



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Título:

“Extracción y análisis antibacterial de lipopéptidos ciclicos (CLps) producidos por *Bacillus velezensis* VM1054”

Tesis

Para obtener el grado de:
Licenciado en Biotecnología

Presenta:

Edgar Baltazar Zúñiga

Directora de tesis:

Dra. Verónica Liliana Ramírez Falcon

Codirector de tesis:

Dr. José Antonio Munive Hernández



Agosto de 2025

Agradecimientos

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por ser la sede de mi formación profesional como biotecnólogo.

A los docentes de la Facultad de Ciencias biológicas por haber compartido sus valiosos conocimientos a lo largo de mi preparación, permitiéndome crecer día a día como profesional, gracias por su dedicación y tolerancia.

A mi directora y Co-director de tesis, la Dra. Verónica y el Dr. Munive, gracias por darme la oportunidad de trabajar junto a ustedes, por su dedicación y paciencia, que sin sus conocimientos y consejos no hubiera podido llegar a la etapa final de mi licenciatura.

A mis amigos y compañeros que han estado conmigo a lo largo de esta bonita etapa, dentro y fuera de la universidad, con los que pasé tantas y bonitas experiencias, sin duda, son de los mejores regalos que me pudo dejar biotecnología.

A mi mejor amiga, Sharon Lezama, gracias por haber estado conmigo cuando creía que ya no podría más, gracias por cada una de tus palabras para que continuara con mis sueños, te quiero mucho.

A mi hermana, Gaby, has sido una persona de admirar por tomar tus propias decisiones, pese a todo, gracias por ser la hermana que eres, te amo mucho, ahora es momento de continuar creciendo y que nuestros papás se sientan orgullosos de nosotros.

Pero sobre todo quiero agradecer a mis padres, quienes han estado conmigo en cada momento, sin duda, dejar la casa ha sido la decisión más dolorosa de mi vida y pese a ello, siempre los he sentido cerca, gracias por todo su amor, paciencia y esfuerzo, gracias por confiar en mí y ayudarme a ser la persona que soy. No le puedo pedir nada más a la vida, me dio a los mejores papás, los amo infinitamente.

Gracias a cada una de las personas, que han aportado a mi formación como profesional y ser humano.

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1 Epidemiología.....	2
2.2 CLps y su efecto antimicrobiano Antiviral, antibacterial, antifúngico.....	3
2.3 Genero <i>Bacillus</i> y la producción de CLps	4
2.3.1 <i>Bacillus velezensis</i> y producción de CLps.....	4
2.4 CLps de interés.....	5
2.4.1 Iturinas.....	5
2.4.2 Surfactina.....	7
2.4.3 Fengicina.....	8
2.4.4 Plipastatinas.....	9
2.4.5 Macrolactina A.....	10
2.5 Análisis estructural	
2.5.1 Resonancia Magnética Nuclear.....	11
2.5.1.1 Espectrómetro de RMN.....	12
2.5.2 MALDI-TOF.....	13
3. Antecedentes	14
4. Justificación	14
5. Objetivos e hipótesis	15
5.1 Objetivos generales.....	15
5.1.1 Objetivos particulares.....	15
5.2 Hipótesis	15
6. Material y métodos	15
6.1 Material biológico.....	15
6.2 Amplificación de genes productores de CLps de interés (Surfactina, Macrolactina A, Lactococina, tiazolipeptido).	15
6.3 Extracción de metabolitos producidos por <i>B.velezensis</i> VM1054.....	16
6.4 Cromatografía.....	17

6.5 Pruebas de inhibición.....	19
6.6 Resonancia Magnética Nuclear.....	20
6.7 Análisis por MALDI-TOF.....	20
7. Resultados.....	20
7.1 Amplificación de genes.....	20
7.2 Pruebas de inhibición.....-	21
7.3 Cromatografía.....	22
7.4 Resonancia Magnética Nuclear.....	26
7.5 Análisis por MALDI-TOF.....	27
8. Discusión.....	29
9. Conclusión.....	31
10. Bibliografía.....	32
11. Anexo.....	42

1. Resumen

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, actualmente la resistencia a antimicrobianos se considera como una gran amenaza a la salud pública en México y el mundo, la cual sino se atiende solo incrementará las afectaciones en el futuro, esto debido al consumo indiscriminado de antibióticos, que ha permitido aumentar la farmacoresistencia de los microorganismos, por lo que, la búsqueda de nuevas alternativas antimicrobianas es de suma importancia.

En los últimos años ha aumentado el número de investigaciones sobre diferentes péptidos producidos por diferentes cepas bacterianas, entre estos tenemos a los lipopéptidos cíclicos (CLps), producidos principalmente por bacterias de los géneros *Bacillus* y *Streptomyces*, los cuales gracias a su estructura cíclica y componente lipídico mantienen una gran estabilidad, y facilitan su mecanismo de acción que consiste en insertarse en la membrana celular formando poros hasta causar una deshidratación de la región polar, que a su vez causa un desequilibrio osmótico y por último la muerte celular. Una de las grandes ventajas de este mecanismo de acción es que difícilmente fomenta la resistencia bacteriana, por lo que prometen ser la alternativa del futuro.

