acquired this trait and are currently considered critical pathogens due to their high mortality rates and limited therapeutic options. One alternative strategy in response to the challenges associated with the development of new antibiotics is the use of naturally derived antimicrobial compounds, owing to their potential to combat multidrug-resistant strains without the adverse effects commonly associated with many conventional drugs. *Bacillus subtilis* is a well-known model organism recognized for its ability to produce secondary metabolites with antimicrobial activity against pathogenic bacteria.

The objective of this study was to evaluate the antagonistic activity of *B. subtilis* metabolites against Gram-negative bacteria. For this purpose, strains 49.1, 49.2, and 49.3 were used, from which secondary metabolites were obtained through microfiltration. These metabolites were applied in antagonism assays using the drop diffusion method on cultures of *Salmonella* spp. strains S5, S9, S10, and S11, and *Shigella* spp. strains Sh1, Sh2, Sh3, and Sh6. The culture media used for these assays were LB agar and MacConkey agar.

The results showed no antagonistic activity in the assays conducted on LB agar medium. In contrast, the results obtained on MacConkey agar medium revealed growth inhibition in *Salmonella* spp. strains S9, S10, and S11, as well as in all *Shigella* spp. strains tested. To confirm the identity of strains 49.1, 49.2, and 49.3 as *B. subtilis*, they were identified by sequencing the gene encoding 16S rRNA. The identity percentages confirmed that all three strains belonged to this species.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	8
2. MARCO TEÓRICO	10
2.1. Antagonismo microbiano.....	10
2.2. Bacterias Gram negativas.....	10
2.2.1. Comparación de las bacterias Gram positivas y Gram negativas	11
2.2.2. Factores de virulencia presentes en bacterias Gram negativas	12
2.2.3. Mecanismos de resistencia presentes en bacterias Gram negativas	15
2.3. Capacidad antagónica de <i>Bacillus subtilis</i>	16
2.3.1. Características del género <i>Bacillus</i>	17
2.3.1.1. Filogenia.....	17
2.3.1.2. Características morfológicas	18
2.3.1.3. Formación de esporas.....	20
2.3.1.4. Condiciones de crecimiento	22
2.3.2. Uso de <i>B. subtilis</i> como agente de control biológico.....	23
2.3.2.1 Metabolitos producidos por <i>B. subtilis</i>	23
2.3.2.2. Capacidad antagónica de <i>Bacillus</i> contra hongos.....	26
2.3.2.3. Capacidad antagónica de <i>Bacillus</i> contra bacterias	27
3. JUSTIFICACIÓN	29
4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	30
5. HIPÓTESIS	31
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
6.3. Cepas empleadas	32
6.4. Cultivo de cepas de <i>B. subtilis</i>	33
6.5. Extracción de ADN de cepas de <i>B. subtilis</i>	34
6.6. Electroforesis de ADN.....	35
6.7. Protocolo PCR para la amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S	35
6.8. Purificación de muestras y secuenciación	36
6.9. Análisis bioinformático (BLAST, alineamiento múltiple y árbol filogenético) ..	36
6.10. Identificación de fases de esporulación	37
6.11. Microfiltración de los metabolitos producidos por cepas de <i>B. subtilis</i>	38
6.12. Pruebas de antagonismo de los metabolitos producidos por cepas de <i>Bacillus subtilis</i> en cepas de microorganismos Gram negativos.....	38
7. RESULTADOS.....	40
7.1. Cultivo de cepas de <i>B. subtilis</i>	40
7.2. Resultados de Extracción de ADN.....	42
7.3. Amplificación por PCR del gen que codifica para el ARNr 16S	43
7.4. Purificación de los amplificados	44

7.5. Secuenciación de los amplificados	45
7.6. Análisis bioinformático	45
7.6.1. BLAST	45
7.6.2. Alineación y árbol filogenético	46
7.7. Proceso de esporulación	48
7.8. Resultados de pruebas de antagonismo en bacterias Gram negativas	52
7.8.1. Ensayos de antagonismo de los metabolitos producidos por cepas de <i>B. subtilis</i> en cepas de <i>Salmonella</i> spp.....	52
7.8.2. Ensayos de antagonismo de los metabolitos producidos por cepas de <i>B. subtilis</i> en cepas de <i>Shigella</i> spp.....	59
8. DISCUSIÓN	67
10. CONCLUSIONES	71
12. ANEXOS	73
13. REFERENCIAS	77

1. INTRODUCCIÓN

Desde el descubrimiento de los agentes infecciosos, grandes esfuerzos se han dirigido hacia el desarrollo de herramientas para contrarrestar las enfermedades causadas por ellos y preservar la salud humana. Este es el caso de los antibióticos, su descubrimiento fue crucial en el combate de las infecciones causadas por los microorganismos patógenos. Sin embargo, debido a su uso indiscriminado e inadecuado, los microorganismos han desarrollado mecanismos de resistencia ante estos compuestos, convirtiendo a la resistencia a los antimicrobianos en una problemática a nivel mundial. En 2023 la Organización Mundial de la Salud (OMS) emitió una lista de microorganismos de suma importancia debido a su multirresistencia a los antibióticos, los grupos de bacterias Gram negativas multirresistentes mencionados incluyen especies y géneros como *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (World Health Organization, 2024).

Las bacterias Gram negativas son un grupo de organismos que cuentan con diversos mecanismos de resistencia que se van transmitiendo de generación en generación a través de genes, los mecanismos más comunes son la modificación o degradación de antibióticos, eflujo de antibióticos, secuestro de antibióticos, mecanismos de modificación/derivación/protección de objetivos, la resistencia proporcionada por la membrana externa y su capacidad de formar biofilms (Alemu et al., 2023; Cepas & Soto, 2020; Singh et al., 2022). Por lo anteriormente mencionado, antibióticos ya existentes han dejado de ser efectivos contra diversas bacterias Gram negativas, además algunos pueden ser tóxicos para los pacientes que los consumen, por lo que surge la necesidad de encontrar alternativas que sustituyan a los antibióticos tradicionales, y que además disminuyan las desventajas que algunos presentan (Murugaiyan et al., 2022).

Afortunadamente, en los últimos años se les ha prestado mayor atención a los antibióticos naturales, como los que provienen directamente del metabolismo de síntesis de los microorganismos, los cuales presentan características como: mayor efectividad, amplio mecanismo de acción y baja toxicidad (Guedes et al., 2024; Rima et al., 2021). La forma en que estos compuestos actúan sobre el microorganismo blanco es a través de la liberación del antibiótico al medio y debido a que tienen propiedades que afectan al otro microorganismo, éste no puede crecer con libertad. Este fenómeno se cataloga dentro de las interacciones microbianas conocidas como “antagonismo” y como “amensalismo”, en este tipo de interacciones, un organismo se convierte en el responsable de la inhibición del otro, sin que este primero sea afectado ya sea positivamente o negativamente (Lidicker, 1979). Estos compuestos han demostrado una gran efectividad tanto haciendo uso de su forma filtrada y aislada, así como su empleo como probióticos (Erega et al., 2022; Toutiaee et al., 2022).

Bacillus subtilis se encuentra dentro del grupo de las bacterias Gram positivas, cuya capacidad para resistir condiciones extremas se debe a la formación de esporas. En el proceso de esporulación se libera la espora que posteriormente dará lugar a una nueva célula cuando las condiciones ambientales sean las adecuadas, al romperse las células de *B. subtilis* se libera también el contenido interior, que incluye también un conjunto de metabolitos secundarios que se encontraban en el medio intracelular (Madigan et al., 2018). Estos metabolitos son un ejemplo de compuestos antimicrobianos, y se han aprovechado ampliamente contra un conjunto de patógenos (Fessia et al., 2022). Entre los antimicrobianos se encuentran la iturina A, la bacillaena, la bacilisina, el ácido n-hexadecenoico, entre otros (Erega et al., 2021; Erega et al., 2022; Sajayan et al., 2023; Tang et al., 2023). No obstante, a pesar de que las bacterias Gram negativas son el foco principal entre los patógenos más riesgosos cada año, los metabolitos de *B. subtilis* han sido probados principalmente contra organismos del reino Fungi, dejando un gran hueco en la investigación contra bacterias Gram negativas (Huarachi et al., 2022).

En este trabajo de tesis, se busca investigar el efecto antimicrobiano de los metabolitos secundarios producidos por tres cepas de *B. subtilis* contra bacterias Gram negativas. En este caso, los modelos biológicos empleados fueron cepas de los géneros de bacterias *Salmonella* spp. y *Shigella* spp.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Antagonismo microbiano

El antagonismo microbiano se define como un tipo de interacción microbiana que consiste en que un microorganismo libera sustancias al medio cuya capacidad es la de inhibir o afectar el crecimiento de otros microorganismos (Wang, T. et al., 2022). Las relaciones de antagonismo microbiano están presentes en gran diversidad de entornos. En la naturaleza se pueden encontrar varios microorganismos compitiendo por recursos como espacio y nutrientes, otros producen sustancias antimicrobianas que inhiben a sus competidores. En el cuerpo humano también se presentan estas interacciones, en el intestino la microbiota produce sustancias antimicrobianas para mantener el equilibrio y prevenir infecciones. Choudhary et al. (2023) señalan que los microorganismos son fuentes importantes de compuestos bioactivos gracias al antagonismo que presentan con otras especies, ya que de ellos derivan los antibióticos tradicionales, las bacteriocinas, los ácidos orgánicos, los peróxidos, los lipopéptidos y los biosurfactantes.

Las principales áreas de aplicación de las actividades antagónicas, de acuerdo con Choudhary y colaboradores, son:

- Industria farmacéutica: Nuevos antibióticos a partir de metabolitos secundarios
- Terapia probiótica: Uso de bacterias vivas que pueden inhibir el crecimiento de patógenos, así como restaurar la microbiota intestinal y prevenir infecciones gastrointestinales.
- Agricultura: Bacterias antagonistas que inhiben el crecimiento de hongos patógenos y reducen el uso de pesticidas.
- Industria alimentaria: Bacteriocinas que mejoran la seguridad al evitar aditivos químicos.

2.2. Bacterias Gram negativas

2.2.1. Comparación de las bacterias Gram positivas y Gram negativas

Las características de las bacterias Gram negativas son bien definidas y descritas en el libro Brock Biology of Microorganisms de Madigan et al. (2018), por lo que se tomará como principal referencia para exponerlas.

Las bacterias pueden clasificarse en base a la reacción de tinción Gram en dos grupos: Gram positivas y Gram negativas. Si al finalizar el protocolo, las bacterias están teñidas de un color violeta, estas se consideran en el grupo de las Gram positivas, en cambio, si las bacterias están teñidas de color rosa o rojo, se les tomará como pertenecientes al grupo de las Gram negativas. El resultado está directamente relacionado con la estructura que envuelve a las células bacterianas. Mientras que las bacterias Gram positivas cuentan con una pared celular de peptidoglicano bastante robusta, las bacterias Gram negativas conservan una de menor grosor. Además, las bacterias Gram negativas presentan una capa adicional llamada membrana externa, de la cual carecen las bacterias Gram positivas. En la tabla 1 se muestran los elementos fundamentales que conforman la pared celular de las bacterias Gram negativas (Madigan et al., 2018).

Tabla 1. Estructura de la pared celular de las bacterias Gram negativas.

Elaboración propia en base a Madigan et al. (2018).

Componente de la pared celular	Descripción
Peptidoglicano	Capa delgada de peptidoglicano.
Membrana externa	Contiene lipopolisacáridos.
Espacio periplásmico	Se encuentra entre la membrana citoplasmática y la externa.

En el procedimiento de tinción de Gram, las células bacterianas son expuestas al colorante cristal violeta, este tiende a adherirse a la pared celular, sin embargo, debido a su pared celular delgada y membrana externa rica en lípidos, las bacterias Gram negativas pierden este colorante, mientras que las Gram positivas lo conservan. Posteriormente hay una contratinción con safranina, colorante que se adhiere a las bacterias Gram negativas (Madigan et al., 2018).

2.2.2. Factores de virulencia presentes en bacterias Gram negativas

Las bacterias Gram negativas pueden encontrarse en distintos hábitats, desde el suelo hasta el tracto intestinal humano. Por otro lado, los perfiles genéticos de cepas virulentas tienden a ser similares entre sí, incluso entre las que se encuentran en distintas regiones del mundo. Se ha determinado que los plásmidos y elementos transponibles tienen la capacidad de transferirse horizontalmente a otras bacterias (Alemu et al., 2023). Algunos de los genes identificados como responsables de codificar factores de virulencia en bacterias patógenas los cuales se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Genes de bacterias Gram negativas identificados que funcionan como factores de virulencia.

Elaboración propia en base a Alemu y colaboradores (2023), y a Singh y colaboradores (2022).

Gen	Tipo de gen	Descripción
stx1 y stx2	Gen de toxina	Codifican toxinas de Shiga, causa diarrea severa y síndrome urémico hemolítico.
hlyA	Gen de toxina	Codifica una hemolisina, la cual destruye glóbulos rojos.
sea, seb	Gen de toxina	Codifican enterotoxinas estafilocócicas.
eaeA	Factor de adhesión e invasión	Codifica la intimina, facilita adherencia a células epiteliales del intestino.
ipaH	Factor de adhesión e invasión	Relacionado con la capacidad de invasión a células epiteliales intestinales.
fimH, papC	Factor de adhesión y colonización	Codifican proteínas de fimbrias, necesarias para adherirse al huésped.
csgA	Factor de adhesión y colonización	Relacionado con la formación de biopelículas.

invA	Invasión celular	Permite la invasión activa de las células epiteliales
ibeA	Invasión celular	Relacionado con la invasión de la barrera hematoencefálica
LT y ST	Gen de toxina	Alteran el transporte de agua y a los electrolitos, por lo que provocan diarrea.
aggR	Factor de adherencia	Regulador de factores de adherencia, promueve formación de biopelículas.
hlyA, iutA y cnf1	Factor de virulencia	Daña células del huésped.
lss	Evasión inmune	Aumenta la resistencia a la acción de complemento
ompA	Evasión inmune	Interfiere directamente con la respuesta inmune.

Otra característica de las bacterias que influye directamente en su virulencia es la formación de biofilms, ya que a través de ellos hay una mayor dispersión de células que, al colonizar nuevos nichos, facilita la expansión de la infección, así como la liberación de factores de virulencia como son toxinas y enzimas destructivas (Cepas & Soto, 2020). En comparación a su forma planctónica, las bacterias dentro de un biofilm tienen la capacidad de liberar en mayor masa exoproductos, tales como:

- a) **Las proteasas:** degradan proteínas del huésped para recibir nutrientes.
- b) **Las hemolisinas:** dañan células del sistema inmune y eritrocitos, contribuyendo a la evasión inmunológica.
- c) **Los sideróforos:** secuestran hierro, favoreciendo la colonización, el crecimiento y la resistencia de la bacteria,

Esta elevada producción de exoproductos potencia la virulencia del biofilm, permitiendo una colonización más eficiente, evasión del sistema inmune y daño a los tejidos del huésped (Rocha et al., 2023).

Por otro lado, los biofilms pueden facilitar la resistencia a antimicrobianos a través de dos tipos de métodos: los innatos y los inducidos (Cepas & Soto, 2020).

En los **innatos**:

- El uso de la barrera física de la EPS (sustancias poliméricas extracelulares): dificulta la difusión de antibióticos y también puede neutralizar a estas moléculas.
- Existe heterogeneidad metabólica: En las zonas más profundas del biofilm, las células se encuentran en estado dormante, por lo que al no presentarse el crecimiento los antibióticos no pueden actuar y de esa forma se reduce su actividad.
- Brinda protección contra el sistema inmunitario: La EPS tiene la capacidad de bloquear la fagocitosis de macrófagos y neutrófilos.

En los métodos inducidos:

- Favorece la transferencia horizontal de genes: al facilitar el intercambio de plásmidos al haber proximidad celular.
- Se presenta la sobreexpresión de bombas de eflujo: por lo que se pueden expulsar los antibióticos.

Genes que codifican para la resistencia a antibióticos

Algunos genes frecuentemente asociados con la resistencia en bacterias resistentes a antimicrobianos se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Genes de resistencia a antimicrobianos identificados.

Elaboración propia en base a Singh et al., 2022.

Gen	Resistencia
blaCTX-M, blaSHV, blaTEM	betalactamasas
qnrA/B/S	quinolonas
aac(6')-Ib, aph(3')	aminoglucósidos
tetA/B, sul1/2	Tetraciclinas y sulfonamidas

2.2.3. Mecanismos de resistencia presentes en bacterias Gram negativas

Los mecanismos de resistencia más comúnmente identificados en bacterias Gram negativas son los siguientes (Peterson & Kaur, 2018):

- **Modificación o degradación de antibióticos**

Algunas bacterias (principalmente *Enterobacterales*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Acinetobacter baumannii*) producen enzimas que tienen la capacidad de modificar los antibióticos a través de acetilación, fosforilación o adenilación. El objetivo de este proceso es evitar que el antibiótico se una a su diana o cumpla su función. Algunos ejemplos de enzimas modificadoras o degradadoras son las β -lactamasas (capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico de carbapenémicos, cefalosporinas y penicilinas), los aminoglucósido-modificantes (capaces de fosforilar, acetilar y adenilar aminoglucósidos, evitando su unión al ribosoma) y el cloranfenicol acetiltransferasa (capaz de acetilar al cloranfenicol, por lo que ya no se presenta una acción en la síntesis proteica) (Peterson & Kaur, 2018).

- **Eflujo de antibióticos**

Por acción de las bombas de eflujo ubicadas en su membrana, las bacterias pueden bajar la concentración intracelular del antibiótico al bombearlo hacia el exterior. Para llevar a cabo este proceso, suelen utilizar como fuente de energía al gradiente de protones o al ATP. Un ejemplo bien estudiado es la familia de bombas de eflujo pertenecientes a *P. aeruginosa*, que demostraron capacidad para expulsar quinolonas, tetraciclinas y β -lactámicos.

- **Secuestro de antibióticos**

Este mecanismo se define como una captura o neutralización de un antibiótico por acción de compuestos o proteínas pertenecientes a la bacteria, y cuyo objetivo es impedir que llegue a su sitio de acción. Los compuestos suelen degradar o atrapar el antibiótico evitando así que interactúe con su blanco, mientras que las proteínas fijadoras se encargan de unirse y neutralizar al antibiótico. Este proceso resulta en una disminución de la fracción de antibiótico libre activa, tanto fuera como dentro de la célula.

- **Mecanismos de modificación/derivación/protección de objetivos**

Son el conjunto de cambios hechos directamente en el sitio de acción del antibiótico, y cuyo objetivo es impedir su unión. Una modificación de objetivos consiste en la realización de mutaciones en genes que codifican la diana, en la alteración de proteínas fijadoras de penicilina para que se presente una reducción de afinidad con β -lactámicos. Una derivación de objetivos se presenta cuando hay un uso de rutas metabólicas alternativas con el fin de evitar el blanco del antibiótico. Y una protección de objetivos se define como una unión de proteínas a la diana, bloqueando el acceso al antibiótico (Peterson & Kaur, 2018).

- **Membrana externa**

Aunque actúa en conjunto con otros mecanismos de resistencia, tales como las bombas de eflujo y las enzimas inactivadoras, la membrana externa también contribuye a la resistencia a antibióticos al ser una barrera física y química, impidiendo o limitando la entrada a antibióticos. Tiene la capacidad de alterar la estructura de la proteína porina, lo que en consecuencia reduce la permeabilidad y por lo tanto la cantidad de antibiótico que entra se ve considerablemente reducida (Peterson & Kaur, 2018).

2.3. Capacidad antagónica de *Bacillus subtilis*

El género *Bacillus* ha demostrado un enorme potencial en diversas áreas de aplicación gracias a la síntesis de metabolitos secundarios, algunos de estos son antibióticos eficientes, péptidos antimicrobianos, enzimas y antifúngicos. En otras palabras, su capacidad como agente de control biológico es algo que hace destacar al género *Bacillus* (Wulff et al., 2002). Además, se ha reportado que los metabolitos secundarios secretados por esta bacteria pueden promover el desarrollo de la planta hospedera y la resistencia inmunológica en la planta para evitar el crecimiento del patógeno; o la creación de un entorno poco adecuado para el desarrollo del patógeno, derivado de una modificación en la flora microbiana de la rizosfera (Wulff et al., 2002).