Como ya ha sido reportado por otros autores, el género *Bacillus* ha mostrado ser un gran productor de CLps, con una alta eficiencia contra distintos hongos, por lo tanto durante este trabajo se buscó evaluar la producción de CLps por *Bacillus velezensis* VM1054 a las 24 h de crecimiento, así como su capacidad para inhibir a dos cepas bacterianas de interés médico (*S.aureus* y *E.coli*), también se aproximó a la elucidación de la estructura de los compuestos y características que ayuden a identificarlos y purificarlos. Para eso se realizaron cultivos en medio líquido LB de la cepa y se incubó durante 24 h, para posteriormente separar los metabolitos de las células bacterianas por filtración y extraerlos con solventes de diferente polaridad y así finalmente purificarlos mediante cromatografía de capa fina (TLC), los cuales una vez purificados fueron usados para realizar las pruebas de inhibición, de igual modo los metabolitos aislados fueron llevados a análisis por espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear, y finalmente al análisis por espectrometría MALDI-TOF. Los análisis realizados en este estudio mostraron la presencia de al menos 5 metabolitos que causan inhibición de *S.aureus* y 2 causantes de inhibición de *E.coli*, también se demostró que en tan solo 24 h de crecimiento produjo surfactinas, iturinas y fengicinas, por su parte el análisis de RMN nos dio información sobre la estructura de algunos compuestos, pero desafortunadamente por causas fuera de nuestro control no fue posible analizar todos los compuestos aislados.

Con los resultados obtenidos podemos concluir que *B. velezensis* VM1054 presenta metabolitos secundarios con propiedades antibacterianas de gran potencial, y que la extracción y purificación de dichos metabolitos mediante solventes y TLC es un procedimiento viable y a costos accesibles, lo que abre la posibilidad de nuevas

investigaciones que permitan mejorar su producción para que se convierta en una opción viable para ser aplicados en el área médica.

2. Introducción

2.1 Epidemiología

La resistencia a los antimicrobianos se puede originar a nivel celular con mutaciones ocasionadas por la falla de la respuesta SOS, la transferencia horizontal de genes o el desarrollo de biopelículas, esto acelerado por el uso desmedido de fármacos (Asenjo, Oteo & Alós, 2021; Cheng G, Et al.,2016) por lo que durante estos años se ha vuelto preocupante la creciente aparición de agentes patógenos farmacorresistentes, que han provocado una alarmante propagación de infecciones que no pueden tratarse con los medicamentos antimicrobianos, como los antibióticos de los que disponemos actualmente. Esta situación se vuelve aún más preocupante debido a que la línea de desarrollo clínico de nuevos antimicrobianos está agotada. En 2019, la Organización Mundial de la Salud (OMS) determinó que había 32 antibióticos en fase de desarrollo clínico capaces de combatir los patógenos prioritarios de la OMS, de los cuales solo seis se clasificaron como innovadores (WHO, 2021).

Se estima que en 2050 la mitad de todas las muertes serán producidas por microorganismos resistentes a múltiples fármacos como *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp. Esto debido a la alta tasa de reproducción y plasticidad genética de las bacterias, la aparición de nuevos mecanismos de resistencia a antibióticos que se ha visto acelerada por la presión selectiva que implica el uso desmedido de estos fármacos (Asenjo, Oteo, & Alós, 2021; WHO,2021; Santajit & Indrawattana, 2016).

En México esta problemática también está cobrando relevancia por el incremento notorio de casos clínicos de infecciones donde la bacteria es resistente a más de un antibiótico, como es el caso de la tuberculosis causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* que mientras en el año 2000 solo presentaba 4 casos de tuberculosis resistente, en el periodo 2009-2018 se notificaron en promedio 256 casos por año y para el periodo 2019-2021 fueron reportados en promedio 610 casos por año (Saavedra N.,2022). Sin embargo, este no es el único ejemplo ya que mediante un estudio realizado por Camacho y colaboradores (2020) durante el periodo de 2016-2019 en el norte de México se aislaron de muestras de pacientes 166 bacterias de las cuales el 58 % fueron gramnegativas entre las que destacaron *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* y por parte de las grampositivas destacaron *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*. De las 166 bacterias aisladas determinaron que 114

contaban con multirresistencia, 7 con resistencia extendida y 2 panresistentes, lo que demuestra la urgencia por encontrar nuevas maneras de combatir esta problemática.

2.2 CLps y su efecto antimicrobiano antiviral, antibacterial, antifúngico

Los lipopéptidos son biosurfactantes con la capacidad de reducir la tensión superficial de dos sistemas de fase y tienen propiedades como la biodegradabilidad, la baja toxicidad y sensibilidad a entornos extremos (Rahman et al., 2021), sin embargo, actualmente la producción de biosurfactantes es muy elevada, lo que le impide competir contra la producción de surfactates sintetizados químicamente.

Los Lipopéptidos cíclicos (CLps) son moléculas anfifílicas, obtenidos como metabolitos secundarios con capacidad antibacteriana, antifúngica, antiviral e incluso antitumoral, aunque para ser activos, requieren inducción transcripcional, traducción y modificaciones postraduccionales (Urajová et al.,2016; Balleza et al.,2019; Beltrán-Gracia et al., 2017). Consisten en la biosíntesis de lipopéptidos antimicrobianos a través de la síntesis del péptido no ribosómico (SPNR) formando una estructura química de estas proteínas cíclicas donde comprende un ácido graso, que se puede incorporar a la cadena principal del péptido con 7 a 10 aminoácidos mediante ciclación (a menudo, en el carbono C2 o C3) por grupos amino o hidroxilo (Nasompag et al., 2015; Maithani et al.,2022).

Los CLps son ampliamente utilizados como antifúngicos en plantas, sin embargo, tienen diferentes aplicaciones como conservantes de alimentos y biosurfactantes en la industria farmacéutica (Mnif & Ghribi, 2015), su amplio espectro antimicrobiano se debe a sus mecanismos de acción que implican la alteración de las membranas objetivo mediante la formación de poros o la solubilización de la membrana. Gracias a que los CLps son moléculas anfipáticas, la adsorción de CLps en la parte externa de la membrana se determina, inicialmente, por interacciones electrostáticas. La adsorción de CLps debe ser muy efectiva, induciendo un cambio en los potenciales de superficie y dipolo, generando también presiones en la superficie. Dado que estos efectos dependen de la dosis, a altas concentraciones, los CLps favorecerían la formación de poros hidrofílicos permeables a pequeños iones y, además, a grandes moléculas o incluso proteínas, a su vez la inserción de las colas hidrofóbicas de los biosurfactantes en la membrana resulta en la expansión lateral asimétrica de la capa superior de la bicapa lipídica, lo que perturba el grado de hidratación a medida que aumenta la curvatura local de la membrana y desestabilizándola (Balleza et al., 2019).

Las cualidades más importantes de los CLps son su capacidad para interactuar con membranas lipídicas a través de sus largas cadenas, su segunda cualidad más importante es que ciertos aminoácidos de la zona peptídica a menudo tienen la configuración d- en lugar de la habitual l-, lo que al parecer ayuda a resistir la acción

de las peptidasas y proteasas, así como la temperatura en ciertos casos (Beriasvili et al. 2018; Hamley 2015).

La mayoría de los CLps son producidas por los géneros de bacterias *Actinomyces*, *Streptomyces*, *Bacillus* y *Pseudomonas* (Schneider et al., 2014). Podemos encontrar dos tipos de CLps, los catiónicos como lo son polimixinas, octapeptinas, polipeptinas o no catiónicos como surfactinas, iturinas, bacilomicinas y fengicinas (Cochrane & Vederas, 2016).

2.3 Género *Bacillus* y la producción de CLps

El género *Bacillus* fue descrito como bacterias formadoras de endosporas resistente al calor en 1872 por Ferdinand Cohn, esta especie se encuentra categorizada en el reino bacteria; Filo Bacillota o Firmicutes; Clase Bacilli; Orden Bacillales y Familia Bacillaceae (Maughan y Van Der Auwera. 2011). Aunque a pesar de mostrar una amplia gama de propiedades fenotípicas, no hay característica que sea exclusiva de todas las especies de *Bacillus* ya que estas pueden ser bastones o cocos, aerobias, anaerobias, móviles o inmóviles (Patel & Gupta, 2020). Gracias a la cualidad de formar endosporas altamente resistentes es posible encontrar esta especie en diferentes tipos de hábitad en el mundo, sin embargo, el hábitad más común es el suelo debido a que la mayor parte de especies *Bacillus* son saprófitas, lo que les permite aprovechar los diferentes sustratos orgánicos que ahí se encuentran (Zeigler & Perkins, 2021).

Este género ha sido ampliamente utilizado en diferentes sectores como la agricultura (biopesticida, promotor del crecimiento vegetal), producción de biocombustibles (isobutanol y H₂), en la industria (productos químicos, antibióticos, vitaminas, enzimas alimentarias) y en el área médica ya que, a pesar de la existencia de ejemplares mortales como *Bacillus anthracis*, son numerosos los productos que pueden ser obtenidos en pro de la medicina como lo son los antimicrobianos, proteínas humanas, vacunas e incluso probióticos, además de su aprovechamiento para la producción de productos heterólogos (Zeigle & Perkins, 2021; Kumar et al, 2013, Elshaghabee et al, 2017).

2.3.1 *Bacillus velezensis* y producción de CLps

Entre las especies más estudiadas del género *Bacillus* tenemos a *B. licheniformis*, *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*, sin embargo, en los últimos años *B. Velezensis* ha llamado la atención por diversos investigadores. Esta especie fue descrita como una bacteria Gram positiva, con una temperatura de crecimiento entre 15 °C y 45 °C, así como un rango de pH óptimo de 5 – 10 (Ye et al, 2018), la cual en un principio se consideraba idéntica a *B. amyloliquefaciens* pero ahora se sabe que muestran características genómicas distintas (Chun et al, 2019; Adeniji, Loots & Babalola, 2019). Diferentes especies de *Bacillus velezensis* se han aislado de suelo y aguas tanto marinas como residuales, aunque principalmente se pueden encontrar en las raíces de las plantas, ya que pueden ayudar al crecimiento de estas (Monzón-

Atienza et al, 2021; Jang et al, 2023). Se ha descrito que *B. Velezensis* produce una gran variedad de intermediarios metabólicos, que incluyen antibióticos, bacteriocinas, enzimas, fitohormonas, antioxidantes y promotores de crecimiento (Rabbee et al, 2019; Kenfaoui et al, 2024).