2.3.1. Características del género *Bacillus*

2.3.1.1. Filogenia

Este género comprende un conjunto de bacterias que tienen como características generales el ser Gram positivas, cuentan con una morfología de bastoncillos, pueden ser tanto aerobias como anaerobias facultativas y, además, son formadoras de esporas (Wulff et al., 2002). Para la caracterización del género *Bacillus*, a continuación, se retoma principalmente la información descrita en el Bergeys's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria de Logan & Vos (2015), dada su relevancia y detalle sobre los aspectos morfológicos y fisiológicos de este grupo bacteriano.

La filogenia investigada del género *Bacillus* a partir de las secuencias de ADNr 16S, expone aproximadamente 142 especies tal como se muestra en la figura 1 (las especies *Bacillus laevolacticus* y *Bacillus tequilensis* están ausentes en el árbol filogenético).

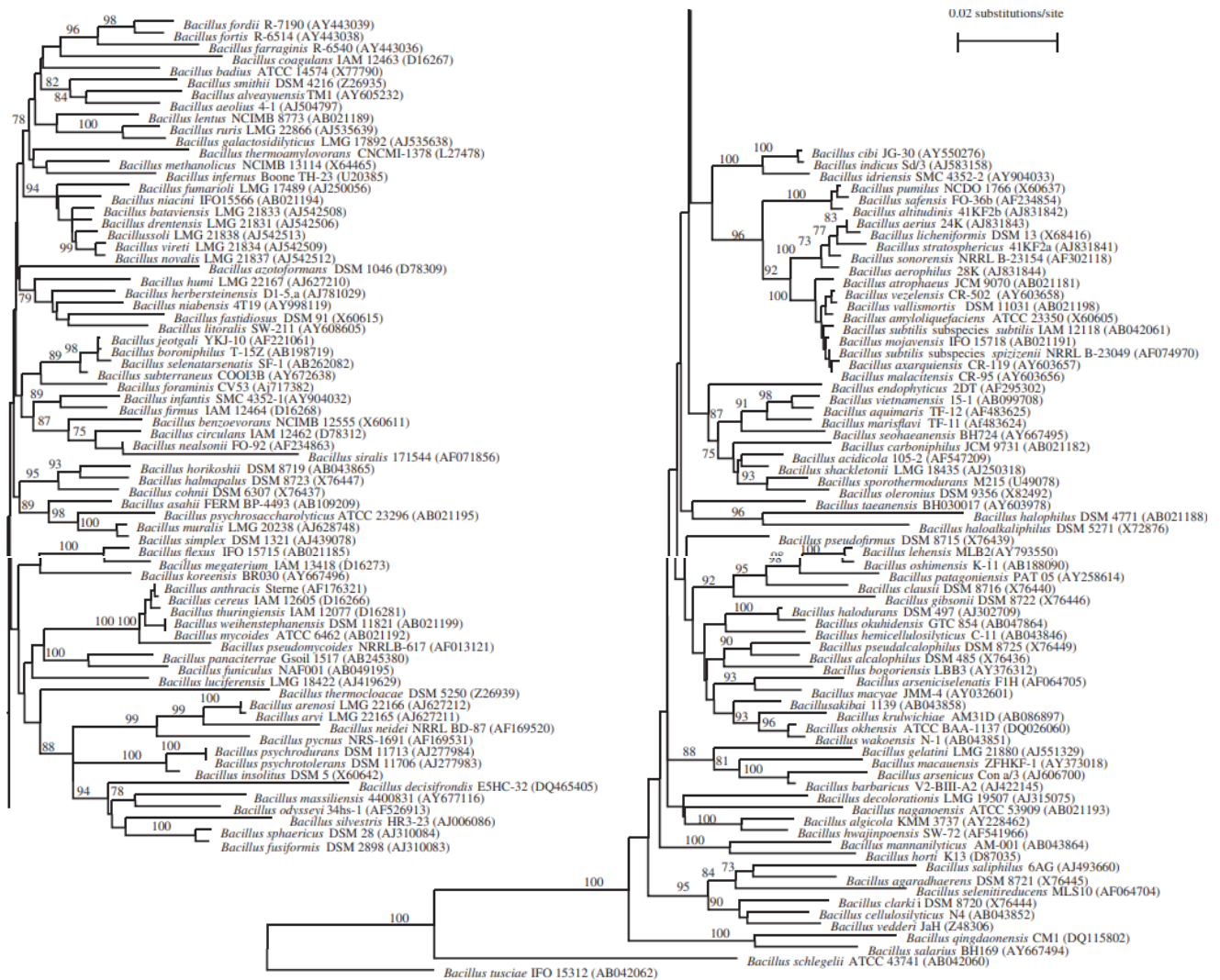


Figura 1. Árbol filogenético del género *Bacillus*.

Tomada de Logan & Vos, (2015).

2.3.1.2. Características morfológicas

La morfología celular presentada como varilla para la especie cuenta con extremos redondeados, con la excepción de *Bacillus cereus*, cuya forma se reporta como cuadrada. El tamaño se describe desde 0.4 a 1.8 μm , para el diámetro, y de 0,9 a 10,0 μm , para la longitud.

El citoplasma de *Bacillus* puede teñirse uniformemente o estar vacuolado (*B. cereus* y *Bacillus megaterium*, entre otros). Las esporas presentan una morfología comúnmente

ovalada, con algunas variaciones dependiendo de la especie (forma de elipse o esférica). Generalmente se ubican en una posición subterminal, aunque en algunas situaciones una cepa puede mostrar variaciones con respecto a la posición de las esporas.

La composición de la pared celular carece de puentes interpeptídicos, en su lugar se tiene un entrecruzamiento DAP-directo, que consiste en un enlace peptídico que va del diaminoácido (posición 3 de una subunidad) al D-Ala (posición 4 de la subunidad peptídica vecina). Aunque las cepas de *B. subtilis* no muestran una producción considerable de cápsulas, se han encontrado los genes codificantes responsables de la producción tanto de cápsulas de ácido poliglutámico, como de cápsulas de polisacárido. Se han encontrado pocos flagelos peritricos en varias especies de *Bacillus*.

Las características morfológicas de las colonias pueden presentar variaciones dependiendo de la especie de la que se trate. En la figura 2, extraída del manual de Bergeys, se muestran algunas imágenes de las colonias de diversas especies de *Bacillus*.

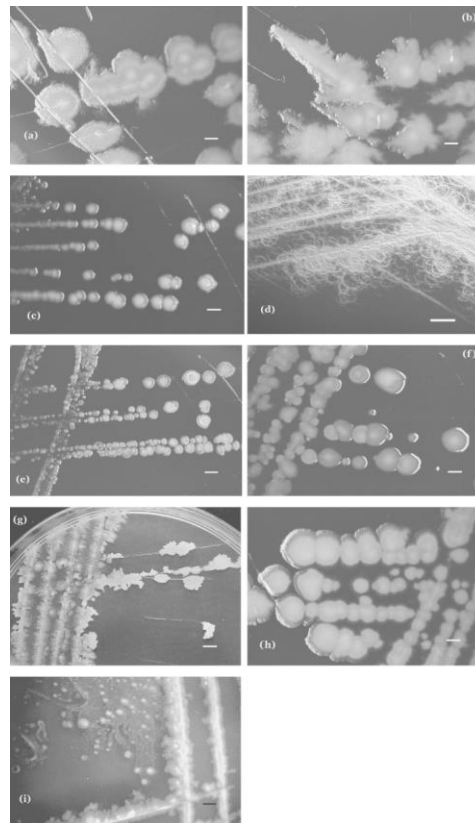


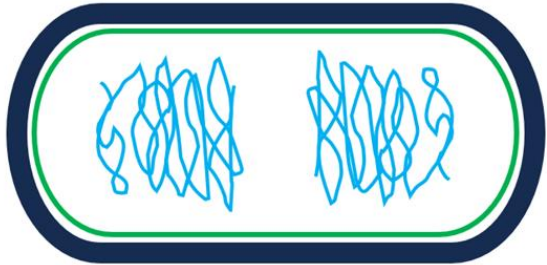
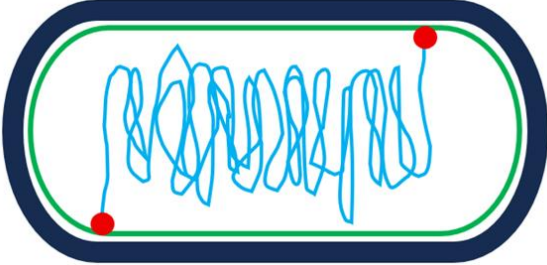
Figura 2. Morfología de colonias de distintas especies de *Bacillus*: (a) *Bacillus anthracis*; (b) *Bacillus cereus*; (c) *Bacillus megaterium*; (d) *Bacillus mycoides*; (e) *Bacillus pumilus*; (f) *Bacillus sphaericus*; (g) *Bacillus subtilis*; (h) *Bacillus thuringiensis*; (i) Microcolonias móviles y extendidas que a veces se observan en cepas de especies de *Paenibacillus*.
Tomada de Logan & Vos (2015).

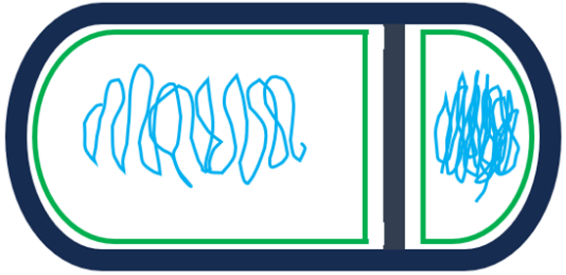
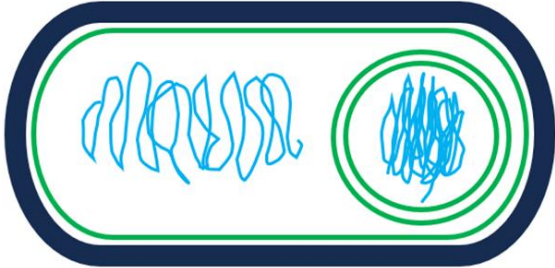
2.3.1.3. Formación de esporas

Bacillus crece y se divide por fisión binaria. Las células hijas pueden separarse o permanecer unidas entre ellas. La presencia de filamentos indica respuesta al estrés. En condiciones óptimas es posible la presencia de células hinchadas.

Al final de la fase exponencial se forman las esporas. Fuera de los factores habituales que afectan cualquier proceso bioquímico (temperatura, pH, presencia de minerales y fuentes de carbono, etc.), estas endosporas pueden aparecer más por falta de nutrientes. Las etapas de esporulación son las siguientes descritas en la tabla 4, cuya duración está alrededor de las 8 horas.

Tabla 4. Fases de esporulación en células de *B. subtilis*.
Elaboración propia en base a Logan & Vos (2015).

Fase	Representación gráfica
Fase 0.	
Fase 1. Formación del filamento axial.	

Fase 2. La membrana de la espora rodea el protoplasto y es separada de la membrana de la célula madre.	
Fase 3. La forespora es rodeada por el citoplasma de la célula madre.	
Fase 4. Comienza a desarrollarse la corteza de la espora, aparece una pared celular ubicada entre las membranas.	
Fase 5. Cubiertas proteínicas de esporas aparecen y salen de la corteza.	
Fase 6. La espora llega a la maduración.	

Fase 7. Se libera la espora madura.	
-------------------------------------	--

Tras tres pasos determinantes (activación, germinación y desarrollo), la espora se transforma en una célula vegetativa. La espora que comienza a germinar provoca el crecimiento de su protoplasto, dando paso a un nuevo periodo de reproducción vegetativa. Este proceso puede o no dejar residuos, dependerá del tamaño de la célula de la especie. También se han presentado apéndices ubicadas en el exosporio de las esporas en algunas especies de *Bacillus* (Logan & Vos, 2015).

2.3.1.4. Condiciones de crecimiento

Para el cultivo de la mayoría de las especies de *Bacillus*, se emplean medios comunes, tales como agar nutritivo, agar tripticasa de soja, agar sangre. Aquellos que no crezcan en dichos medios, presentan la particularidad de ser alcalófilos. Mayoritariamente su principal fuente de energía son la glucosa y carbohidratos derivados de la fermentación, aunque hay otros que no utilizan los carbohidratos y los reemplazan por fuentes de nitrógeno. Las temperaturas mínimas, óptimas y máximas son de variabilidad considerable. La mayoría de las especies son aerobias, y algunas otras son anaeróbicas facultativas. Estas y otras características variables entre especies de *Bacillus* se resumen en la tabla 5, donde se comparan ocho especies representativas del género *Bacillus*.

Tabla 5. Evaluación de distintas características de varias especies de *Bacillus*
Tomada de Logan & Vos, (2015).

Characteristic	2. <i>B. aeolius</i>	33. <i>B. fumarioli</i>	46. <i>B. infernus</i>	56. <i>B. methanolicus</i>	75. <i>B. schlegelii</i>	87. <i>B. thermoamylovorans</i>	88. <i>B. thermocloacae</i>	90. <i>B. tusciae</i>
Motility	+	+	-	-	+	+	-	+
Spore formation:	nd	+	-	+	+	-	d	+
Ellipsoidal	+	+	nd	+	-	nd	+	+
Cylindrical	+	+	nd	-	-	nd	-	-
Spherical	-	-	nd	-	+	nd	-	-
Borne terminally	+	-	nd	-	+	nd	+	-
Swollen sporangia	nd	-	nd	+	+	nd	+	+
Catalase	-	+	-	+	+	+	+	w
Aerobic growth	+	+	-	+	+	+	+	+
Anaerobic growth	-	-	+	-	-	+	-	-
Voges-Proskauer	+	+	nd	nd	-	nd	-	nd
Acid from:								
L-Arabinose	+	- ^c	-	nd	-	+	-	-
D-Glucose	+	+ ^c	+	nd	-	+	-	-
Glycogen	-	- ^c	nd	-	nd	+	nd	-
D-Mannitol	+	+ ^c	nd	+	-	-	nd	-
D-Mannose	+	+ ^c	-	nd	nd	+	-	-
Salicin	+	- ^c	nd	-	nd	+	nd	-
Starch	+	- ^c	nd	-	nd	+	nd	-
D-Xylose	+	- ^c	-	nd	-	+	-	-
Hydrolysis of:								
Casein	+	-	-	-	w	nd	-	nd
Gelatin	+	+	-	nd	-	nd	-	nd
Starch	+	nd	-	d	-	+	-	-
Nitrate reduction	-	-	+	-	+	-	-	+
Growth at pH:								
5	-	+	-	nd	nd	-	-	+
6	-	+	-	-	+	+	-	w
7	+	-	+	+	+	+	-	-
8	+	-	+	nd	nd	+	+	-
9	+	-	-	nd	nd	-	+	-
10	-	-	-	nd	nd	-	-	-
Growth in NaCl:								
2%	+	nd	+	d	+	nd	+	-
5%	+	nd	+	-	-	nd	w	-
7%	-	nd	+	nd	-	nd	-	-
10%	-	nd	+	nd	-	nd	-	-
Growth at:								
30 °C	-	+	-	-	-	nd	-	-
40 °C	+	+	-	+	-	nd	+	-
50 °C	+	+	+	+	+	+	+	+
55 °C	+	+	+	+	+	+	+	+
60 °C	+	-	+	+	+	-	+	nd
65 °C	+	-	-	-	+	-	+	-
70 °C	-	-	-	-	+	nd	-	-
Optimum growth temperature (°C)	55	50	61	55	70	50	55-60	55
Autotrophic with H ₂ + CO ₂ or CO	-	-	-	-	+	-	-	+

2.3.2. Uso de *B. subtilis* como agente de control biológico

2.3.2.1 Metabolitos producidos por *B. subtilis*

Los metabolitos secundarios más estudiados pertenecen a los sintetizados por *B. subtilis*, cuya clasificación es presentada por Iqbal et al. (2023) en seis tipos de la siguiente manera:

1) Péptidos no ribosómicos (NRP), son sistemas moleculares de ensamblaje que emplean complejos enzimáticos multimodulares en vez de utilizar una plantilla de ADN para la síntesis de proteínas. Incluyen NRP de tio-plantilla, se clasifican en: lipopéptidos cíclicos (surfactinas, iturinas, fengicinas, kurstakinas, plipastatinas), lipopéptidos lineales (gageopéptidos, sideróforos). Y NRP sin plantilla de tio (rizotocinas, bacilisininas, clorotetaína, micobacilina y bacitracina), cuya actividad antibacteriana y antifúngica es destacable. L-anticapsina muestra ser la responsable de la actividad antibacteriana, al inhibir la síntesis de glucosamina-6 fosfato, y, por su parte, anticapsina inhibe la síntesis de quitina y manoproteínas en las membranas celulares de algunos hongos como *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans* (Caulier et al., 2019; Chmara et al., 1984).

2) Péptidos ribosómicos (RP), estos compuestos se generan a partir de un péptido precursor de longitud relativamente reducida y experimentan un proceso de maduración mediante modificaciones postraduccionales. Se dividen en dos clases, cuya principal diferencia radica en que la clase I es modificada después de la traducción mientras que la clase II carece de eso. La clase I comprende los iantipéptidos, péptidos de lazo, sactipéptidos, péptidos que contienen azol lineal (LAP), tiopéptidos y péptidos cíclicos. Mientras que a la clase II la constituyen los péptidos similares a la pediocina, otros péptidos no modificados y grandes péptidos antimicrobianos (Iqbal et al., 2023).

3) Policétidos (PK), metabolitos con un grupo metileno y carbonilo alternativo. Estos metabolitos están clasificados en polienos (difcidina, aurantinina y macrolactinas) y en eneidiinos (aplicación muy reducida debido a su citotoxicidad alta) (Iqbal et al., 2023).

4) Metabolitos híbridos, tienen la característica de combinar las enzimas modulares de los policétidos y los péptidos no ribosómicos. Comprenden los bacillaenos (inhiben crecimiento de hongos y bacterias al inhibir la síntesis de proteínas), y las isocumarinas (amicoumacinas, bacilosarcinas, damxungmacinas, hetiamacinas) (Iqbal et al., 2023).

5) Metabolitos volátiles, tienen la particularidad de que, al tener bajo peso molecular, sean fácilmente movibles hacia el organismo objetivo. Se dividen en inorgánicos y orgánicos (terpenos y terpenoides, metabolitos con nitrógeno, metabolitos con azufre, bencenoides, cetonas, metabolitos de hidrocarburos, ácidos orgánicos) (Iqbal et al., 2023).

6) Metabolitos varios, involucran metabolitos que no pueden identificarse con ninguna de las clasificaciones antes mencionadas y que, dicho sea de paso, son pocos. Un ejemplo es la bacilisocina.

Algunos otros artículos incluyen a las **enzimas AMP**, que constituyen las enzimas líticas y las enzimas involucradas en la extinción del quórum, donde entran celulasas, glucanasas, proteasas y quitinasas, y cuya funcionalidad destaca contra hongos (Caulier et al., 2019).

Otra clasificación es la presentada por Tran et al. (2022) que se centra en el enfoque de acción antimicrobiana, tomando como eje el mecanismo de acción:

- 1) **Metabolitos dirigidos a pared celular**, un ejemplo es la bacitracina, que inhibe la formación de biopelículas de *Streptococcus mutans* porque afecta directamente los genes responsables de la división celular. Otro ejemplo es la clorotetaína, que demostró ser útil contra *Candidas* spp. y *Aspergillus niger*. Por su parte, la kanosmina es un buen antagonista para la *Candida albicans*. La subtilina y mersacidina son eficientes contra bacterias Gram positivas (Tran et al, 2022).
- 2) **Metabolitos dirigidos a la membrana plasmática**, ejemplos son la ϵ -Poly-L-lisina (eficiente contra bacterias patógenas Gram positivas y Gram negativas, y hongos), la octapeptina (eficiente contra bacterias Gram negativas, y en menor medida contra bacterias Gram positivas y hongos), la miriocina (eficiente contra hongos), la gramicidina (eficiente contra bacterias Gram positivas), entre otros.
- 3) **Metabolitos dirigidos a procesos intracelulares**, los ejemplos son la zwittermicina A (antagonista de bacterias Gram positivas, Gram negativas y hongos), la diffididina (antagonista contra cepas Gram positivas y negativas), las amicoumacinas (propiedades antibacterianas, antifúngicas y antiinflamatorias), la tiocilina (antagonista de bacterias Gram positivas y Gram negativas).
- 4) **Metabolitos que interactúan con otros objetivos emergentes**, afectan directamente la detección de quórum, algunos ejemplos son la estigmatelina Y o los sideróforos.

2.3.2.2. Capacidad antagónica de *Bacillus* contra hongos

Los metabolitos sintetizados por *B. subtilis* incluyendo los intracelulares y los extracelulares, han sido ampliamente estudiados por su efecto contra hongos patógenos, y se ha demostrado que su actividad antifúngica es de amplio espectro, por lo que pueden inhibir o afectar el crecimiento de una gran variedad de especies de hongos (Matloub et al., 2020). A continuación, se mencionan varios ejemplos de la actividad antagónica de los metabolitos sintetizados por *B. subtilis* en contra de hongos fitopatógenos:

- En el estudio realizado por Wekesa et al. (2024) se probaron las cepas de *B. subtilis* TW21, NSB7 y TR6, para evaluar su eficacia en contra de *Rhizoctonia solani*. Los resultados fueron positivos, mostrando inhibición del hongo y se identificaron los metabolitos: 3-heptanona, 5-ethyl-4-, pirrol [1,2-a] pirazina-1,4-diona, hexahidro, 9-octadeceno-1-ol, (Z)-, ciclononasiloxano, octadecametil- y el ácido bencenoacético como los principales metabolitos responsables.
- Tang et al. (2023) señalaron a la iturina A como un potente componente antifúngico que interactúa con moléculas de esteroides en las membranas celulares de los hongos, que altera la permeabilidad de la membrana, induce fugas de potasio, e incluso puede destruir células patógenas. En su estudio, la infección ocasionada por el hongo *Verticillium wilt* fue inhibida por la iturina A.
- Grover et al. (2009) compararon el efecto antimicrobiano de la cepa RP24 de *B. subtilis* contra mutantes de ésta misma con el objetivo de detectar los mecanismos responsables del antagonismo contra un hongo fitopatógeno, *Macrophomina phaseolina*, observando dos posibles mecanismos de inhibición, la producción de metabolitos volátiles antifúngicos y la producción de antibióticos difusibles extracelulares (lipopéptidos cíclicos pertenecientes al grupo de antibióticos peptídicos de la iturina).
- En otro estudio, Mardanova et al. (2016) evaluaron la actividad antifúngica de dos cepas de *B. subtilis* frente a hongos fitopatógenos, ambas cepas produjeron metabolitos antimicrobianos como el amoníaco y HCN. Una de las cepas también produjo sideróforos (no correlacionado con la actividad antifúngica) y se encontró que promovió el crecimiento del trigo, la otra cepa protegió las plántulas de trigo de la infección por *Fusarium oxysporum*. El análisis sugirió que la principal actividad antifúngica está asociada con los metabolitos termoestables. Se destacan los lipopéptidos cíclicos (CLP) como excelentes protectores de las plantas hospedantes de varios patógenos. Las fengicinas pudieron inhibir específicamente el crecimiento de hongos filamentosos. El estudio sugirió que la actividad antifúngica pudo deberse a la alteración de la pared celular del hongo estudiado y la inhibición del desarrollo normal de conidios.
- Zhang y Sun (2018) evaluaron la actividad antifúngica de la cepa BS155 de *B. subtilis* contra *Magnaporthe grisea*, un peligroso hongo que afecta los cultivos

de arroz mundialmente. Encontrando resultados favorables en donde se destaca la presencia de lipopéptidos cíclicos pertenecientes a las fengicinas. Las fengicinas BS155 afectó directamente la membrana plasmática produciendo daño, aunado al estrés oxidativo, la condensación de la cromatina y se indujo la muerte de las células hifales de *M. grisea*.

- Cawoy et al. (2015) destacaron la importancia de los lipopéptidos no ribosómicos asociados con el efecto antagonista contra cuatro hongos fitopatógenos. Concluyendo que la surfactina no tuvo una participación directa considerable contra los fitopatógenos, pero que indirectamente beneficia al hospedero induciendo inmunidad, y ayuda al establecimiento de *B. subtilis* en el medio.
- Algunos estudios investigaron el efecto de otras especies del género *Bacillus*. Arguelles-Arias et al. (2009) analizaron a *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 y su potencial antibiótico contra hongos fitopatógenos. Se encontró la producción de lipopéptidos cíclicos: surfactina, iturina A, fengicina A y fengicina B. La surfactina y la iturina promovieron la colonización de las raíces de las plantas. Por su parte, las iturinas y las fengicinas destacaron como antagonistas a hongos. Las surfactinas ayudaron a la iturina A en su actividad antifúngica, más no mostraron una acción contra los hongos por sí misma. La bacilisina inhibió el crecimiento de *E. amylovora* y *Absidia* ssp. También hubo presencia de clorotetaína, con actividad antimicrobiana parecida a la bacilisina.

2.3.2.3. Capacidad antagónica de *Bacillus* contra bacterias

Se ha investigado el potencial de los metabolitos producidos por bacterias del género *Bacillus* contra bacterias, a continuación, se mencionan algunos estudios:

- Wulff et al. (2002) evaluaron tres especies de *Bacillus*: *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* y *B. pumilus*, contra *Xanthomonas campestris*. Se encontró la biosíntesis de los metabolitos surfactina y artrobactina para *B. subtilis*, en *B. pumilus* se reportó la síntesis de surfactina, anfomicina, artrobactina y valinomicina.
- Almoneafy et al. (2014) utilizaron las cepas *B. amyloliquefaciens* D29, *B. amyloliquefaciens* Am1, *B. subtilis* D16 y *B. methylotrophicus* H8 y las evaluaron contra *Ralstonia solanacearum* con el objetivo de descubrir los mecanismos por los cuales estas cepas actúan de forma antagónica contra la bacteria. Determinaron que las cuatro cepas contaban con los genes responsables de la síntesis de bacilomicina, fengicina, iturina, surfactina y bacilisina. El crecimiento de *R. solanacearum* se vio inhibido, destacando el daño considerable a su pared celular que provocó posteriormente la muerte celular.
- En *B. amyloliquefaciens* GA1, Arias et al. (2013) encontraron un nuevo antibiótico poco frecuente en el género *Bacillus*, la amilolisina, cuya descripción aún es nueva en comparación al resto de antibióticos descritos a la fecha.

- Otras bacterias pertenecientes al género *Bacillus* han demostrado ser eficientes contra diversos patógenos: *B. amyloliquefaciens* fue efectiva contra *L. monocytogenes*, *B. cereu* contra *Serratia marcescens* y *Pasteurella haemolytica*; *Brevibacillus brevis* inhibió el desarrollo de *S. aureus*, *Micrococcus luteus*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium xerosis* y *Corynebacterium hoffmanni*; por otra parte *B. clausii* fue efectiva contra *S. aureus*, *Enterococcus faecium* y *Clostridium difficile*; entre otros (Abriouel et al., 2011).
- Zhao et al., (2024) evaluaron la eficacia de los metabolitos de *B. subtilis* en forma de probióticos en contra de la periodontitis experimental causada por *Porphyromonas gingivalis*. Los metabolitos clave identificados fueron el mesaconato y el citraconato, al demostrar una inhibición en la formación y maduración de las biopelículas de *P. gingivalis*, por lo que se redujeron los niveles de esta bacteria y la pérdida de tejidos en los ratones de laboratorio.
- Tamilarasu et al. (2021) también estudiaron la capacidad de *B. subtilis* en forma de probiótico, para aumentar el rendimiento del crecimiento y las respuestas fisiológicas del camarón *Penaeus vannamei*. Se encontró que *B. subtilis* y *Bacillus cereus* mostraron capacidad de inhibición contra las bacterias *Vibrio parahaemolyticus* y *V. alginolyticus*.
- Sajayan et al. (2023) encontraron que el metabolito n- hexadecenoic de *B. subtilis* inhibió la generación de biofilm de *P. aeruginosa*.
- Otro estudio demostró que la bacillaena cumple un papel fundamental en el efecto inhibitorio contra *Campylobacter jejuni*, ya que, al alterar el gen de producción de este compuesto, la inhibición se redujo considerablemente (Erega et al., 2021). Y posteriormente se encontró que la bacilisina también es importante en la inhibición. Ambos compuestos inhiben el crecimiento y la formación de biopelículas en *C. jejuni* (Erega et al., 2022).
- Un aspecto importante reportado es que existen algunos inhibidores de especies de *Bacillus* como el 2,4-diacetilfloroglucinol que, a pesar de ser también un antibiótico, se demostró que su combinación con *B. subtilis* no era favorable, ya que inhibe su esporulación y la formación de biopelículas (Andrić et al., 2020). Otro caso es el del ácido fusárico, producido por *Fusarium verticillioides*, y que convierte a este hongo patógeno en resistente a especies del grupo *Bacillus*, al inhibir su crecimiento (Bacon et al., 2006).

3. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, se ha reportado un incremento de la resistencia a los antibióticos en las bacterias, representando un mayor riesgo para la salud a nivel global, (Tamilarasu et al., 2021, Nasr et al., 2024). Se prevé que, para 2050, la resistencia a

los antimicrobianos causará 10 millones de muertes anuales (Murugaiyan et al., 2022); y se estima que, para antes del 2060, serán necesarios al menos 20 nuevos antibióticos, sin embargo, esto es una meta difícil de alcanzar, ya que el desarrollo de nuevos fármacos toma varios años y es altamente costoso (Guedes et al., 2024).

Se define a la multirresistencia como la capacidad de ciertos microorganismos para resistir la acción de un amplio espectro de antibióticos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó una alerta con respecto a las bacterias multirresistentes, entre las que se encuentran *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Mycobacterium tuberculosis* resistente a rifampicina, *Acinetobacter baumannii* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, además en la actualidad también se ha reportado un incremento preocupante en la resistencia a fluoroquinolonas en *Salmonella Typhi* y *Shigella* (Organización Mundial de la Salud, 2024).

Algunas estrategias contra la resistencia a los antimicrobianos incluyen el empleo de bacteriófagos, terapias basadas en CRISPR-Cas, antibióticos rediseñados, nanotecnología, terapias combinadas (Murugaiyan et al., 2022). No obstante, existen grandes desventajas, como son los costos elevados de desarrollo, regulaciones estrictas, falta de ensayos clínicos avanzados, baja estabilidad y posibles efectos secundarios (Murugaiyan et al., 2022; Rima et al., 2021; Liang et al., 2024; Ji et al., 2024).

Otras alternativas naturales, incluyen compuestos bioactivos de plantas, hongos, microbios y animales, las cuales podrían considerarse menos complejas, fácilmente costeables y altamente eficaces (Guedes et al., 2024). Un ejemplo de estas son los péptidos antimicrobianos (AMPs), que son moléculas que forman parte de los organismos vivos y que han demostrado tener un amplio espectro de acción, una gran variedad de mecanismos y baja toxicidad (Rima et al., 2021).

Dada la importancia en la actualidad del empleo de compuestos antimicrobianos de origen bacteriano contra la multirresistencia a los antibióticos, en esta investigación se plantea el uso de metabolitos secundarios sintetizados por cepas de *Bacillus subtilis* contra las bacterias Gram negativas del género *Salmonella* spp y *Shigella* spp resistentes a antibióticos.

4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad antagónica de metabolitos secretados por cepas de *Bacillus subtilis* contra bacterias Gram negativas.

OBJETIVO ESPECÍFICOS:

- Identificar molecularmente la cepa de *B. subtilis* 49.1, 49.2 y 49.3.
- Cultivar cepas de *B. subtilis* (49.1, 49.2 y 49.3) y obtener los metabolitos de interés en la fase estacionaria de desarrollo microbiano.
- Realizar ensayos de inhibición de los metabolitos producidos por cepas de *B. subtilis* en cepas de *Salmonella* spp.
- Determinar la actividad antagónica de los metabolitos producidos por cepas de *B. subtilis* en cepas de *Shigella* spp.

5. HIPÓTESIS

Los metabolitos sintetizados y secretados por las cepas 49.1, 49.2 y 49.3 de *B. subtilis* tendrán capacidad antagónica contra cepas de bacterias Gram negativas pertenecientes a *Salmonella* spp y *Shigella* spp.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.3. Cepas empleadas

Las cepas de *B. subtilis* empleadas (49.1, 49.2 y 49.3) fueron aisladas previamente de la rizósfera de plantas medicinales (Díaz-Becerra, 2018) y fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas como pertenecientes a la especie *B. subtilis*, la cepa 49.1 fue además identificada mediante proteómica y secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S (Amaya- Zambrano, 2023), las tres cepas pertenecen a la colección del Laboratorio de Microbiología 402 del Edificio EMA-6 de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y se indican en la tabla 6.

Tabla 6. Cepas de *B. subtilis* empleadas.

Nombre de las cepas empleadas de <i>B. subtilis</i>	Origen
49.1	Rizósfera de planta medicinal (Díaz-Becerra, 2018)
49.2	Rizósfera de planta medicinal (Díaz-Becerra, 2018)
49.3	Rizósfera de planta medicinal (Díaz-Becerra, 2018)

Elaboración propia

Las bacterias empleadas del género *Salmonella* fueron aisladas previamente de muestras de agua del Río Nexapa (Vásquez-Jiménez, 2024), fueron identificadas como pertenecientes al género *Salmonella* mediante pruebas bioquímicas (Serrano-Hernández, 2025) y pertenecen a la colección de microorganismos del Laboratorio de Microbiología 402 del Edificio EMA-6 y se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Cepas de *Salmonella* spp. empleadas.

Nombre de las cepas empleadas	Origen
S5	Río Nexapa (Vásquez- Jiménez, 2024)
S9	Río Nexapa (Vásquez- Jiménez, 2024)
S10	Río Nexapa (Vásquez- Jiménez, 2024)
S11	Río Nexapa

Elaboración propia

Las cepas del género *Shigella* empleadas, también fueron aisladas del agua del río Nexapa, las cepas Sh1 y Sh2 fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas (Serrano-Hernández, 2025) y se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Cepas de *Shigella spp.* empleadas

Nombre de las cepas empleadas	Origen
Sh1	Río Nexapa (Vásquez- Jiménez, 2024)
Sh2	Río Nexapa (Vásquez- Jiménez, 2024)
Sh3	Río Nexapa (Vásquez- Jiménez, 2024)
Sh6	Río Nexapa (Vásquez- Jiménez, 2024)

Elaboración propia

6.4. Cultivo de cepas de *B. subtilis*

Cada cepa de *B. subtilis* fue resembrada con dos propósitos principales: realizar la extracción de ADN para su identificación molecular y obtener los metabolitos secundarios para realizar los ensayos de antagonismo. Los medios de cultivo empleados se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Medios de cultivo empleados.

Medio de cultivo	Composición por litro
LB agar	NaCl 10 g, Extracto de Levadura 5 g, Peptona de Caseína 10 g. Agar Bacteriológico 15 g
Tris G	Según instrucciones del fabricante (anexo 6)

Salmonella Shigella agar	Extracto de carne 5 g, Citrato de sodio 8.5 g, Mezcla de peptonas 5 g, Tiosulfato de sodio 8.5 g, Lactosa 10 g, Citrato férrico 1g, Mezcla de sales biliares 8.5 g, Rojo neutro 0.025 g. Verde brillante 0.0003 g, Agar bacteriológico 13.5 g
MCD LAB	
MacConkey agar	Digerido pancreático de gelatina 17 g, Sales biliares 1.5 g, Digerido péptico de tejido animal 1.5 g, Cloruro de sodio 5 g, Digerido pancreático de caseína 1.5 g, Cristal violeta 0.001 g, Lactosa 10 g, Agar bacteriológico 13.5 g, Rojo neutro 0.03 g. pH 7.1 ± 0.2 a 25°C.
MCD LAB	

Elaboración propia

6.5. Extracción de ADN de cepas de *B. subtilis*

Las cepas de *B. subtilis* fueron sembradas en medio LB agar y se incubaron en condiciones controladas (30 °C) por 24 horas. Una vez transcurrido ese tiempo, cada cepa fue inoculada con un asa bacteriológica en tubos de ensayo tipo Falcon conteniendo 3 mL del medio de cultivo LB, los tubos fueron incubados en una incubadora con agitación durante 24 horas a 30 °C. Concluido este tiempo se llevó a cabo el siguiente procedimiento para cada una de las cepas: Se vertieron 1.5 mL del cultivo en un microtubo de polipropileno estéril que posteriormente se centrifugó por 10 minutos a 11000 rpm. El precipitado resultante fue resuspendido con 150 µL de buffer de lisis y 30 µL de lisozima y fue incubado a 37 °C por 30 minutos. Transcurrido ese tiempo se le agregó 22 µL de sarcosil al 20% y 175 µL de solución fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. El microtubo se invirtió por 5 minutos hasta que se aclaró la solución, se centrifugó por 10 minutos a 11000 rpm. La fase acuosa resultante fue transferida en un microtubo estéril nuevo al que se le agregó 1 volumen de solución fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. El microtubo fue nuevamente invertido y centrifugado una vez más transfiriendo la fase acuosa. Luego se le agregó 1 volumen de cloroformo, se centrifugó por 10 minutos a 11000 rpm y se transfirió la fase acuosa a otro microtubo, esto se repitió dos veces. La solución se colocó en hielo y se le agregó 0.1 volúmenes de acetato de sodio 10 % (3M, pH 7) y 1 volumen de etanol absoluto. Los tubos se colocaron a -20 °C por 10 minutos y posterior a ese tiempo se centrifugó por 10 minutos a 11000 rpm. La pastilla resultante fue lavada con etanol al

70% y se decantó el sobrenadante. Finalmente se dejó secar el etanol por 24 horas, la pastilla se resuspendió con 20 µL de agua libre de nucleasas y se almacenó a -20 °C para su uso posterior.

6.6. Electroforesis de ADN

Las muestras de ADN extraídas de las tres cepas de *B. subtilis* fueron sometidas a una electroforesis en gel de agarosa para confirmar la correcta extracción del material genético. Para dicho propósito, se siguió el siguiente procedimiento: En un matraz Erlenmeyer se preparó la agarosa a una concentración de 0.8% con TBE 0.5X. Una vez solidificada se colocaron en los pocillos 2 µL del marcador de peso molecular, el cual se mezcló con 1 µL de colorante, para después colocarlo en el primer pocillo. Para cada una de las muestras de ADN extraído de las cepas de *B. subtilis*, se tomaron 3 µL (90 ng) de muestra y se mezclaron con 1 µL de colorante. Esta solución se colocó en los pocillos en el siguiente orden: 49.1, 49.2, 49.3. Una vez colocadas todas las muestras la electroforesis se llevó a cabo a 90 V durante 50 minutos. Completado el tiempo de electroforesis, el gel de agarosa fue teñido en una solución con bromuro de etidio. Finalmente, el gel de agarosa fue visualizado en un transiluminador UV.

6.7. Protocolo PCR para la amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S

Se hizo una PCR de las muestras de ADN extraído siguiendo el presente protocolo:

Para la realización del procedimiento, se colocaron todos los reactivos y muestras en un rack refrigerante para tubos. En un tubo de PCR, se hizo un mix de trabajo para cada muestra de ADN extraído con la siguiente composición (tabla 10):

Tabla 10. Composición del mix de trabajo para un volumen final de 100 µL.

Reactivo	Cantidad
Primer F (TX BA 1)	2 µL
Primer R (TX BA 101)	2 µL

ADN (120 ng)	8 µL
Super mix 10X (OnePCR Ultra)	50 µL
Agua libre de nucleasas	38 µL
Elaboración propia	

Posteriormente se transfirieron los tubos al termociclador y se llevó a cabo la PCR en las siguientes condiciones: desnaturalización a 95 °C durante 1:30 min, seguido de 94 °C por 30 seg, alineamiento a 54°C por 45 seg, extensión a 72 °C por 2 min durante 30 ciclos. Al finalizar el proceso, se realizó una electroforesis de las muestras de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente.