Como se mencionó anteriormente en un principio se consideraba a *B. Velezensis* era idéntica a *B. Amyloliquefaciens*, posterior a eso en base a la comparación de la secuencia del gen 16S rRNA se notó que compartían una similitud del 99 % , por lo que se propuso a *B. Velezensis* como un sinónimo heterotípico posterior de *B. amyloliquefaciens* (Wang et al, 2008), sin embargo, Dunlap y col. (2016) mediante el análisis por genómica comparativa y cálculos de relación DNA-DNA se demostró que *B. Velezensis* no es sinónimo de *B. amyloliquefaciens*, Además de que los análisis de morfología, fisiología, taxonomía química y filogenética mostraron que las dos cepas tenían la consistencia fenotípica y genotípica. En base a eso Fan et al. (2017) llevaron a cabo una nueva investigación utilizando los análisis de tetranucleótido (TETRA), promedio de identidad de nucleótidos (ANI), identidad de aminoácidos promedio (AAI) e hibridación digital ADN-ADN (dDDH) de los genomas centrales, y gracias a los resultados obtenidos, afirmar que *B. velezensis* precede a *B. amyloliquefaciens* toma mayor credibilidad.

Análisis genómicos realizados a *B. velezensis* muestran la capacidad de esta especie para producir metabolitos secundarios con la capacidad de promover el crecimiento de plantas, así como la inducción de una respuesta sistemática para la defensa de las plantas ante ataques virulentos y la inhibición de otros patógenos, entre estos metabolitos tenemos lipopéptidos cíclicos (surfactina, bacilomicina-D, fengicina y bacilibactina) y policétidos (macrolactina, bacillaene y difficidina), aunque la mayoría de las investigaciones se han enfocado en su aplicación agrícola posiblemente debido a que las cepas estudiadas suelen aislarse del suelo, la investigación sobre su uso en el área médica, farmacéutica, medioambiental y alimenticia ha aumentado en estos años, por lo que profundizar los estudios respecto a sus metabolitos incrementa su importancia (Rabbee et al, 2019; Adeniji et al, 2019), ya que se estima que *Bacillus velezensis* FZB42 posee un 10% de su genoma dedicado a la síntesis de diferentes antimicrobianos (Saxena et al., 2019).

2.4 CLps de interés

2.4.1 Iturinas

Las iturinas son un grupo de péptidos antimicrobianos producidos por diversas cepas del género *Bacillus*, notablemente *Bacillus subtilis*. Químicamente, las iturinas son lipopéptidos, lo que significa que su estructura consta de una cadena peptídica cíclica unida a una cadena lipídica conformada con 14-17 átomos de carbono (véase figura 1). La parte peptídica está formada por una secuencia de aminoácidos que pueden variar entre los diferentes miembros de este grupo, pero comúnmente incluyen aminoácidos como alanina, leucina y serina, que son

importantes para su actividad biológica. La parte lipídica, por otro lado, conferida por la presencia de un ácido graso, permite que las iturinas interactúen con las membranas celulares de los patógenos, un aspecto clave en su mecanismo de acción. La estructura de las iturinas es versátil y presenta una conformación helicoidal que se ha relacionado con su capacidad para formar poros en las membranas de los microorganismos, determinando así su eficacia antimicrobiana (Valenzuela et al., 2020; Sanchez F., 2016).

Las iturinas han demostrado poseer destacadas propiedades antimicrobianas, lo que las convierte en candidatos prometedores para diversas aplicaciones en biotecnología. Estas sustancias, producidas principalmente por cepas de *Bacillus*, exhiben actividad contra una amplia gama de microorganismos, incluyendo bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como algunos hongos y parásitos (Ragazzo et al., 2011). Se ha evidenciado que las iturinas tienen la capacidad de alterar la membrana celular de los patógenos, lo que resulta en un aumento de la permeabilidad, la eventual lisis celular y la muerte del microorganismo. Estos compuestos son particularmente efectivos contra patógenos resistentes a antibióticos convencionales, lo que sugiere su potencial como agentes antimicrobianos en el tratamiento de infecciones difíciles. Su eficacia se ve reforzada por la baja toxicidad en células eucariotas, lo que permite un amplio margen de seguridad para su uso (Akbar et al., 2021; Zhang et al., 2010). Además, las iturinas no solo actúan como agentes antibacterianos, sino que también presentan propiedades fungicidas y son capaces de inhibir el crecimiento de diversos tipos de hongos filamentosos y levaduras, lo que agrega valor a su aplicación en la preservación de productos agrícolas y alimentarios (Ongena & Jacques, 2008; Xiao et al., 2021).