6.8. Purificación de muestras y secuenciación

La purificación de los productos de amplificación fue llevada a cabo mediante un sistema de purificación comercial (Wizard SV Gel and PCR Clean-up System, Promega), de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante. Las muestras fueron enviadas al laboratorio externo LANGEBIO-CINVESTAV, Irapuato, para su secuenciación, acompañadas del formato requerido por el proveedor con los datos de identificación y concentración de cada muestra.

6.9. Análisis bioinformático (BLAST, alineamiento múltiple y árbol filogenético)

Las secuencias obtenidas se ingresaron a la herramienta BLAST de la plataforma del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information, NCBI), para verificar la identidad de las cepas 49.1, 49.2 y 49.3 como *B. subtilis*.

La historia evolutiva se infirió utilizando el método de Neighbor-Joining. Se muestra el árbol óptimo con una longitud total de ramas = 2.230. Las distancias evolutivas se calcularon mediante el método de Máxima Verosimilitud Compuesta y se expresan en unidades del número de sustituciones de bases por sitio. El procedimiento analítico abarcó 84 secuencias de nucleótidos, incluidas las 3 secuencias de estudio. Se aplicó

la opción de eliminación por pares a todas las posiciones ambiguas para cada par de secuencias, resultando en un conjunto de datos final que comprende 2,046 posiciones. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA12.

6.10. Identificación de fases de esporulación

Los cepas de *B. subtilis* fueron resembradas en tubos conteniendo 3 mL de medio de cultivo Tris G. Los tubos se dejaron en incubación a una temperatura de 30 °C, y agitación lenta por varios días y se tomaron muestras cada semana para la identificación de las fases de esporulación de los cultivos. Para ello se hizo uso de dos métodos de tinción: tinción con azul de metileno y tinción con verde de malaquita para la observación diferencial de las esporas.

1) Protocolo tinción azul de metileno:

En condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar, se agitó ligeramente el tubo de ensayo y así se homogeneizó la densidad de las células en todo el cultivo. Posteriormente se tomaron 90 µL del cultivo y se depositó en un portaobjetos limpio. El portaobjetos con la muestra se pasó sobre la llama de la lámpara de alcohol, hasta que el inóculo se secó y quedó adherido al portaobjetos. Posteriormente se agregó una o dos gotas de azul de metileno al portaobjetos cubriendo por completo la muestra y finalmente se colocó el cubreobjetos y fue observada en el microscopio.

2) Protocolo tinción verde de malaquita:

En condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar, se agitó ligeramente el cultivo y se homogeneizó la densidad de las células en todo el cultivo. Con una micropipeta se colocaron 90 µL del cultivo en un portaobjetos limpio, se agregaron una o dos gotas de verde de malaquita cubriendo por completo la muestra, el portaobjetos se pasó por la flama del mechero hasta que se presentó la ebullición, posteriormente se lavó con agua destilada y se agregaron unas cuantas gotas de safranina, se dejó teñir por aproximadamente 10 minutos. Para finalizar se lavó el portaobjetos con agua destilada, se le colocó el cubreobjetos y se observó en el microscopio.

6.11. Microfiltración de los metabolitos producidos por cepas de *B. subtilis*

Los cultivos confirmados en estado de esporulación y con presencia de esporas libres en el medio, fueron seleccionados para el proceso de microfiltración. El protocolo fue el siguiente:

En condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar, se agitó ligeramente el cultivo contenido en tubos de ensayo, se tomaron 3 mL con jeringas nuevas y estériles, este volumen fue microfiltrado con filtros de jeringa de 13 mm y un tamaño de poro de 0.22 μm , posteriormente los metabolitos microfiltrados fueron colectados en un nuevo tubo de ensayo. Este procedimiento separará productos mayores a 0.22 μm , como células muertas o vivas y esporas, permitiendo el paso a metabolitos que cuentan con un tamaño menor.

6.12. Pruebas de antagonismo de los metabolitos producidos por cepas de *Bacillus subtilis* en cepas de microorganismos Gram negativos

El primer paso para las pruebas de antagonismo fue la preparación de muestras con una concentración de células adecuada tanto para las cepas de *Shigella* y de *Salmonella*. Para ello se cultivó en medio LB un inóculo de cada una de estas bacterias, y se dejó en incubación por 24 horas. A cada uno de estos nuevos cultivos se les tomó una muestra de un volumen de 100 μL y se realizaron diluciones seriadas: 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} . Los tubos fueron comparados con la escala de McFarland, se seleccionó el factor de dilución que fuera similar al tubo de 0.5 de la escala. El procedimiento para realizar las pruebas de antagonismo fue el siguiente: Se dividieron las cajas de Petri con medio de cultivo en cuatro partes iguales: 49.1, 49.2, 49.3 y el control. En condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar, se tomaron 90 μL del cultivo de la cepa de la bacteria Gram negativa a probar (dilución aproximada al tubo de 0.5 de la escala de McFarland), el inóculo fue distribuido uniformemente sobre la superficie del medio mediante siembra por extensión en placa utilizando un asa de Drigalski previamente esterilizada, hasta que el medio absorbió completamente la muestra, ésto se hizo para cada una de las cajas de Petri, las cuales se dejaron en incubación por 60 minutos. Posteriormente, se colocaron 15 μL de cada uno de los metabolitos secundarios microfiltrados, y se colocó ese volumen por triplicado en el lugar correspondiente. La sección control no llevó ninguna muestra (figura 3). Se esperó hasta que las muestras de los metabolitos secundarios fueran absorbidas por el medio de cultivo y finalmente se incubaron las cajas de Petri durante 24 horas. Este procedimiento se repitió dos veces para cada género de bacteria Gram negativa, debido a que se utilizaron dos medios nutritivos diferentes: medio LB agar y medio MacConkey agar.

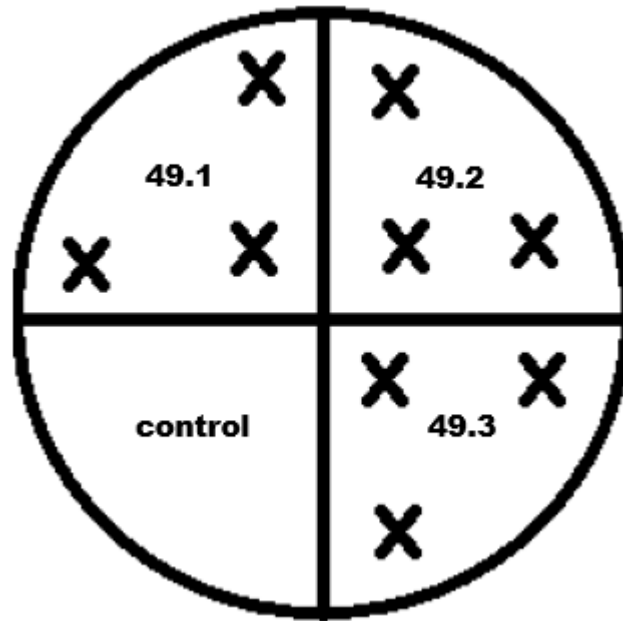


Figura 3. Esquema del ensayo de antagonismo de los metabolitos producidos por *B. subtilis* en cepas de bacterias Gram negativas.

“X” representa cada sección donde se colocaron 3 gotas de 15 μ L de los metabolitos de cada cepa de *B. subtilis*. En la sección “control” no se colocaron metabolitos.

Elaboración propia.

7. RESULTADOS

7.1. Cultivo de cepas de *B. subtilis*

Las cepas 49.1, 49.2 y 49.3 de *Bacillus subtilis* fueron cultivadas en medio LB agar, mostrando la morfología característica de bacterias del género *Bacillus*, ya que se pueden observar colonias de aspecto ceroso, opacas y con bordes irregulares concordando con lo reportado en la literatura (Figura 4).

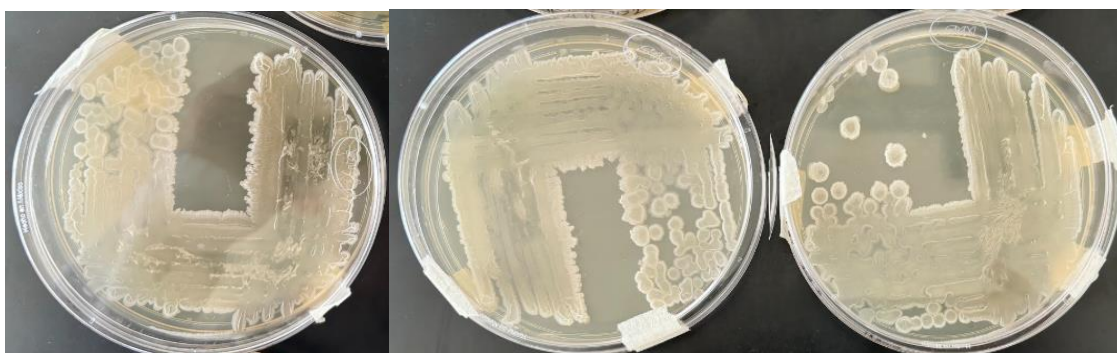


Figura 4. Cultivo de las cepas de *B. subtilis* 49.1, 49.2 y 49.3 en medio LB agar después de 24 horas de incubación a 30°C.
A) Cepa 49.1, B) Cepa 49.2 y C) Cepa 49.3.

Con la finalidad de obtener cultivos esporulados de las cepas 49.1, 49.2 y 49.3 de *B. subtilis* fueron cultivadas en medio Tris G agar, ya que este medio ha sido reportado en la literatura por favorecer el proceso de esporulación debido a que es un medio que contiene principalmente sales y un bajo contenido de extracto de levadura como fuente de carbono y nitrógeno, en este medio las cepas mostraron la morfología característica de bacterias del género *Bacillus* (Figura 5).

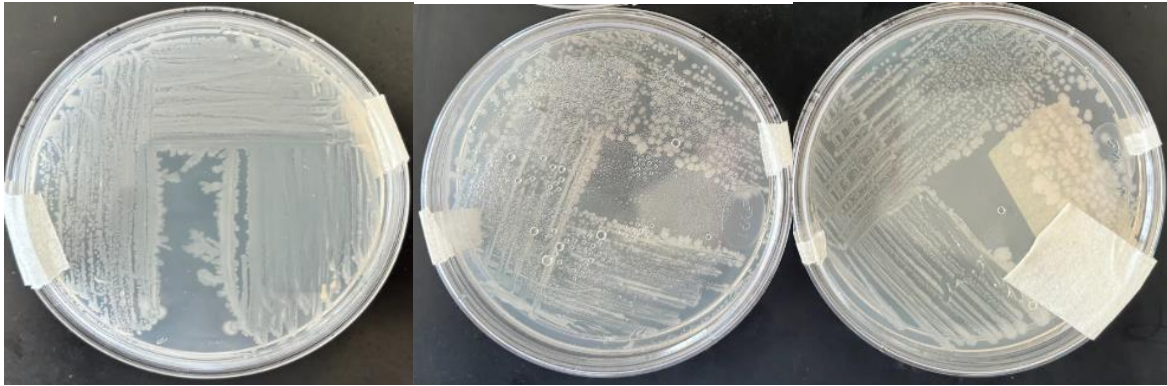
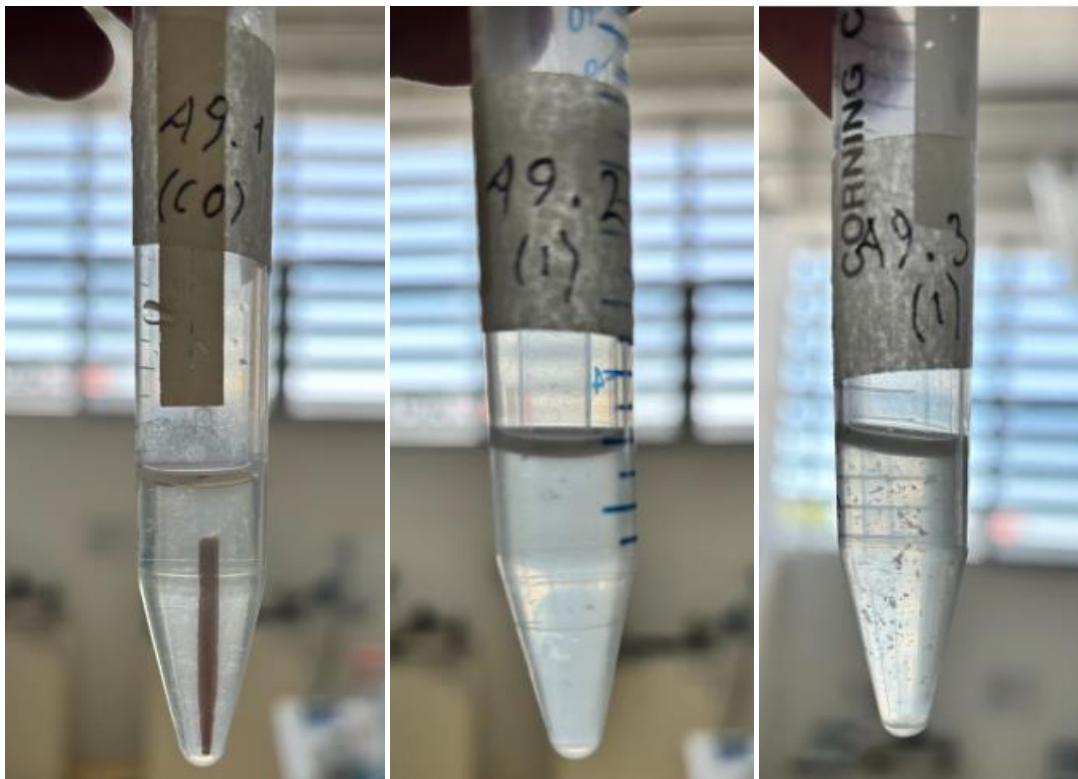


Figura 5. Cultivo de las cepas de *B. subtilis* 49.1, 49.2 y 49.3 en medio Tris G agar después de 24 horas de incubación a 30 °C.

Para determinar la esporulación en medio líquido y realizar los protocolos de tinción para la observación de las esporas al microscopio, las cepas 49.1, 49.2 y 49.3 de *B. subtilis* fueron cultivadas en medio Tris G líquido. El índice de esporulación en las muestras fue monitoreado cada semana, determinando en el campo visual la presencia de esporas y células vegetativas (figura 6).



a)

b)

c)

Figura 6. a) Cultivo de la cepa 49.1, b) Cultivo de la cepa 49.2 y c) Cultivo de la cepa 49.3 de *B. subtilis* en medio Tris G después de 24 horas de incubación a 30°C.

7.2. Resultados de Extracción de ADN

Al realizar el proceso de extracción de ADN se observó en la electroforesis en gel de agarosa el ADN genómico de las cepas 49.1, 49.2 y 49.3 de *B. subtilis*. En la figura 10 se muestra el resultado.

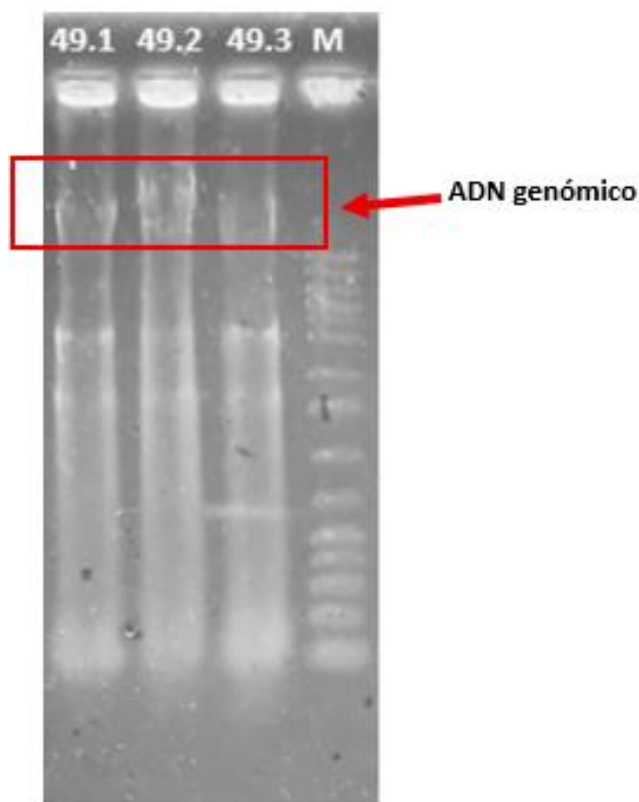


Figura 10. Corrimiento en agarosa donde se muestra la extracción de ADN genómico de las cepas 49.1, 49.2 y 49.3 de *B. subtilis*.

Se observan bandas de ADN de alto peso molecular y cantidad adecuada para ser empleadas en las reacciones de PCR posteriores.

7.3. Amplificación por PCR del gen que codifica para el ARNr 16S

El procedimiento para cada muestra de ADN genómico de las cepas a identificar 49.1, 49.2 y 49.3 de *B. subtilis* se hizo por duplicado, posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa de los amplificados la cual se muestra en la siguiente figura 11.

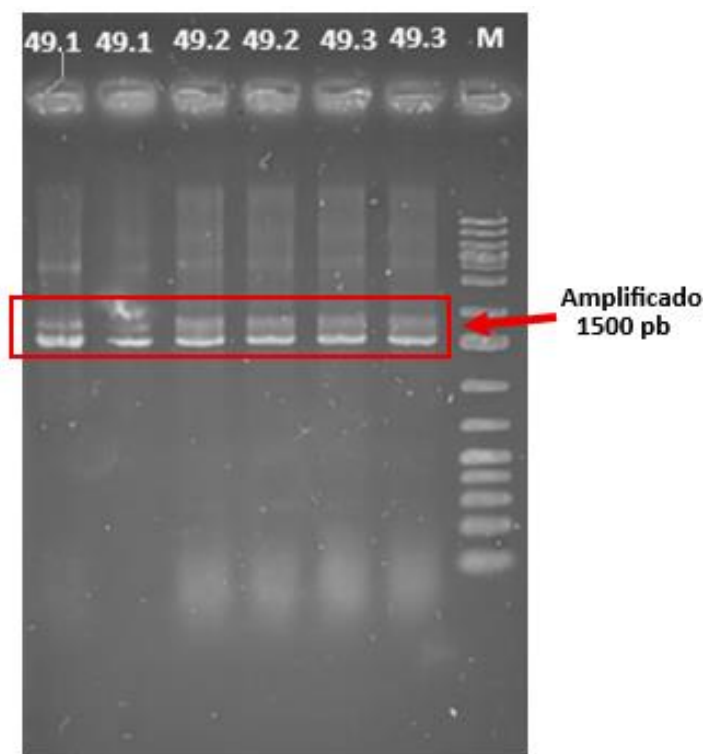


Figura 11. Corrimiento en agarosa donde se observa la amplificación por PCR del gen que codifica para el ARNr 16S en las cepas 49.1, 49.2 y 49.3 de *B. subtilis*.

La electroforesis confirmó la amplificación del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S. Las bandas son claras y tienen el tamaño esperado de 1500 pb.

7.4. Purificación de los amplificados

Para realizar el proceso de secuenciación era necesario llevar a cabo la purificación de los amplificadores de cada una de las cepas empleadas, con el objetivo de eliminar cebadores libres, nucleótidos libres, enzimas residuales (Taq polimerasa), sales, buffer y otros componentes de la mezcla de reacción. El procedimiento se realizó de acuerdo a las especificaciones del Kit Promega Wizard, posteriormente se hizo una electroforesis para confirmar la integridad de las muestras (figura 12).