Las iturinas interactúan con las membranas y una vez que se insertan en la bicapa lipídica, inducen la formación de poros que alteran la permeabilidad celular, permitiendo el paso no controlado de iones y otros compuestos. La evidencia experimental sugiere que estos poros se forman por la presencia de micelas formadas por CLPs y agregados de CLPs/fosfolípidos. Estas actividades son sensibles a varios factores electrostáticos y mecánicos, entre los cuales dos de los más importantes son la longitud de la cadena acilo del CLP y la curvatura de la membrana objetivo (Balleza et al., 2019; Yang et al., 2024). Este proceso conduce a la desestabilización de la homeostasis interna y, en última instancia, a la muerte celular. En combinación con su capacidad para inducir mecanismos de apoptosis en células eucariotas, las iturinas muestran un potencial considerable no solo contra bacterias, sino también frente a determinados tipos de hongos y levaduras patógenas (Han et al., 2024).

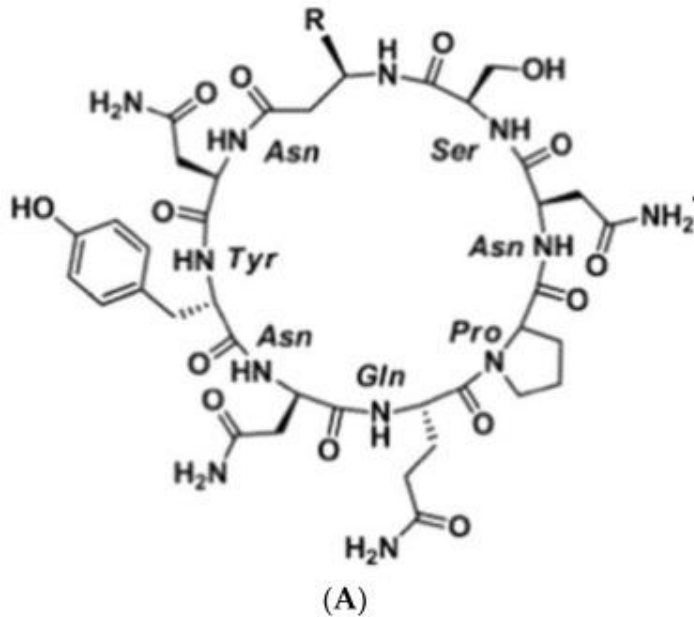


Figura 1. Estructura cíclica de la iturina (Imagen obtenida de Yaraguppi et al., 2023).

2.4.2 Surfactina

A diferencia de la fengicina y la iturina, la surfactina posee una capacidad antifúngica limitada, aunque mantiene altas actividades antibacterianas, antivirales, antiinflamatorias ya que inhibe significativamente el aumento de la expresión de IFN- γ , IL-6 y óxido nítrico, esto sin efectos de citotoxicidad a ciertas concentraciones, e incluso actividades hemolíticas ya que es capaz de lisis glóbulos rojos e inhibir la formación de coágulos sanguíneos (Zhang et al., 2015; Wang et al., 2024; Rahman et al., 2021).

La surfactina es un lipopéptido cíclico considerada como uno de los biosurfactantes más potentes gracias a su fuerte actividad como tensoactivo, lo cual le permite formar micelas, usualmente a bajas concentraciones de agua, las cuales una vez cerca de la membrana celular permite que las moléculas individuales se inserten en la membrana externa y desorganicen la bicapa lipídica con lo cual se permite la entrada de más moléculas de surfactina para unirse a la capa interna, que a su vez ayuda a la formación de poros transitorios, por último, las micelas formadas contribuyen a destruir la membrana a través de un efecto detergente, provocando la pérdida de osmólitos, sin embargo, su actividad puede verse reducida por diferentes factores como el aumento de la longitud de ácidos grasos, la presencia de lípidos cargados negativamente y el potencial dipolar de la membrana. La molécula modelo de la surfactina consta de una cadena peptídica cíclica con 7 aminoácidos y una cadena de ácidos grasos hidroxilo de 13 a 16 átomos de carbono, creando una estructura de anillo de lactona cíclica (véase figura 2). En las posiciones 2,3,4,6 y 7 se encuentran aminoácidos hidrofóbicos, mientras que en la posición 1 se encuentra un residuo de glutamilo y un residuo de aspartilo en la

posición 5, las cuales añaden dos cargas negativas a la molécula, los isómeros encontrados de las surfactinas pueden variar con diferentes longitudes de cadena alifática (Zhen et al., 2023; Balleza et al., 2019; Barros et al., 2007).