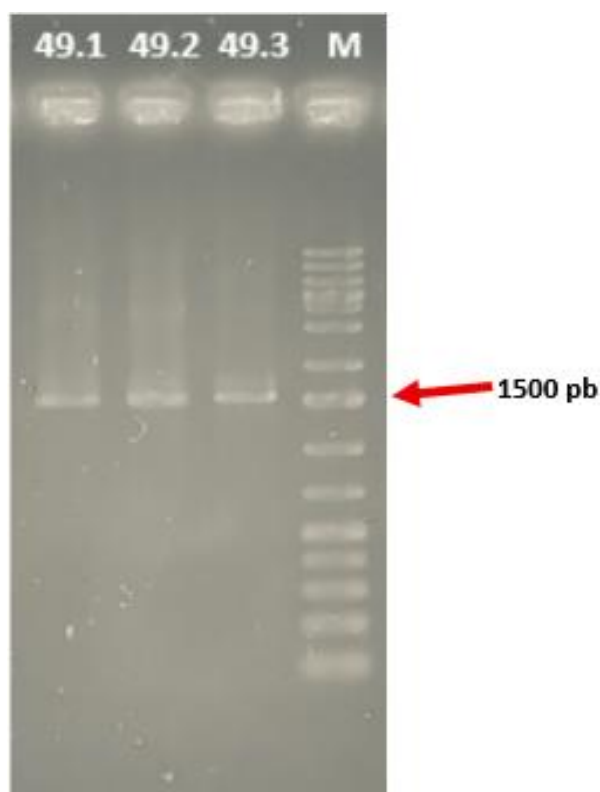


Figura 12. Corrimiento en agarosa que muestra la electroforesis de los amplificadores purificados de las cepas de *B. subtilis* 49.1, 49.2 y 49.3.

Después de realizar este proceso se obtuvieron amplicones limpios, concentrados y específicos, eliminando la posibilidad de que alguna impureza interfiriera con la secuenciación.

7.5. Secuenciación de los amplificadores

Las secuencias del gen que codifica para el ARNr de cada una de las cepas analizadas, fueron almacenadas en formato FASTA, en el Anexo 1 se muestran las

secuencias de ADN de cada una de las cepas de *B. subtilis* empleadas como modelo de estudio en este trabajo de investigación.

7.6. Análisis bioinformático

7.6.1. BLAST

Las muestras secuenciadas fueron analizadas empleando la herramienta BLAST de la plataforma del The National Center for Biotechnology Information (NCBI), los resultados del alineamiento se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Análisis BLAST realizado en NCBI con las muestras de *B. subtilis* 49.1, 49.2 y 49.3.

Muestra (cepa)	Longitud (pb)	Identidad (%)	Cobertura (%)	E-value	Especie identificada
49.1	810	99.75%	100%	0.0	<i>Bacillus subtilis</i>
49.2	766	100%	100%	0.0	<i>Bacillus subtilis</i>
49.3	578	100%	100%	0.0	<i>Bacillus subtilis</i>

El porcentaje de identidad de las secuencias del gen que codifica para el ARN ribosomal 16s para dos de las muestras (49.2 y 49.3) fue del 100% y para la cepa 49.1 de 99.75%. Confirmando que las secuencias pertenecen a la especie de *B. subtilis*.

7.6.2. Alineación y árbol filogenético

Las secuencias se ingresaron en el programa MEGA 12 junto con otras 81 secuencias de distintas bacterias para realizar un alineamiento. Posteriormente se realizó un árbol filogenético, con el objetivo de contextualizar filogenéticamente las secuencias. El árbol resultante fue el mostrado en la figura 13.

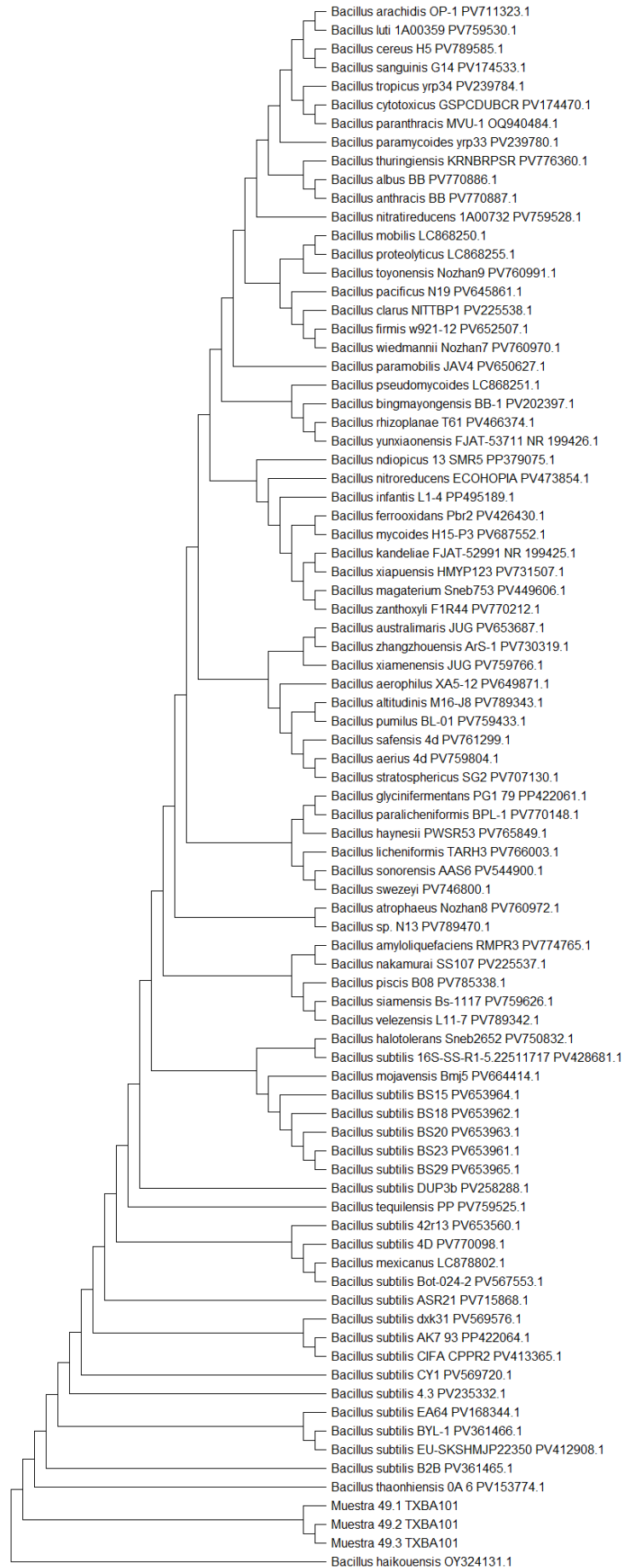


Figura 13. Árbol filogenético de las cepas 49.1, 49.2 y 49.3 con las secuencias del gen ARNr 16S de 81 cepas de *Bacillus*.

7.7. Proceso de esporulación

Para monitorear el proceso de esporulación, se tomaron fotografías al microscopio de los cultivos de las cepas 49.1, 49.2 y 49.3 de *B. subtilis* en tres tiempos diferentes de incubación: 24 horas, 1 semana y 2 semanas, las muestras fueron teñidas con azul de metileno. En la figura 14 se muestran las fotografías correspondientes a la cepa 49.1 en los tres tiempos de incubación monitoreados los resultados correspondientes al cultivo de 24 horas de incubación teñidos con tinción con azul de metileno mostraron la presencia de células vegetativas (Figura 14 A). Al tiempo de incubación de una semana se observaron células vegetativas y la presencia de esporas libres en el medio (Figura 14 B). Al realizar una magnificación de la fotografía al microscopio de la muestra en una semana de cultivo se observó la presencia de esporas en el interior de la célula vegetativa (Figura 14 C). A las dos semanas de incubación se observaron sólo esporas, por lo que se considera que el proceso de esporulación había concluido y por lo tanto la síntesis de metabolitos secundarios también se había llevado a cabo.

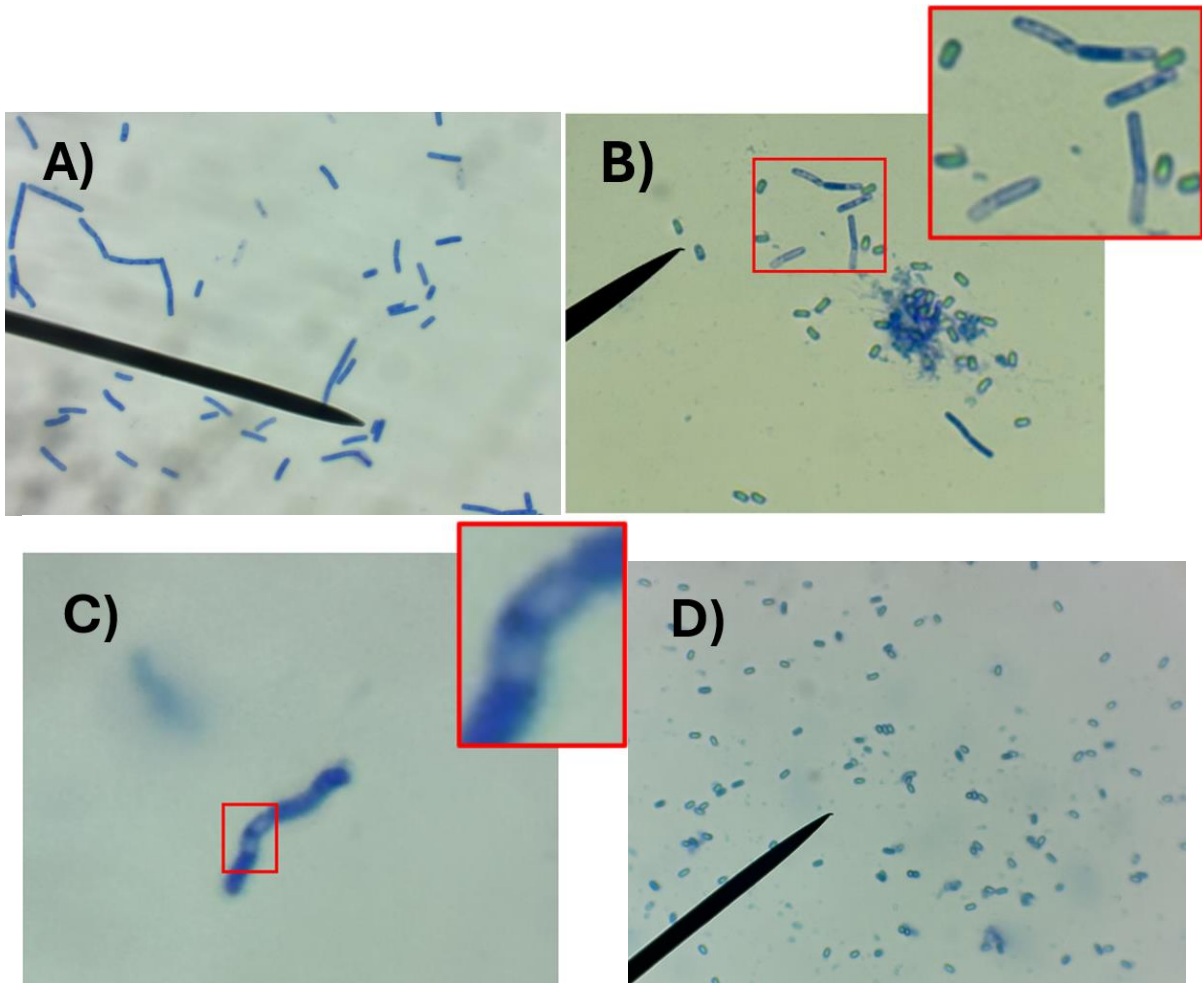


Figura 14. Proceso de esporulación de la cepa *Bacillus subtilis* 49.1 en diferentes tiempos de incubación.

A) Un día, B) y C) 1 semana, y D) 2 semanas de cultivo.

Las fotografías fueron obtenidas mediante microscopio óptico binocular a un aumento de 100X.

El proceso de esporulación avanzó conforme se fueron consumiendo los nutrientes del medio de cultivo, las cepas de *B. subtilis* probadas comenzaron a entrar a un estado de estrés, posteriormente ocurrió la liberación de esporas rompiendo la pared celular y liberando además los metabolitos secundarios intracelulares que fueron sintetizados durante la fase estacionaria de crecimiento. Para realizar el proceso de microfiltración de estos metabolitos, fue necesario que la presencia de esporas fuera superior a la de células vegetativas, ya que esto significaba que los metabolitos secundarios de la mayoría de las bacterias ya habían sido liberados al medio. La cepa 49.1 mostró, después de 1 semana de incubación, una gran reducción de la cantidad de células

vegetativas, por lo que los metabolitos secundarios deberían encontrarse libres en el medio de cultivo.

En la figura 15, se muestran los resultados correspondientes al crecimiento de la cepa 49.2 en los tres tiempos monitoreados. El inciso A muestra una fotografía a las 24 horas de incubación teñida con azul de metileno, se observó la presencia de células vegetativas y esporas dentro de ellas. El inciso B corresponde a 1 semana de incubación con tinción con verde de malaquita, se mostró la presencia mayoritaria de esporas en medio extracelular y algunas esporas dentro de las células vegetativas. Finalmente, el inciso C corresponde a 2 semanas de incubación con tinción con verde de malaquita, se evidenció la presencia de esporas en el medio y ausencia de células vegetativas.

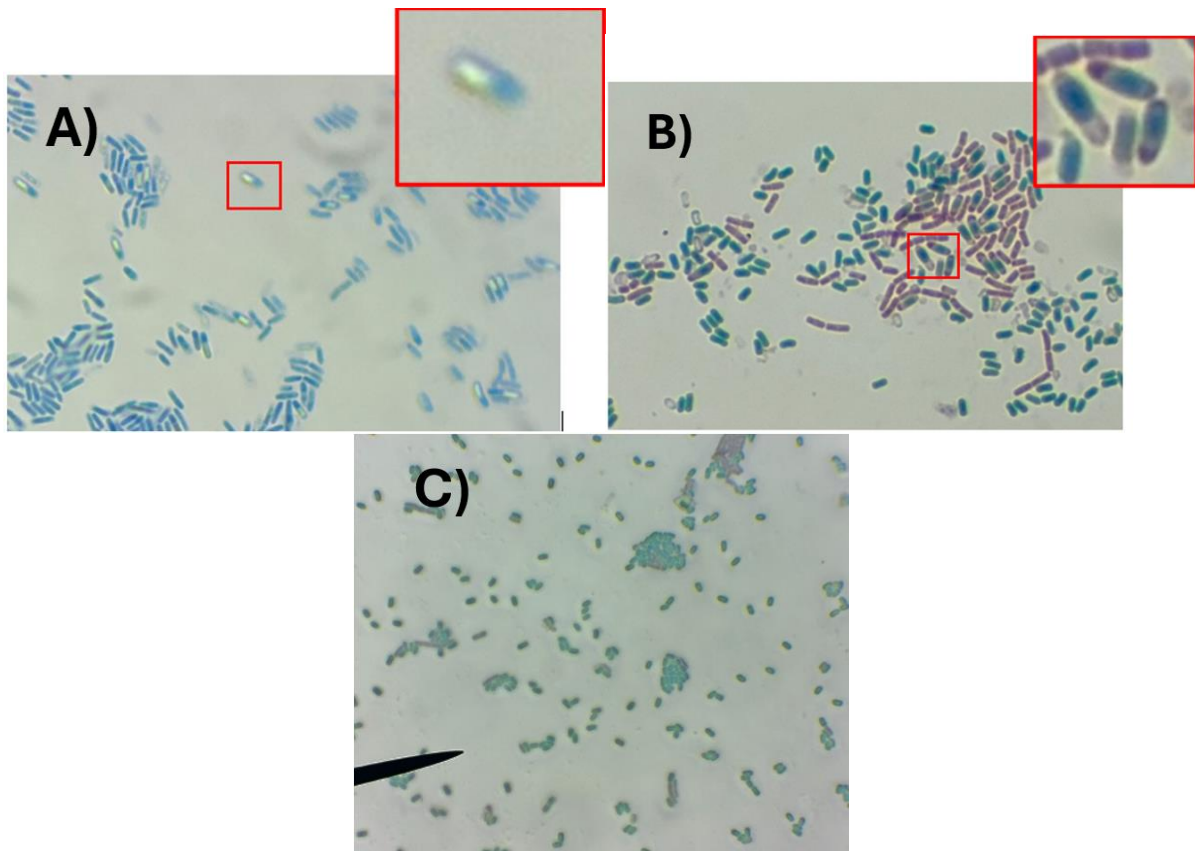


Figura 15. Proceso de esporulación de la cepa *B. subtilis* 49.2 en diferentes tiempos de incubación. Se observan imágenes representativas tras: A) Un día, B) y C) 2 semanas de cultivo.

Las fotografías fueron obtenidas mediante microscopio óptico binocular a un aumento de 100X.

En el caso de la cepa 49.2, se pudo observar desde las primeras 24 horas la presencia de esporas dentro de las células vegetativas, aunque ninguna espora en el medio

extracelular. Al término de la primera semana, la mayoría de las esporas se encontraban libres en el medio, con la presencia de algunas células vegetativas. Finalmente, tras la segunda semana, se pudo confirmar la ausencia de células vegetativas y una gran cantidad de esporas. Al observar el resultado esperado, se realizó el proceso de filtración con la certeza de que los metabolitos secundarios se encontraban en el medio.

En la figura 16, se muestran los resultados correspondientes al proceso de esporulación de la cepa 49.3 en los tres tiempos monitoreados. El inciso A muestra los resultados obtenidos a las 24 horas de incubación en una tinción simple con azul de metileno, se observó la presencia de esporas aún en el interior de las células vegetativas. En el inciso B la tinción con verde de malaquita de la muestra de 1 semana de incubación, se observó la presencia de esporas en medio extracelular y algunas esporas dentro de las células vegetativas. Finalmente, a las 2 semanas de incubación en el inciso C, se realizó una tinción con verde de malaquita y se observó la presencia de esporas en medio extracelular y poca presencia de células vegetativas, por lo que posteriormente se realizó el proceso de microfiltración de los metabolitos producidos.

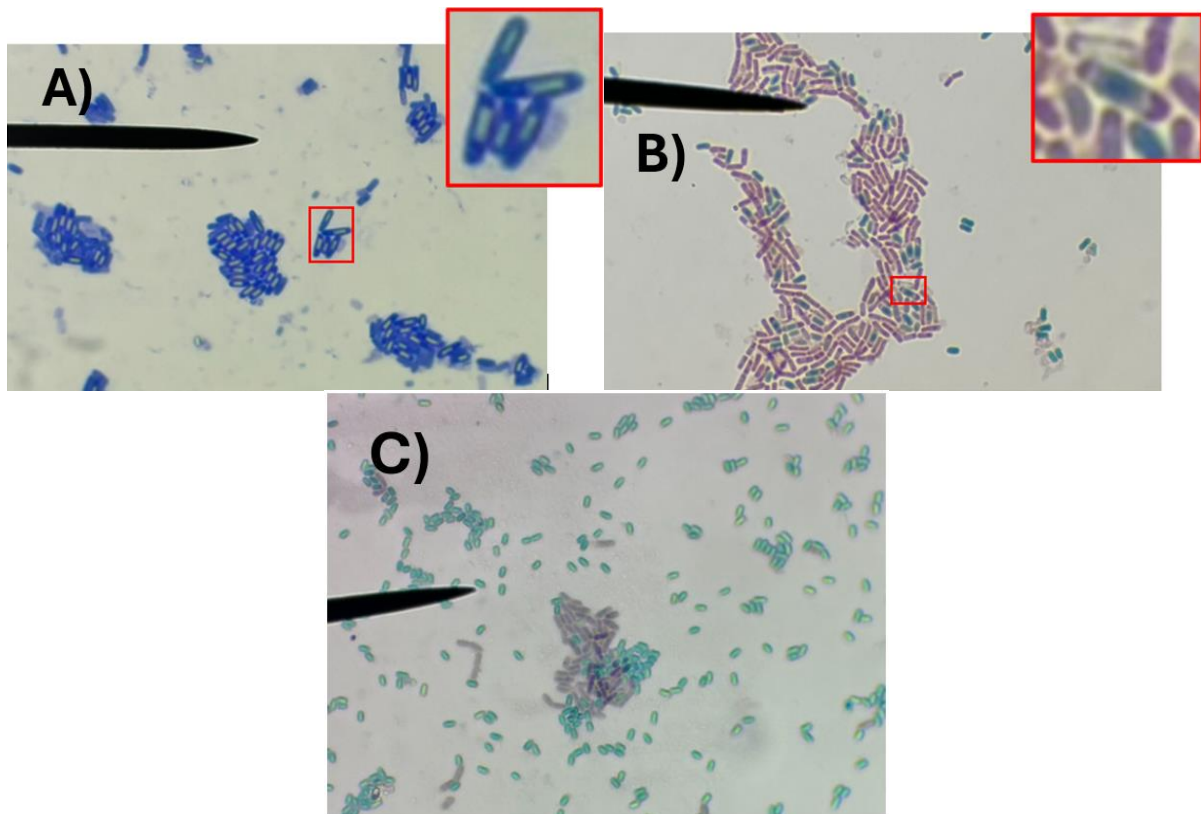


Figura 16. Proceso de esporulación de la cepa *Bacillus subtilis* 49.3 en diferentes tiempos de incubación. Se observan imágenes representativas tras: A) Un día, B) y C) 2 semanas de cultivo.