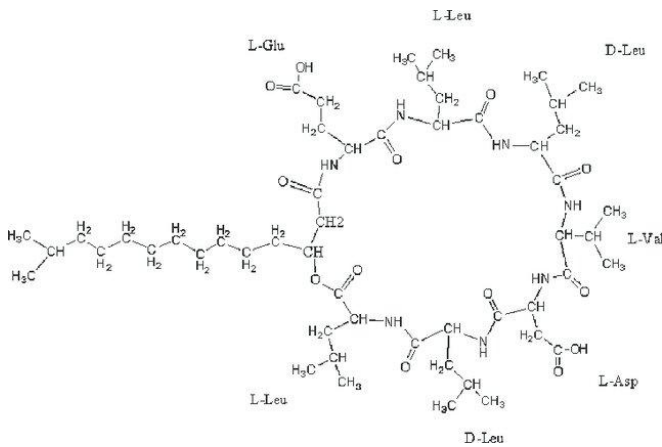


Figura 2. Estructura de la isoforma principal de la surfactina (obtenida de Barros et al. 2007)

2.4.3 Fengicina

Vanittanakom et al. (1986) describieron a la fengicina como un complejo lipopéptido que ha mostrado propiedades antifúngicas, donde interfiere con las funciones de membrana y de la pared celular al promover la curvatura de ambas capas induciendo un adelgazamiento y causando una ruptura transitoria de la membrana o desorden local de la bicapa, conduciendo a cambios en la permeabilidad, este mecanismo de acción ayuda a evitar que los patógenos desarrollen resistencia, sin embargo, esta actividad puede ser antagonizada por la concentración de esteroides, fosfolípidos y ácido oleico. En el caso de los esteroides una alta concentración puede reducir la actividad de las fengicinas, por el contrario, para el caso de las bacterias una mayor presencia de esteroides puede mejorar la afinidad del lipopeptido, gracias a que las fengicinas son compuestos anfipáticos tienden a insertarse con mayor facilidad en regiones ricas en fosfolípidos, (Balleza et al., 2019; Falardeau et al. 2013; Eeman et al., 2009). El mecanismo de acción de la fengicina abarca más que el ataque a la superficie del patógeno. Ya que también pueden afectar diferentes metabolismos intracelulares al penetrar la membrana celular y una vez que se une al ADN es capaz de interferir con la expresión génica, lo que influye en la síntesis de sustancias activas y orgánulos, como es el caso de la C-16 fengicina A que inhibió los genes clave Fks1, Gls1 y Chs1 en la síntesis de la pared celular de *Candida albicans* (Liu et al., 2019)

La familia de las fengicinas se compone principalmente por una cadena de ácidos grasos con 14 a 16 carbonos y una cadena peptídica con 10 residuos de aminoácidos (véase figura 3) además de una masa molecular de 1,541 daltons. Se ha observado que homólogos de la fengicina con cadenas de ácidos grasos de

diversas longitudes exhiben diversas actividades antifúngicas, incluso la disposición de los aminoácidos en la fengicina puede determinar la estructura espacial y la distribución de la carga de su molécula, por lo que los cambios en la secuencia y composición de aminoácidos también pueden afectar la actividad de la fengicina. Se ha determinado que la fengicina es soluble en solventes orgánicos polares como metanol y ligeramente soluble en diclorometano. También se ha observado que se mantiene estable a pH de 4 y 10 por varios días a temperatura ambiente, así mismo, mantuvo su actividad antifúngica durante 5 meses (Sun, J., Qi, X., & Du, C.,2025; Vanittanakom et al.,1986; Ait Kaki et al.,2020).

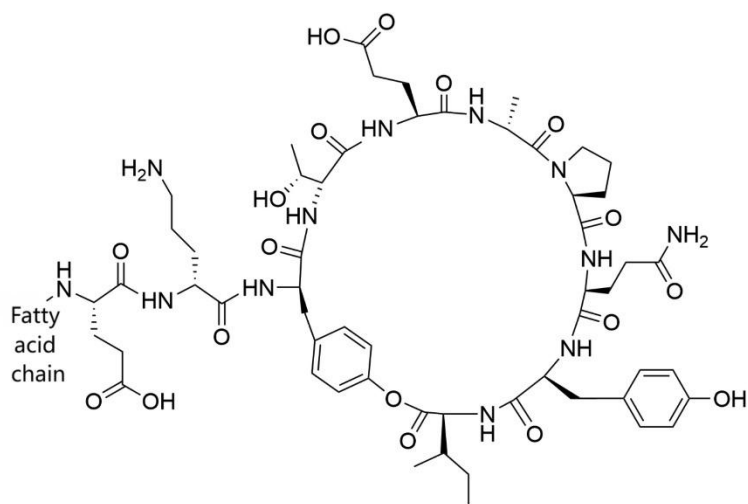


Figura 3. Estructura principal de la familia de las fengicinas (obtenida de Chen et al.,2025).

2.4.4 Plipastatinas

Las plipastatinas son lipopéptidos cíclicos producidos principalmente por especies del género *Bacillus*, con aplicaciones prometedoras en biocontrol agrícola y biomedicina. Estos compuestos destacan por su actividad antifúngica contra patógenos vegetales como *Fusarium oxysporum* y *Botrytis cinerea*, así como por su capacidad antibacteriana frente a bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*. Su estructura molecular, caracterizada por un núcleo peptídico unido a una cadena de ácido graso β-hidroxilado, le confiere propiedades anfipáticas críticas para su interacción con membranas celulares (Vahidinasab et al., 2020; Ma & Hu, 2018).