Las fotografías fueron obtenidas mediante microscopio óptico binocular a un aumento de 100X.

El resultado del proceso de esporulación indicó que a las dos semanas de incubación, la cepa 49.3 fue la única que aún presentó células vegetativas, sin embargo, no en una cantidad mayor a la de las esporas, por lo que se consideró que ya había ocurrido la síntesis de metabolitos secundarios.

7.8. Resultados de pruebas de antagonismo en bacterias Gram negativas

Después de que se haya observado la presencia de esporas exclusivamente en los cultivos, los metabolitos secundarios producidos fueron obtenidos por microfiltración, separando los metabolitos de otros componentes como las células vegetativas muertas y esporas. Se confirmó la ausencia de células y esporas, inoculando los metabolitos filtrados en medio Tris G agar. Como resultado no se obtuvo ningún crecimiento luego de las 24 horas de incubación, estos microfiltrados posteriormente se utilizaron para la prueba de antagonismo. Los resultados se presentan a continuación:

7.8.1. Ensayos de antagonismo de los metabolitos producidos por cepas de *B. subtilis* en cepas de *Salmonella* spp.

El primer género bacteriano empleado para poner a prueba la capacidad antagónica de los metabolitos secundarios fue *Salmonella* spp. Se emplearon cuatro cepas de este género. Las cepas utilizadas fueron: S5, S9, S10 y S11, las cuales se sembraron en dos condiciones nutricionales diferentes: Agar MacConkey y Agar LB, los ensayos fueron realizados por triplicado.

Al probar los metabolitos en los ensayos de antagonismo contra la cepa S5 de *Salmonella* spp en el medio de cultivo Agar MacConkey, se observó que los metabolitos producidos por las cepas 49.1, 49.2 y 49.3 de *B. subtilis*, no tuvieron efecto inhibitorio en el desarrollo de esta cepa, ya que se puede apreciar el crecimiento de la cepa S5 de *Salmonella* spp de manera abundante y uniforme en el medio de cultivo (figura 17).

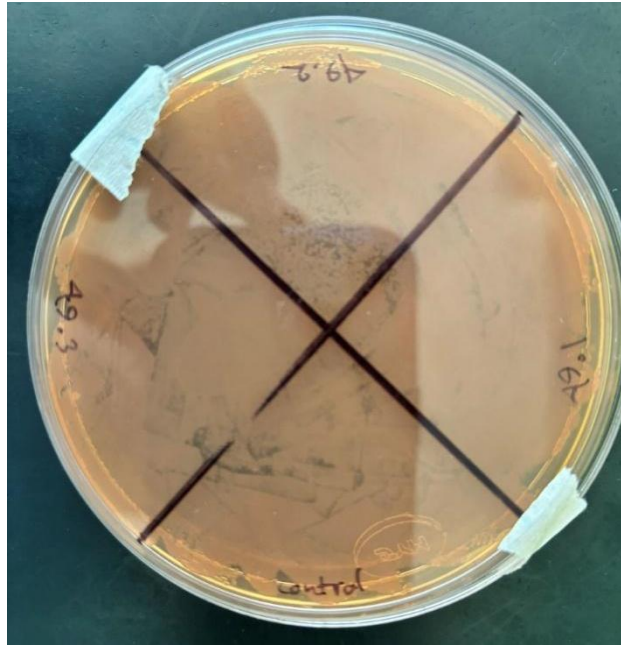


Figura 17. Ensayo de antagonismo de metabolitos de las cepas (49.1, 49.2 y 49.3) de *B. subtilis* contra la cepa S5 de *Salmonella* spp en medio agar MacConkey después de 24 horas de incubación.

Al realizar el ensayo de antagonismo de los metabolitos producidos por las cepas 49.1, 49.2 y 49.3 de *B. subtilis* en la cepa S9 de *Salmonella* spp en el medio Agar MacConkey, se observa en la figura 18, que los metabolitos probados mostraron una evidente actividad antagónica, en la zona de aplicación de los metabolitos afectando el crecimiento de la cepa S9 de *Salmonella* spp.

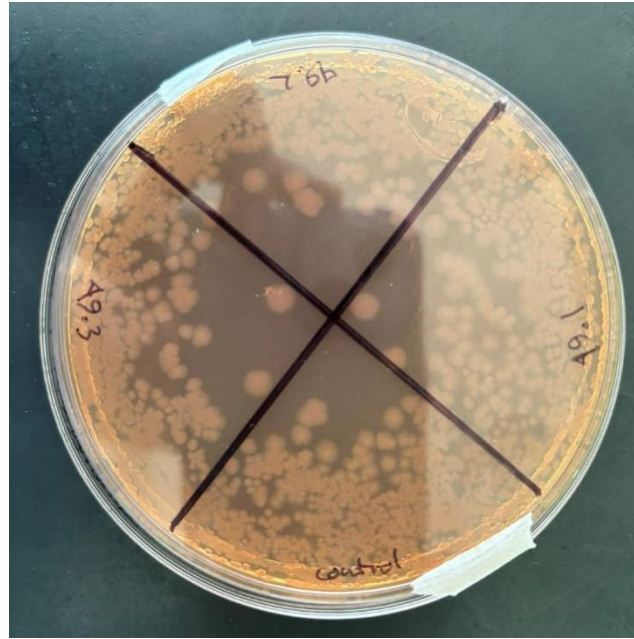


Figura 18. Ensayo de antagonismo de metabolitos de las cepas (49.1, 49.2 y 49.3) de *B. subtilis* contra la S9 de *Salmonella* spp en medio agar MacConkey después de 24 horas de incubación.

En el ensayo de antagonismo de los metabolitos producidos por las cepas 49.1, 49.2 y 49.3 de *B. subtilis* en la cepa S10 de *Salmonella* spp en el medio Agar MacConkey, se muestra en la figura 19, que los metabolitos producidos por las cepas 49.1, 49.2 y 49.3 de *B. subtilis* disminuyeron el crecimiento de la cepa S5 de *Salmonella* spp, ya que se puede apreciar que en las zonas de aplicación de los metabolitos se distinguen las colonias bacterianas y no se aprecia el crecimiento de forma masiva en el medio, por lo que se considera que tiene un efecto bacteriostático.

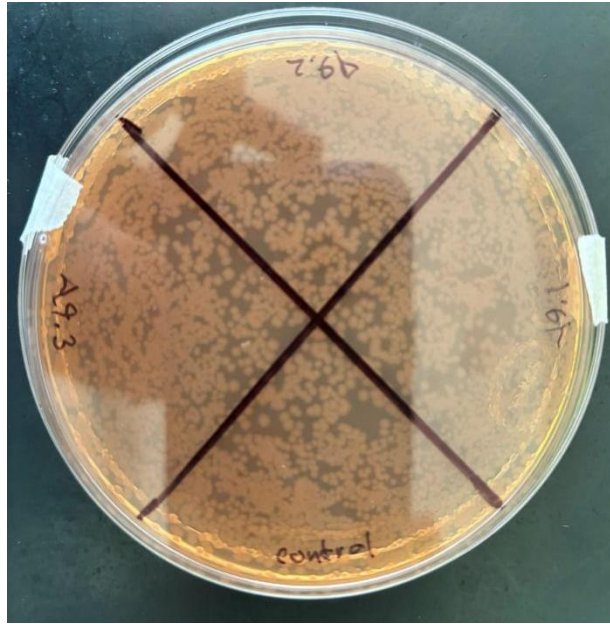


Figura 19. Ensayo de antagonismo de metabolitos de las cepas (49.1, 49.2 y 49.3) de *B. subtilis* contra la cepa de S10 de *Salmonella* spp en medio agar MacConkey después de 24 horas de incubación.

Al probar la actividad antagónica de los metabolitos producidos por las cepas 49.1, 49.2 y 49.3 de *B. subtilis* en la cepa S11 de *Salmonella* spp, se observa en la figura 20, que hay una clara inhibición del crecimiento en la zona de aplicación de los metabolitos, incluso se aprecia que el crecimiento de la cepa sólo está presente en zonas alejadas del área de aplicación.

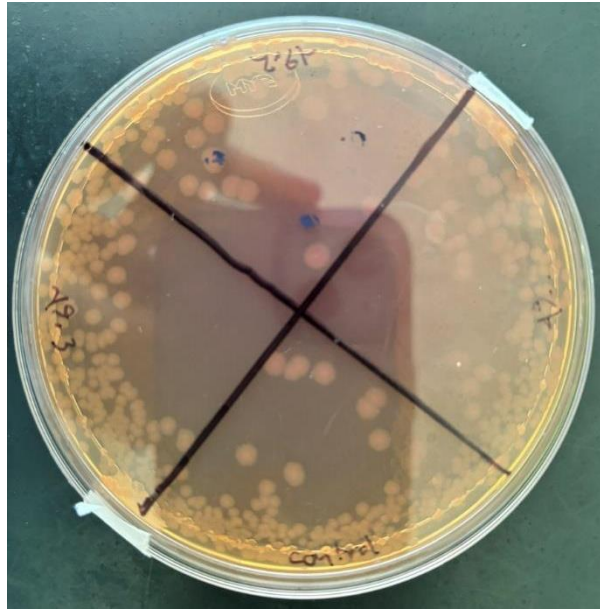


Figura 20. Ensayo de antagonismo de metabolitos de las cepas (49.1, 49.2 y 49.3) de *B. subtilis* contra la cepa S11 de *Salmonella* spp en medio MacConkey agar después de 24 horas de incubación.

En la condición nutricional Agar LB, al realizar el ensayo de inhibición de los metabolitos producidos por las cepas 49.1, 49.2 y 49.3 de *B. subtilis* en el desarrollo de la cepa S5 de *Salmonella* spp, se observa en la figura 21 que los metabolitos probados no inhibieron el desarrollo de la cepa S5 de *Salmonella* spp, ya que se aprecia un notorio crecimiento abundante y uniforme en la caja Petri.

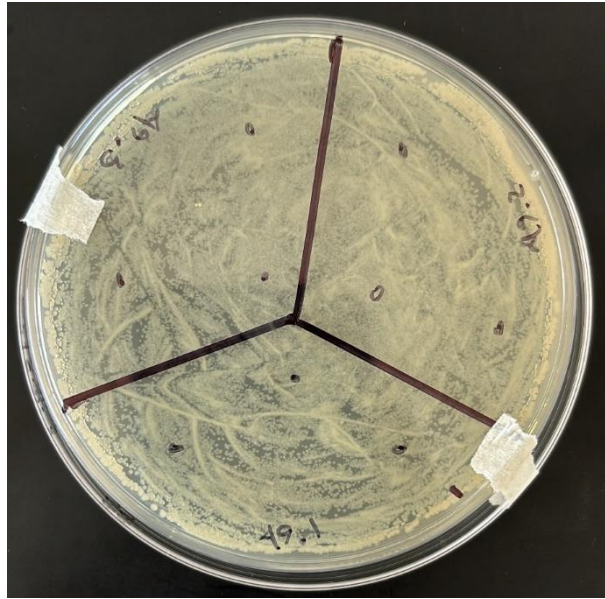


Figura 21. Ensayo de antagonismo de metabolitos de las cepas (49.1, 49.2 y 49.3) de *B. subtilis* contra la cepa S5 de *Salmonella* spp en medio Agar LB después de 24 horas de incubación.

En el ensayo de inhibición de los metabolitos producidos por las cepas 49.1, 49.2 y 49.3 de *B. subtilis* en el desarrollo de la cepa S9 de *Salmonella* spp cultivada en medio Agar LB, se observa en la figura 22, que estos metabolitos no inhibieron el desarrollo de la cepa S9 de *Salmonella* spp.

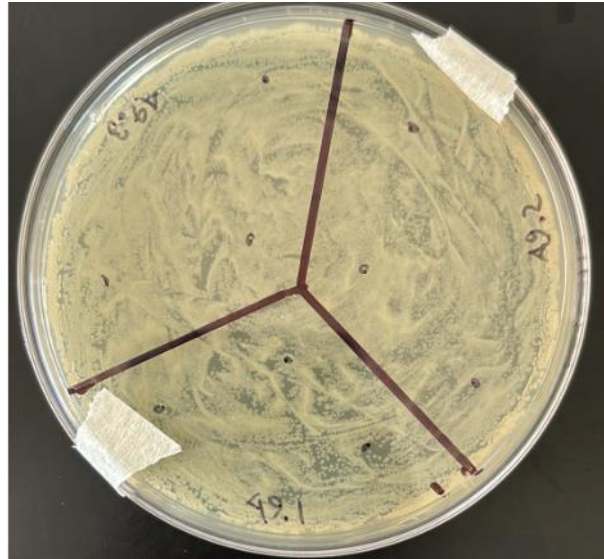


Figura 22. Ensayo de antagonismo de metabolitos de las cepas (49.1, 49.2 y 49.3) de *B. subtilis* contra la cepa S9 de *Salmonella* spp en medio Agar LB después de 24 horas de incubación.

Al realizar el ensayo de antagonismo de los metabolitos producidos por las cepas 49.1, 49.2 y 49.3 de *B. subtilis* en el desarrollo de la cepa S10 en Agar LB, el resultado presentado en la figura 23 indicó que en esta cepa tampoco causó efecto inhibitorio en el desarrollo de la cepa de *Salmonella* spp.



Figura 23. Ensayo de antagonismo de metabolitos de las cepas (49.1, 49.2 y 49.3) de *B. subtilis* contra la cepa S10 de *Salmonella* spp en medio Agar LB después de 24 horas de incubación.

El ensayo de antagonismo llevada a cabo en la cepa S11 de *Salmonella* spp, mostrado en la figura 24, indica que en esta condición nutricional no se observó actividad antagonica de los metabolitos producidos por las cepas 49.1, 49.2 y 49.3 de *B. subtilis*.



Figura 24. Ensayo de antagonismo de metabolitos de las cepas (49.1, 49.2 y 49.3) de *B. subtilis* contra la cepa S11 de *Salmonella* spp en medio Agar LB después de 24 horas de incubación.

A diferencia de los resultados obtenidos para el medio de cultivo Agar MacConkey, todas las pruebas de antagonismo realizadas en el medio Agar LB, no mostraron evidencia de inhibición del crecimiento en las cepas de *Salmonella*. Demostrando que la condición nutricional puede afectar directamente la actividad antagonica de los metabolitos secundarios de *B. subtilis*.

7.8.2 Ensayos de antagonismo de los metabolitos producidos por cepas de *B. subtilis* en cepas de *Shigella* spp.

Al término de las pruebas con el género *Salmonella*, fueron empleadas cuatro cepas de *Shigella* (Sh1, Sh2, Sh3 y Sh6) para realizar pruebas de antagonismo de los

metabolitos secundarios producidos por tres cepas de *B. subtilis* en dos condiciones nutricionales (Agar McConkey y Agar LB). Los ensayos fueron realizados por triplicado.

Al realizar los ensayos de antagonismo en la cepa Sh1 de *Shigella* spp. en el medio de cultivo agar MacConkey se muestra en la figura 25 que los metabolitos producidos por las cepas 49.1, 49.2 y 49.3 de *B. subtilis* no causaron afectación en el crecimiento de la cepa Sh1 de *Shigella* spp en la zona de aplicación.

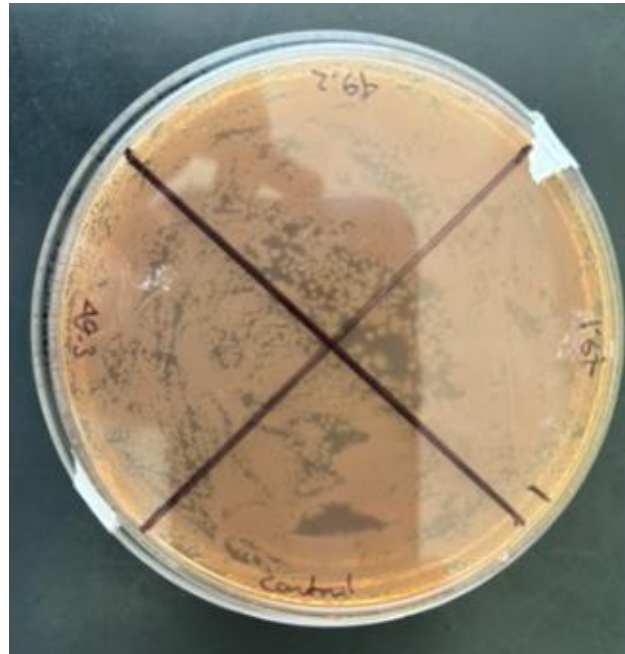


Figura 25. Ensayo de antagonismo de metabolitos de las cepas (49.1, 49.2 y 49.3) de *B. subtilis* contra la cepa Sh1 de *Shigella* spp en medio Agar MacConkey después de 24 horas de incubación.

En el caso de los ensayos realizados en la cepa Sh2 de *Shigella* spp la figura 26 se observó que los metabolitos producidos por las cepas 49.1, 49.2 y 49.3 de *B. subtilis*, afectaron el crecimiento de esta cepa de *Shigella* spp. en la zona de aplicación, disminuyendo el desarrollo del cultivo bacteriano.

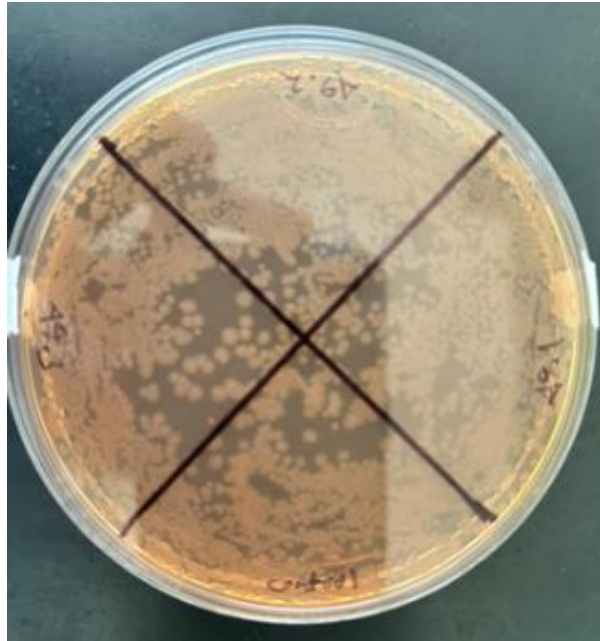


Figura 26. Ensayo de antagonismo de metabolitos de las cepas (49.1, 49.2 y 49.3) de *B. subtilis* contra la cepa Sh2 de *Shigella* spp en medio Agar MacConkey después de 24 horas de incubación.

En la figura 27 se observó que al probar la actividad antagónica de los metabolitos producidos por las cepas 49.1, 49.2 y 49.3 de *B. subtilis*, en el desarrollo de la cepa Sh3 de *Shigella* spp., hubo una evidente afectación en el crecimiento en la zona de aplicación de los metabolitos.

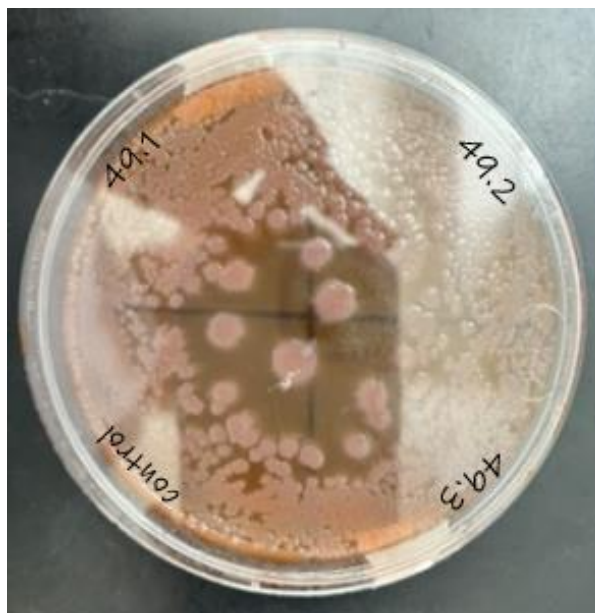


Figura 27. Ensayo de antagonismo de metabolitos de las cepas (49.1, 49.2 y 49.3) de *B. subtilis* contra la cepa Sh3 de *Shigella* spp en medio Agar MacConkey después de 24 horas de incubación.