La plipastatina se caracteriza por una estructura molecular que combina un núcleo peptídico cíclico de diez aminoácidos con una cadena lateral de ácido graso β-hidroxilado (véase figura 4). Esta configuración le otorga una naturaleza anfifílica, es decir, presenta una región hidrofóbica (la cadena de ácido graso) y una región hidrofílica (el anillo peptídico), lo que resulta fundamental para su comportamiento en medios acuosos y su interacción con membranas biológicas (NCBI, 2025). La

variaciones en la posición y número de enlaces olefinicos en el anillo de lactona (Wu, Xiao & Li, 2020). La estructura principal de la macrolactina se ensambla a través de una vía policétido sintetasas (PKS) de tipo I sin aciltransferasa (AT), se empieza codificando una trans-aciltransferasa, la cual se utiliza repetitivamente para la translocación de alonil-CoA en las unidades de extensión, posteriormente mediante condensación de Claisen repetida 11 veces se forma la cadena de policetona; por último el grupo hidroxilo terminal de la cadena, mediante un ataque nucleofílico al grupo carbonilo activado por tioéster se genera la macrolactina A (Lohman et al, 2015;Liu et al, 2014; Schneider et al, 2007).

La macrolactina A es un metabolito secundario producido por diferentes especies de *Bacillus* en gran abundancia en comparación a otras bacteriocinas, su estructura consta de veinticuatro carbonos, veintitrés hidrógenos, seis dobles enlaces carbono-carbono, un grupo éster y tres grupos hidroxilo (véase figura 5) y es producida de forma no ribosómica mediante policétidos sintetetasas (Wu et al, 2021; Zhang et al, 2022).

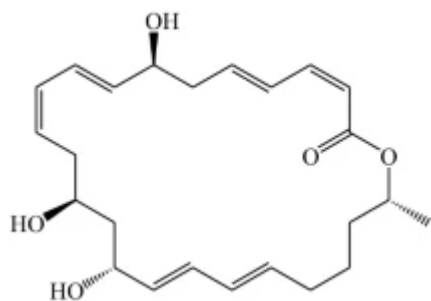


Figura 5. Estructura de la macrolactina A (Zhang et al. 2022).

Esta macrolactina tiene una gran capacidad antimicrobiana principalmente dirigida a patógenos humanos como *S.aureus* y *E.coli*, se ha encontrado que puede alterar las estructuras celulares, así como la división celular, y aunque aún no se saben por completo los procesos completos de acción, ahora se sabe que la macrolactina es capaz de inhibir la síntesis de proteínas bacterianas (Kim et al, 2011; Zhang et al, 2022; Vasilchenko et al, 2025).

2.5 Análisis estructural

2.5.1 Resonancia Magnética Nuclear

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una técnica que utiliza campos magnéticos externos y los aplica a momentos magnéticos de los núcleos de espín $\frac{1}{2}$ en materiales como el agua, el carbono y el nitrógeno, esto con la finalidad de rastrear las distribuciones de diferentes núcleos dentro de una muestra del material. Al realizar este análisis podemos conocer la distribución de núcleos particulares en

un material, la estructura de las moléculas en las que residen los núcleos y las propiedades de los enlaces químicos en los que participan (Simon, D., 2025).

Mientras que otras técnicas de espectroscopia pueden determinar la naturaleza de los grupos funcionales presentes en la muestra, la RMN además es capaz de proporcionar los datos necesarios para elucidar la estructura completa de una molécula, entre las fortalezas de esta técnica encontramos el hecho de que se pueden analizar cantidades muy pequeñas de muestra como miligramos e incluso microgramos, además de no ser una técnica destructiva, por lo que es una opción bastante viable para estudios estructurales complejos, desarrollo de protocolos e incluso para ensayos de calidad (Simsek, S., Reuhs, B.L.,2024).

Esta técnica se basa en la absorción de radiación electromagnética del rango de radiofrecuencia (4 a 900 MHz), dicha absorción es realizada mediante los núcleos atómicos en presencia de un campo magnético externo perpendicular al campo electromagnético de radiofrecuencia, sin embargo, no todos pueden ser excitados de esta manera, ya que solo es posible con aquellos donde el número de protones y neutrones no es par, esta es la razón por la que la mayoría de los isotopos más comunes de los elementos no son los analizados mediante RMN, por ejemplo el isotopo más común del carbono (^{12}C) no es adecuado, ya que contiene 6 protones y 6 neutrones, por lo que es necesario utilizar el isotopo ^{13}C , una vez que los núcleos absorben dicha radiación se produce el fenómeno de resonancia (de ahí su nombre) el cual es registrado por el equipo (Ritgen, U.,2025).