Al probar la actividad antagónica de los metabolitos producidos por las cepas 49.1, 49.2 y 49.3 de *B. subtilis* en el desarrollo de la cepa Sh6 de *Shigella* spp, se observa en la figura 28 que ocurrió una evidente afectación en el crecimiento en la zona de aplicación de los metabolitos, siendo esta cepa en la que se observó el mayor efecto inhibitorio.

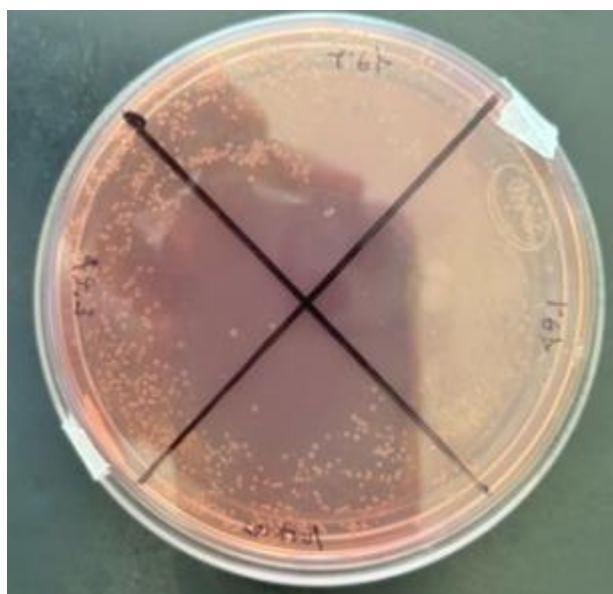


Figura 28. Ensayo de antagonismo de metabolitos de las cepas (49.1, 49.2 y 49.3) de *B. subtilis* contra la cepa Sh6 de *Shigella* spp en medio Agar MacConkey después de 24 horas de incubación.

Los resultados de las pruebas de antagonismo con las cepas de *Shigella* spp. en el medio MacConkey agar mostraron resultados muy similares a los obtenidos en las pruebas realizadas en el género *Salmonella* spp., ya que hubo inhibición en el desarrollo de estas cepas. La cepa en la que se presentó una mayor afectación fue la cepa Sh6, ya que el crecimiento de colonias bacterianas fue reducido, no sólo en la cantidad, sino también en el tamaño de las colonias que fue comparativamente pequeño a las colonias presentes en los otros cultivos. La cepa que mostró mayor resistencia a los metabolitos de *B. subtilis* fue la Sh1, en donde se pudo observar un ligero efecto inhibitorio especialmente en las secciones de los metabolitos pertenecientes a 49.1 y 49.2.

Al realizar los ensayos de antagonismo en la condición nutricional LB, se observa en la figura 29 que los metabolitos producidos por las cepas 49.1, 49.2 y 49.3 de *B. subtilis* no causaron inhibición en el desarrollo de la cepa Sh1 de *Shigella* spp., ya que se puede apreciar el crecimiento de manera abundante y uniforme en la caja Petri.

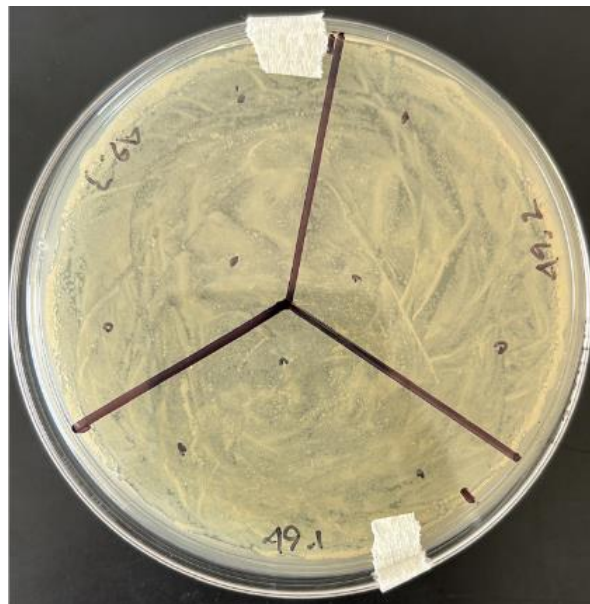


Figura 29. Ensayo de antagonismo de metabolitos de las cepas (49.1, 49.2 y 49.3) de *B. subtilis* contra la cepa Sh1 de *Shigella* spp en medio Agar LB después de 24 horas de incubación.

En el caso de los ensayos llevados a cabo en la cepa Sh2 de *Shigella* spp se muestra en la figura 30 que los metabolitos producidos por las cepas 49.1, 49.2 y 49.3 de *B. subtilis* no inhibieron el desarrollo de la cepa Sh2 de *Shigella* spp, ya que se puede apreciar el crecimiento de manera homogénea y abundante en la caja Petri.

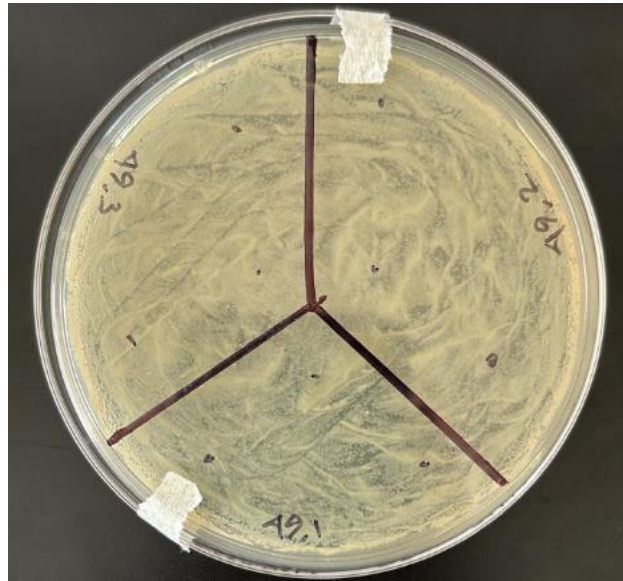


Figura 30. Ensayo de antagonismo de metabolitos de las cepas (49.1, 49.2 y 49.3) de *B. subtilis* contra la cepa Sh2 de *Shigella* spp en medio Agar LB después de 24 horas de incubación.

En la figura 31 se observó que al probar la actividad antagónica de los metabolitos producidos por las cepas 49.1, 49.2 y 49.3 de *B. subtilis* en el desarrollo de la cepa Sh3 de *Shigella* spp, estos no causaron inhibición en el desarrollo de esta cepa, ya que se puede apreciar el crecimiento de manera abundante y uniforme en la caja Petri.

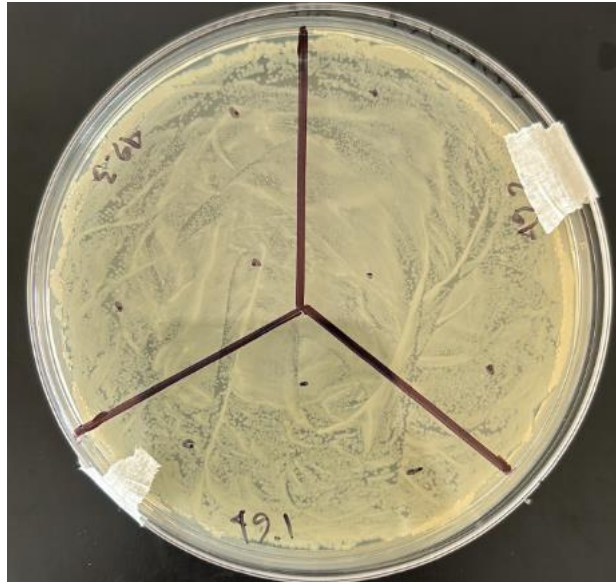


Figura 31. Ensayo de antagonismo de metabolitos de las cepas (49.1, 49.2 y 49.3) de *B. subtilis* contra la cepa Sh3 de *Shigella* spp en medio Agar LB después de 24 horas de incubación.

Finalmente al llevar a cabo los ensayos de inhibición en la cepa Sh6 de *Shigella* spp, en la figura 32 se observa que al probar la actividad antagónica de los metabolitos producidos por las cepas 49.1, 49.2 y 49.3 de *B. subtilis*, éstos no inhibieron el desarrollo de esta cepa, ya que se puede apreciar el crecimiento de manera homogénea en la caja Petri.

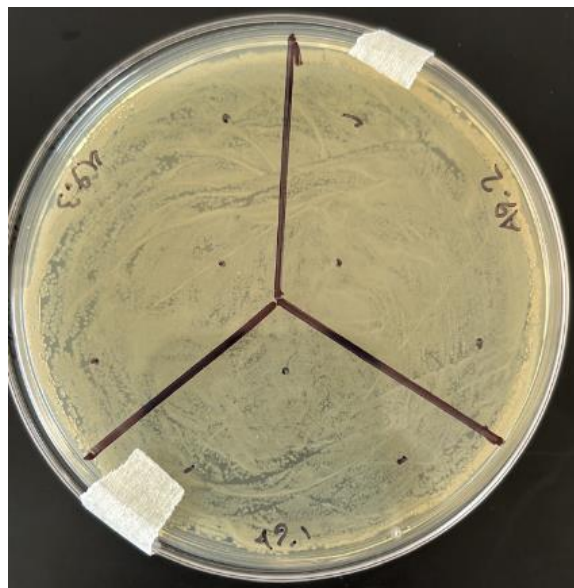


Figura 32. Ensayo de antagonismo de metabolitos de las cepas (49.1, 49.2 y 49.3) de *B. subtilis* contra la cepa Sh6 de *Shigella* spp en medio Agar LB después de 24 horas de incubación.

Al igual que los resultados obtenidos para las pruebas llevadas a cabo en Agar LB para el género *Salmonella* spp, para las cepas del género *Shigella* spp estos fueron negativos para todos los metabolitos probados.

8. DISCUSIÓN

Para la identificación bacteriana existen diversos métodos, entre los que se encuentran los microbiológicos tradicionales en los que se analizan las características morfológicas y de tinción de las bacterias, los bioquímicos basados en el metabolismo microbiano, actualmente también se emplean la técnica de identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF por sus siglas en inglés (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight) que analiza el perfil de proteínas único de una colonia bacteriana (Seng et al., 2009, García et al., 2012) y los métodos moleculares, en los que se determina la pertenencia a una especie en particular por la amplificación por PCR de algún gen de interés y el posterior análisis de su secuencia de ADN (Valour et al., 2010; Franco-Duarte et al., 2019).

En este trabajo al emplear métodos microbiológicos para la identificación bacteriana de las cepas empleadas se encontró que al analizar las características microbiológicas, las colonias resultantes de la siembra de *B. subtilis* en las condiciones nutricionales medio Agar LB y Agar Tris G, las cepas mostraron morfologías irregulares, con un aspecto húmedo que fue cambiando a una apariencia más rugosa conforme transcurría el tiempo; la mayoría de los márgenes de las colonias se mostraron fimbriados; en algunos cultivos las colonias presentaron pigmentación marrón. Todas estas características concuerdan con lo reportado por Logan & Vos, (2015) para las colonias asociadas al género *B. subtilis*. El cambio de aspecto húmedo a aspecto rugoso puede deberse a una producción de una matriz extracelular conformada de proteínas y polisacáridos; o a una respuesta al estrés derivado de una escasez de recursos y que consiste en cambiar la textura del cultivo con el objetivo de maximizar la difusión de nutrientes y oxígeno entre las células pertenecientes al biofilm (Gingichashvili et al., 2019).

En la actualidad el empleo de métodos moleculares ha mostrado ser altamente eficaz para la identificación de bacterias, varios autores han reportado que técnicas como PCR, RT-qPCR, MALDI-TOF MS, MLTS y Whole Genome Sequencing (WGS) son ejemplos sumamente efectivos frente a técnicas convencionales (Mansouri, 2025; Gerace et al., 2022; da Silva et al., 2023). Uno de los marcadores moleculares empleados con mayor frecuencia para la identificación bacteriana es la amplificación por PCR del gen que codifica para el ARNr 16S, esto es debido a que es un gen altamente conservado en todas las bacterias (Valour et al., 2010; Franco-Duarte et al., 2019).

En este trabajo se identificaron molecularmente las cepas 49.1, 49.2 y 49.3 de *B. subtilis*, empleando la secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S, este método resultó ser efectivo, ya que se obtuvo un alto porcentaje de identidad de 100% en las cepas (49.2 y 49.3) y un porcentaje de 99.75% (cepa 49.1).

En la literatura está reportado que el empleo de la secuenciación del ARNr 16S permitió la identificación de agentes clínicos difíciles, los cuales por métodos bioquímicos convencionales no había sido posible identificar (Cheng et al. 2014).

Al llevar a cabo el alineamiento de las secuencias que codifican para el ARNr de las cepas de estudio en conjunto con las otras secuencias, se pudo observar que las cepas 49.1, 49.2 y 49.3 se agrupan en un mismo clado terminal. Estos tres aislamientos forman un subgrupo monofilético, que incluyen varias secuencias de *B. subtilis*, lo que confirma su fuerte relación evolutiva y genética con esta especie.

Debido a la importancia de *Bacillus subtilis* como microorganismo productor de diversos metabolitos secundarios con naturaleza antimicrobiana, en este trabajo se investigó el potencial de los metabolitos sintetizados durante la fase estacionaria de crecimiento por las cepas 49.1, 49.2 y 49.3 de *Bacillus subtilis*, para lo cual se empleó el medio de cultivo Tris G, el cual se ha demostrado que favorece la esporulación en *B. subtilis*, debido a su composición química principalmente constituida por sales, que representa por lo tanto una condición nutricional restrictiva (Rojas et al., 2015; Amaya, 2023), también se ha reportado que los medios de cultivo definidos y tamponados que presentan una limitación controlada de nutrientes, son los que inducen la esporulación en *B. subtilis*; por ejemplo el medio de Hageman, donde cultivos de *B. subtilis* mostraron una esporulación máxima a las 12 horas tras terminar la fase exponencial (Hageman et al., 1984); se ha reportado que los protocolos de resuspensión en medios con sales mínimas, favorecen la esporulación, ya que el descenso nutricional indujo a la activación del regulador de la esporulación Spo0A (Landajuela et al., 2024).

Al realizar los análisis del efecto antimicrobiano de los metabolitos sintetizados por las cepas 49.1, 49.2 y 49.3 de *B. subtilis*, dado que estos compuestos son excretados al medio de cultivo, se demostró que los microfiltrados de estas cepas libres de células, inhibieron el crecimiento de las bacterias Gram negativas *Salmonella* spp y *Shigella* spp, las cuales fueron seleccionadas en este estudio dada su importancia en el ámbito de la salud como agentes causales de enfermedades gastrointestinales, además de su fenotipo de resistencia a antibióticos previamente analizada en el laboratorio de Microbiología EMA-6 (Serrano, 2025). La inhibición de las cepas por los metabolitos sintetizados por las cepas de *Bacillus subtilis* depende de la condición nutricional empleada, ya que en Agar MacConkey este efecto fue mayor en comparación con el medio Agar LB, esto podría deberse a que el medio de cultivo Agar MacConkey es un medio selectivo diferencial cuya composición química permite el aislamiento y diferenciación de bacterias Gram negativas como *Salmonella* spp y contiene además inhibidores del desarrollo de otros microorganismos en comparación con el medio LB que es una condición nutricional general. Se ha reportado previamente que las cepas empleadas en este estudio de *Salmonella* spp y *Shigella* spp mostraron también un fenotipo diferente de resistencia a antibióticos comerciales dependiendo de la condición nutricional (Serrano, 2025), lo cual también se ha presentado en otras bacterias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa* donde la acción de los antimicrobianos comerciales puede variar dependiendo de la composición química del medio de cultivo (Castelán et al., 2025).

Los resultados obtenidos de inhibición de los metabolitos en las cepas de bacterias Gram negativas empleadas concuerdan con las pruebas de antagonismo reportadas

en distintos estudios tanto in vitro como in vivo (Tazehabadi et al. 2021) empleando un suero libre de células (CFS) de *B. subtilis*, donde hubo una inhibición significativa en la formación de biofilms de cepas de *Salmonella enterica*, la reducción de formación del biofilm fue entre 48% a 56%, este resultado se les atribuyó al efecto de los metabolitos extracelulares, como como subtilosina A. También se han reportado otros metabolitos extracelulares que son sintetizados por las cepas de *B. subtilis* y que han mostrado actividad como la ϵ -Poly-L-lisina, la octapeptina, la zwittermicina A, la tiocilina y la subtilisina A, ya que han sido eficaces contra de bacterias Gram negativas en diversos estudios (Tran et al., 2022).

Previamente en el Laboratorio se había reportado la capacidad de las cepas 49.1, 49.2 y 49.3 de *B. subtilis* para inhibir con éxito a diversos microorganismos como son hongos fitopatógenos de importancia económica (Amaya, 2023). Este trabajo demuestra además la capacidad de estas cepas de *B. subtilis* en la inhibición del desarrollo de bacterias Gram negativas de importancia en el área de la salud como lo son *Salmonella* spp y *Shigella* spp, por lo cual es necesario realizar investigación para la identificación de los metabolitos responsables del efecto antagonista.

10. CONCLUSIONES

La amplificación por PCR del gen que codifica para el ARNr 16 S y posteriormente los análisis de sus secuencias, permitieron la identificación de las cepas 49.1, 49.2 y 49.3 como pertenecientes a la especie *B. subtilis* con un alto porcentaje de identidad (99.75-100%).

El análisis filogenético de sus secuencias agrupa a las cepas 49.1, 49.2 y 49.3 en un mismo clado terminal con secuencias de *B. subtilis*, lo que confirma su relación evolutiva y genética con esta especie.

Los análisis de antagonismo de los metabolitos producidos por las cepas 49.1, 49.2 y 49.3 de *B. subtilis* demostraron efecto antagónico en la condición nutricional Agar MacConkey, el cual es un medio selectivo diferencial para el aislamiento de bacterias Gram negativas.

Los metabolitos de las cepas 49.1, 49.2 y 49.3 de *B. subtilis* representan una alternativa como antimicrobianos susceptibles de ser probados contra otras bacterias Gram negativas de importancia.

11. PERSPECTIVAS

Identificar los metabolitos sintetizados por las cepas de *Bacillus subtilis* responsables del efecto de inhibición en contra de las bacterias Gram negativas de estudio.

Realizar ensayos en diferentes condiciones nutricionales para determinar la influencia de la composición química del medio de cultivo en el fenómeno de inhibición contra bacterias Gram negativas.

Determinar la concentración mínima inhibitoria de los metabolitos extracelulares probados contra las cepas de bacterias multirresistentes a antibióticos probadas en este estudio.

Analizar el efecto de los metabolitos sintetizados por las cepas de *B. subtilis* contra otras bacterias Gram negativas patógenas y resistentes a antibióticos comerciales.

12. ANEXOS

Anexo 1. Secuencias de ADN completas obtenida para *B. subtilis* 49.1, 49.2 y 49.3

>Muestra 49.1 TXBA101

AAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCG
GTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATT

CACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAG
TTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAA

CAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCAT
TGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCA

TAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACACGGC
AGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAAT

GCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTC
ACGACACGAGCTGACGACAACCATGC

ACCACCTGTCACTCTGCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTCAGAG
GATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTC

GCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAAT
TCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCG

TACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAA
CCCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTT

ACGGCGTGGACTIONACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTCGCTCC
TCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGT

CGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTG
CATTCCACTCTCTCTCTGCACTCAAG

TTCCCCAGTT

>Muestra 49.2 TXBA101

CGACTTCACCCCAATCATCTGTCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCTAAAAGGTTA
CCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAAC

TCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGG
CATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATT

CCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGT
GGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCG
CTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCA
TGATGATTTGACGTCATCCCCACCTT
CCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAAC
TAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCG
GGACTIONAACCCAAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGT
CACTCTGCCCCCGAAGGGGACGTCCT
ATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTC
GAATTAAACCACATGCTCCACCGCT
TGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCA
GGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGC
AGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGG
ACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCG
CTCCCCACGCTTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTC

>Muestra 49.3 TXBA 101

GCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCG
CTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCA
TGATGATTTGACGTCATCCCCACCTT
CCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAAC
TAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCG
GGACTIONAACCCAAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGT
CACTCTGCCCCCGAAGGGGACGTCCT
ATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTC
GAATTAAACCACATGCTCCACCGCT
TGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCA
GGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGC
AGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGG
ACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCG
CTCCCCACGCTTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTC

Anexo 2. Composición para 1 litro de medio de cultivo de LB agar.

Reactivo	Cantidad
Cloruro de sodio	10 g
Peptona de caseína	10 g
Extracto de levadura	5 g
Agar bacteriológico	15 g

Anexo 3. Composición para 1 litro de medio de cultivo de medio Tris G agar.

Reactivo	Cantidad
$CaCl_2$	10 mL
$(NH_4)SO_4$	10 mL
Glucosa	10 mL
Tris	200 mL
Extracto de levadura	1.5 g
K_2HPO_4 5%	10 mL
Sales	10 mL
Agar bacteriológico	15 g

Anexo 4. Composición para 1 litro de las sales para la formulación del medio Tris G.

Reactivo	Cantidad
$CuSO_4$	10 mL
$ZnSO_4$	10 mL
$FeSO_4$	5 mL
$MnSO_4$	10 mL

Anexo 5. Composición para 1 litro de medio de cultivo de LB.

Reactivo	Cantidad
Cloruro de sodio	10 g
Peptona de caseína	10 g
Extracto de levadura	5 g

Anexo 6. Composición para 1 litro de medio de cultivo de medio Tris G agar.

Reactivo	Cantidad
----------	----------

$CaCl_2$	10 mL
$(NH_4)SO_4$	10 mL
Tris	200 mL
Extracto de levadura	1.5 g
K_2HPO_4 5%	10 mL
Sales	10 mL
Glucosa	10 mL

13. REFERENCIAS

- Abriouel, H., Franz, C. M. A. P., Omar, N. Ben, & Galvez, A. (2011). Diversity and applications of *Bacillus bacteriocins*. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(1), 201–232. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2010.00244.X>
- Alemu, A., Girma, S., & Mariam, S. H. (2023). An Arsenal of Multiple Antimicrobial Resistance, Toxins, and Virulence Factors in Gram-Negative Bacterial Isolates from Food – A Formidable Combination! *Infection and Drug Resistance*, 16, 1029–1037. <https://doi.org/10.2147/IDR.S391072>
- Almoneafy, A. A., Kakar, K. U., Nawaz, Z., Li, B., Saand, M. A., Chun-lan, Y., & Xie, G. L. (2014). Tomato plant growth promotion and antibacterial related-mechanisms of four rhizobacterial *Bacillus* strains against *Ralstonia solanacearum*. *Symbiosis*, 63(2), 59–70. <https://doi.org/10.1007/S13199-014-0288-9/METRICS>
- Amaya Zambrano, N. (2023). Determinación de la actividad antifúngica de metabolitos producidos por cepas de *Bacillus subtilis*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/19095>
- Andrić, S., Meyer, T., & Ongena, M. (2020). *Bacillus* Responses to Plant-Associated Fungal and Bacterial Communities. *Frontiers in Microbiology*, 11, 550488. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.01350/BIBTEX>
- Antimicrobial Resistance Division (AMR), I. I. and R. C. (IRC). (2024). WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/376776/9789240093461-eng.pdf?sequence=1>
- Arguelles-Arias, A., Ongena, M., Halimi, B., Lara, Y., Brans, A., Joris, B., & Fickers, P. (2009). *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microbial Cell Factories*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-63/TABLES/2>
- Arias, A. A., Ongena, M., Devreese, B., Terrak, M., Joris, B., & Fickers, P. (2013). Characterization of Amylolysin, a Novel Lantibiotic from *Bacillus amyloliquefaciens* GA1. *PLOS ONE*, 8(12), e83037. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0083037>
- Bacon, C. W., Hinton, D. M., & Hinton, A. (2006). Growth-inhibiting effects of concentrations of fusaric acid on the growth of *Bacillus mojavenis* and other biocontrol *Bacillus* species. *Journal of Applied Microbiology*, 100(1), 185–194. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2005.02770.X>
- Castelán-Sánchez, H. G., Dodero, J. V. F., Rojas-Vargas, J., Martínez-Ocampo, F., Hurtado-Ramírez, J. M., Ríos-Vázquez, D. I., Sánchez-Alonso, P., Vazquez-Cruz, C.,

& Rojas-Ruiz, N. E. (2025). Thermophilic *Pseudomonas aeruginosa* strain Ch39 isolated from Chignahuapan hot springs in Puebla, Mexico. *Letters in applied microbiology*, 78(4), ovaf059. <https://doi.org/10.1093/lambio/ovaf059>

Caulier, S., Nannan, C., Gillis, A., Licciardi, F., Bragard, C., & Mahillon, J. (2019). Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Frontiers in Microbiology*, 10(FEB), 435128. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00302/BIBTEX>

Cawoy, H., Debois, D., Franzil, L., De Pauw, E., Thonart, P., & Ongena, M. (2015). Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis*/amyoliquefaciens. *Microbial Biotechnology*, 8(2), 281–295. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12238/SUPPINFO>

Cepas, V., & Soto, S. M. (2020). Relationship between Virulence and Resistance among Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics* 2020, Vol. 9, Page 719, 9(10), 719. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS9100719>

Cheng, C., Sun, J., Zheng, F., Wu, K., & Rui, Y. (2014). Molecular identification of clinical “difficult-to-identify” microbes from sequencing 16S ribosomal DNA and internal transcribed spacer 2. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 13(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-13-1/TABLES/2>

Chmara, H., Zähler, H., & Borovvski, E. (1984). Anticapsin, an active-site directed irreversible inhibitor of glucosamine-6-phosphate synthetase from *Escherichia coli*. *The Journal of Antibiotics*, 37(9), 1038–1043. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.37.1038>

Choudhary, P., Pant, M., & Pant, K. (2023). Importance of Antagonistic Activities of Microbes and Their Metabolites. *Microbial Bioactive Compounds: Industrial and Agricultural Applications*, 249–259. https://doi.org/10.1007/978-3-031-40082-7_14

da Silva, M. R. F., Souza, K., Bezerra, T., Silva, T., Fernandes, D., Silva, F., Araújo, L., Almeida, A., & Oliveira, M. (2023). Unlocking the molecular realm: advanced approaches for identifying clinically and environmentally relevant bacteria. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 56, e12894. <https://doi.org/10.1590/1414-431X2023E12894>

Erega, A., Stefanic, P., Danevčič, T., Smole Možina, S., & Mandic Mulec, I. (2022). Impact of *Bacillus subtilis* Antibiotic Bacilysin and *Campylobacter jejuni* Efflux Pumps on Pathogen Survival in Mixed Biofilms. *Microbiology Spectrum*, 10(4). https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.02156-22/SUPPL_FILE/SPECTRUM.02156-22-S0001.PDF

Erega, A., Stefanie, P., Dogsa, I., Danevčič, T., Simunovic, K., Klančnik, A., Možina, S. S., & Mulec, I. M. (2021). Bacillaene Mediates the Inhibitory Effect of *Bacillus subtilis*

on *Campylobacter jejuni* Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(12). https://doi.org/10.1128/AEM.02955-20/SUPPL_FILE/AEM.02955-20-S0001.PDF

Fessia, A., Barra, P., Barros, G., & Nesci, A. (2022). Could *Bacillus* biofilms enhance the effectivity of biocontrol strategies in the phyllosphere? *Journal of Applied Microbiology*, 133(4), 2148–2166. <https://doi.org/10.1111/JAM.15596>

Gerace, E., Mancuso, G., Midiri, A., Poidomani, S., Zummo, S., & Biondo, C. (2022). Recent Advances in the Use of Molecular Methods for the Diagnosis of Bacterial Infections. *Pathogens*, 11(6), 663. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS11060663/S1>

Gingichashvili, S., Duanis-Assaf, D., Shemesh, M., Featherstone, J. D. B., Feuerstein, O., & Steinberg, D. (2019). The Adaptive Morphology of *Bacillus subtilis* Biofilms: A Defense Mechanism against Bacterial Starvation. *Microorganisms*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8010062>

Grover, M., Nain, L., & Saxena, A. K. (2009). Comparision between *Bacillus subtilis* RP24 and its antibiotic-defective mutants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(8), 1329–1335. <https://doi.org/10.1007/S11274-009-0019-1/METRICS>

Guedes, B. N., Krambeck, K., Durazzo, A., Lucarini, M., Santini, A., Oliveira, M. B. P. P., Fathi, F., & Souto, E. B. (2024). Natural antibiotics against antimicrobial resistance: sources and bioinspired delivery systems. *Brazilian Journal of Microbiology* 2024 55:3, 55(3), 2753–2766. <https://doi.org/10.1007/S42770-024-01410-1>

Hageman, J. H., Shankweiler, G. W., Wall, P. R., Franich, K., McCowan, G. W., Cauble, S. M., Grajeda, J., & Quinones, C. (1984). Single, chemically defined sporulation medium for *Bacillus subtilis*: growth, sporulation, and extracellular protease production. *Journal of Bacteriology*, 160(1), 438. <https://doi.org/10.1128/JB.160.1.438-441.1984>

Huarachi, S. F., Petroselli, G., Erra-Balsells, R., Audisio, M. C., De Jujuy, N., Alberdi, J. B., & Carina, M. (2022). Antibacterial activity against enterovirulent *Escherichia coli* strains from *Bacillus amyloliquefaciens* B31 and *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* C4: MALDI-TOF MS profiling and MALDI TOF/TOF MS structural analysis on lipopeptides mixtures. *Journal of Mass Spectrometry*, 57(12), e4896. <https://doi.org/10.1002/JMS.4896>

Iqbal, S., Begum, F., Rabaan, A. A., Aljeldah, M., Al Shammari, B. R., Alawfi, A., Alshengeti, A., Sulaiman, T., & Khan, A. (2023). Classification and Multifaceted Potential of Secondary Metabolites Produced by *Bacillus subtilis* Group: A Comprehensive Review. *Molecules*, 28(3), 927. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES28030927/S1>

Ji, S., An, F., Zhang, T., Lou, M., Guo, J., Liu, K., Zhu, Y., Wu, J., & Wu, R. (2024). Antimicrobial peptides: An alternative to traditional antibiotics. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 265, 116072. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2023.116072>

Landajuela, A., Braun, M., Rodrigues, C. D. A., & Karatekin, E. (2024). Detection of membrane fission in single *Bacillus subtilis* cells during endospore formation with high temporal resolution. *STAR Protocols*, 5(2). <https://doi.org/10.1016/J.XPRO.2024.102965>

Liang, Q., Liu, Z., Liang, Z., Zhu, C., Li, D., Kong, Q., & Mou, H. (2024). Development strategies and application of antimicrobial peptides as future alternatives to in-feed antibiotics. *Science of The Total Environment*, 927, 172150. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2024.172150>

Lidicker, W. Z. (1979). A Clarification of Interactions in Ecological Systems. *BioScience*, 29(8), 475–477. <https://doi.org/10.2307/1307540>

Logan, N. A., & Vos, P. De. (2015). *Bacillus*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–163. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.GBM00530>

Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2018). *Brock Biology of Microorganisms* (15th Edition, Globa...). Pearson.

Mansouri, F. (2025). Molecular Approaches in Bacterial Identification and Entering. *Journal of Bacteriology & Parasitology*, 16(1), 1–1. <https://doi.org/10.35248/2155-9597.25.16.529>

Mardanov, A. M., Hadieva, G. F., Lutfullin, M. T., Khilyas, I. V., Minnullina, L. F., Gilyazeva, A. G., Bogomolnaya, L. M., Sharipova, M. R., Mardanov, A. M., Hadieva, G. F., Lutfullin, M. T., Khilyas, I. V., Minnullina, L. F., Gilyazeva, A. G., Bogomolnaya, L. M., & Sharipova, M. R. (2016). *Bacillus subtilis* Strains with Antifungal Activity against the Phytopathogenic Fungi. *Agricultural Sciences*, 8(1), 1–20. <https://doi.org/10.4236/AS.2017.81001>

Matloub, A. A., Gomaa, E. Z., Hassan, A. A., Elbatanony, M. M., & El-Senousy, W. M. (2020). Comparative Chemical and Bioactivity Studies of Intra- and Extracellular Metabolites of Endophytic Bacteria, *Bacillus subtilis* NCIB 3610. *International Journal of Peptide Research & Therapeutics*, 26(1), 497–511. <https://doi.org/10.1007/S10989-019-09856-W>

Murugaiyan, J., Anand Kumar, P., Rao, G. S., Iskandar, K., Hawser, S., Hays, J. P., Mohsen, Y., Adukkadukkam, S., Awuah, W. A., Jose, R. A. M., Sylvia, N., Nansubuga, E. P., Tilocca, B., Roncada, P., Roson-Calero, N., Moreno-Morales, J., Amin, R., Krishna Kumar, B., Kumar, A., ... van Dongen, M. B. M. (2022). Progress in Alternative Strategies to Combat Antimicrobial Resistance: Focus on Antibiotics. *Antibiotics* 2022, Vol. 11, Page 200, 11(2), 200. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS11020200>

Nasr, J., Abdessamad, H., Mina, J., Haykal, T., Jamil, Y., Abboud, E., Mahdi, A., Asmar, R., Abi Assaad, R., Alameddine, D., Bourji, A., Mahdi, M., Abdulaal, R., Tomassian, S., El Ahmadieh, H., Azzam, W., Mokhbat, J. E., Moghnieh, R., Rodriguez-Morales, A. J., & Husni, R. (2024). The epidemiology of gram-negative bacteremia in Lebanon: a study

in four hospitals. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 23(1), 90. <https://doi.org/10.1186/S12941-024-00740-0/FIGURES/6>

Peterson, E., & Kaur, P. (2018). Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 9(NOV), 426686. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02928/XML>

Rima, M., Rima, M., Fajloun, Z., Sabatier, J. M., Bechinger, B., & Naas, T. (2021). Antimicrobial Peptides: A Potent Alternative to Antibiotics. *Antibiotics* 2021, Vol. 10, Page 1095, 10(9), 1095. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10091095>

Rocha, M. F. G., Diógenes, E. M., Carvalho, V. L., Marmontel, M., da Costa, M. O., da Silva, V. M. F., de Souza Amaral, R., Gravena, W., do Carmo, N. A. S., Marigo, J., Ocadaque, C. J., Freitas, A. S., Pinheiro, R. M., de Lima-Neto, R. G., de Aguiar Cordeiro, R., de Aquino Pereira-Neto, W., de Melo Guedes, G. M., Sidrim, J. J. C., & de Souza Collares Maia Castelo-Branco, D. (2023). Virulence factors of Gram-negative bacteria from free-ranging Amazon river dolphins (*Inia geoffrensis*). *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 116(5), 447–462. <https://doi.org/10.1007/S10482-023-01812-5/TABLES/4>

Rojas-Ruiz, N. E., Sansinenea-Royano, E., Maria, ;, Cedillo-Ramirez, L., Marsch-Moreno, R., Sanchez-Alonso, P., Candelario Vazquez-Cruz, ;, & Vazquez-Cruz, C. (2015). Analysis of *Bacillus thuringiensis* Population Dynamics and Its Interaction With *Pseudomonas fluorescens* in Soil. *Jundishapur J Microbiol*, 8(9), 27953. <https://doi.org/10.5812/jjm.27953>

Sajayan, A., Ravindran, A., Selvin, J., Ragothaman, P., & Seghal Kiran, G. (2023). An antimicrobial metabolite n- hexadecenoic acid from marine sponge-associated bacteria *Bacillus subtilis* effectively inhibited biofilm forming multidrug-resistant *P. aeruginosa*. *Biofouling*, 39(5), 502–515. <https://doi.org/10.1080/08927014.2023.2232722>

Serrano, H. M. (2025). Caracterización Microbiológica y Bioquímica de cepas de *Salmonella* spp y *Shigella* spp aisladas de muestras de agua residual. [Tesis de licenciatura en Biotecnología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla]. Repositorio Institucional <https://repositorioinstitucional.buap.mx/server/api/core/bitstreams/6c274693-3d46-4908-9e73-a17efa4110c1/content>.

Singh, A., Shahid, M., Khan, P. A., Khan, H. M., & Sami, H. (2022). An Overview on Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Beta-Lactam Resistance in Gram-Negative Bacteria: Threats and Challenges*, 3–15. https://doi.org/10.1007/978-981-16-9097-6_1/FIGURES/7

Tamilarasu, A., Ahilan, B., Gopalakannan, A., & Somu Sunder Lingam, R. (2021). Evaluation of probiotic potential of *Bacillus* strains on growth performance and physiological responses in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 52(7), 3124–3136. <https://doi.org/10.1111/ARE.15159>

Tang, Z., Cao, X., & Zhang, H. (2023). Production of iturin A by *Bacillus velezensis* ND and its biological control characteristics. *Journal of Basic Microbiology*, 63(2), 179–189. <https://doi.org/10.1002/JOBM.202200473>

Tazehabadi, M. H., Algburi, A., Popov, I. V., Ermakov, A. M., Chistyakov, V. A., Prazdnova, E. V., Weeks, R., & Chikindas, M. L. (2021). Probiotic *Bacilli* Inhibit *Salmonella* Biofilm Formation Without Killing Planktonic Cells. *Frontiers in Microbiology*, 12, 615328. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.615328>

Toutiaee, S., Mojgani, N., Harzandi, N., Moharrami, M., & Mokhberosafa, L. (2022). In vitro probiotic and safety attributes of *Bacillus* spp. isolated from beebread, honey samples and digestive tract of honeybees *Apis mellifera*. *Letters in Applied Microbiology*, 74(5), 656–665. <https://doi.org/10.1111/LAM.13650>

Tran, C., Cock, I. E., Chen, X., & Feng, Y. (2022). Antimicrobial *Bacillus*: Metabolites and Their Mode of Action. *Antibiotics*, 11(1), 88. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS11010088/S1>

Wang, T., Zhang, T., Dai, X., Wang, W., & Wang, J. (2022). Control strategies for biofilm control in reclaimed water distribution systems from the perspective of microbial antagonism and electrochemistry. *Science of The Total Environment*, 834, 155289. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.155289>

Wekesa, T. B., Wekesa, V. W., Onguso, J. M. are, Kavesu, N., & Okanya, P. W. (2024). Study of Pathogenicity Test, Antifungal Activity, and Secondary Metabolites of *Bacillus* spp. from Lake Bogoria as Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Kühn in *Phaseolus vulgaris* L. *International Journal of Microbiology*, 2024(1), 6620490. <https://doi.org/10.1155/2024/6620490>

Wulff, E. G., Mguni, C. M., Mansfeld-Giese, K., Fels, J., Lübeck, M., & Hockenhull, J. (2002). Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* and *B. pumilus* isolates with distinct antagonistic potential against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Plant Pathology*, 51(5), 574–584. <https://doi.org/10.1046/J.1365-3059.2002.00753.X>

Zhang, L., & Sun, C. (2018). Fengycins, cyclic lipopeptides from marine *Bacillus subtilis* strains, kill the plant-pathogenic fungus *Magnaporthe grisea* by inducing reactive oxygen species production and chromatin condensation. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(18), 445–463. https://doi.org/10.1128/AEM.00445-18/SUPPL_FILE/ZAM018188718S1.PDF

Zhao, W., Ji, L., Li, J., Liu, D., Yan, C., Zhang, C., Wang, X., Liu, Y., & Zheng, S. (2024). MESAconate from *Bacillus subtilis* R0179 Supernatant Attenuates Periodontitis by Inhibiting *Porphyromonas gingivalis* in Mice. *Journal of Periodontal Research*. <https://doi.org/10.1111/JRE.13363>