Entre los análisis más comunes utilizados para analizar los isotopos ^1H y ^{13}C tenemos la espectroscopia de correlación (COSY) el cual es un ensayo bidimensional donde se revelan las correlaciones entre protones acoplados a través de enlaces químicos, lo que permite identificar qué protones están conectados entre sí dentro de una molécula. Usualmente se acopla al ensayo de coherencia cuántica única heteronuclear seleccionada por gradiente (gHSQC) donde se correlaciona los protones con los núcleos de carbono o nitrógeno ayudando a determinar qué ^1H están conectados a qué átomos de carbono o nitrógeno. En el caso de ensayos unidimensionales contamos con la prueba de protón adjunto (APT) el cual permite distinguir entre carbonos primarios (CH_3), secundarios (CH_2), terciarios (CH) y cuaternario (C), usualmente acompañado de una técnica de mejora sin distorsión mediante transferencia de polarización (DEPT) la cual mejora la sensibilidad de los espectros de ^{13}C RMN y permite diferenciar los tipos de carbonos según el número de protones unidos (Breton & Reynolds.,2013; Hunger & Brunner.,2004).

2.5.1.1 Espectrómetro de RMN

La RMN se mide utilizando un espectrómetro de RMN (véase figura 6a), la muestra es colocada en una sonda, que se encuentra dentro de un imán superconductor (enfriado con helio y nitrógeno líquidos) encargado de generar el campo magnético externo (véase figura 6b), el campo de electromagnético de radiofrecuencia se

genera mediante una bobina transversal enrollada perpendicularmente al tubo de muestra (véase figura 6c), dicha bobina sirve como transmisor, induciendo la señal de RMN, y a su vez como receptor, detectando la señal de RMN (Březina, V., 2024).

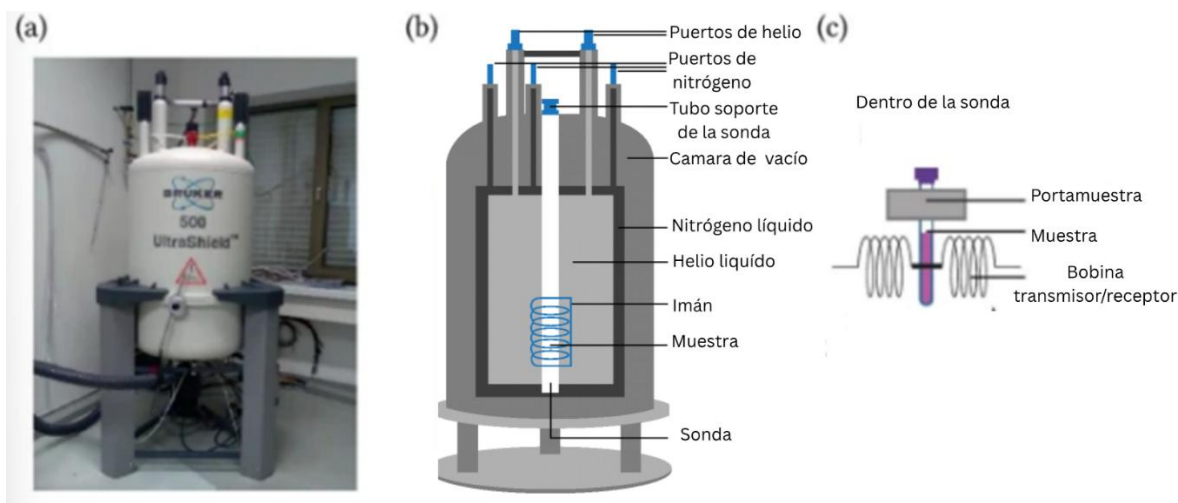


Figura 6. Espectrómetro de RMN. A) foto del espectrómetro comercial Bruker de 500 MHz; B) esquema de las partes del espectrómetro; C) vista detallada de la muestra en la sonda. (adaptada de Březina, V., 2024).

2.5.2 MALDI-TOF

La espectrometría de masas es una técnica analítica que consiste en ionizar en moléculas cargadas los compuestos químicos y medir la relación entre su masa (m) y su carga (z). Entre las técnicas de espectrometría de masas (MS) contamos con la desorción láser asistida por matriz de ionización-tiempo de vuelo (MALDI-TOF) basada en ionización suave, donde los péptidos se convierten en iones por adición o pérdida de uno o más protones, lo cual presenta el beneficio de producir una pérdida significativa de la integridad de la muestra y gracias a que los iones son cargados individualmente la interpretación de los datos es sumamente fácil (Singhal et al., 2015).

Para la realización del análisis se prepara la muestra agregándole una solución saturada de un compuesto orgánico de baja masa conocida como matriz, la cual sirve como absorbente de energía y permite que la muestra se co-cristalice cuando la matriz se seca y se cristaliza. Una vez cristalizadas se realiza la desorción (liberación de la muestra) e ionización al irradiar por un corto periodo de tiempo (para evitar daños en la muestra) con un láser, usualmente de N_2 con una longitud de onda de 337 nm. La interacción entre los fotones del láser y las moléculas de la matriz causada por la absorción del haz permite la sublimación de la matriz en una fase gaseosa, seguido directamente por la ionización de la muestra, posteriormente los iones protonados se aceleran a un potencial fijo por un tubo de tiempo de vuelo (TOF), y se separan en base a su relación masa-carga (m/z) hasta llegar a un

detector y genera el espectro, los cuales pueden ser comparados con las bases de datos (Clark et al. 2013; Singhal et al., 2015).

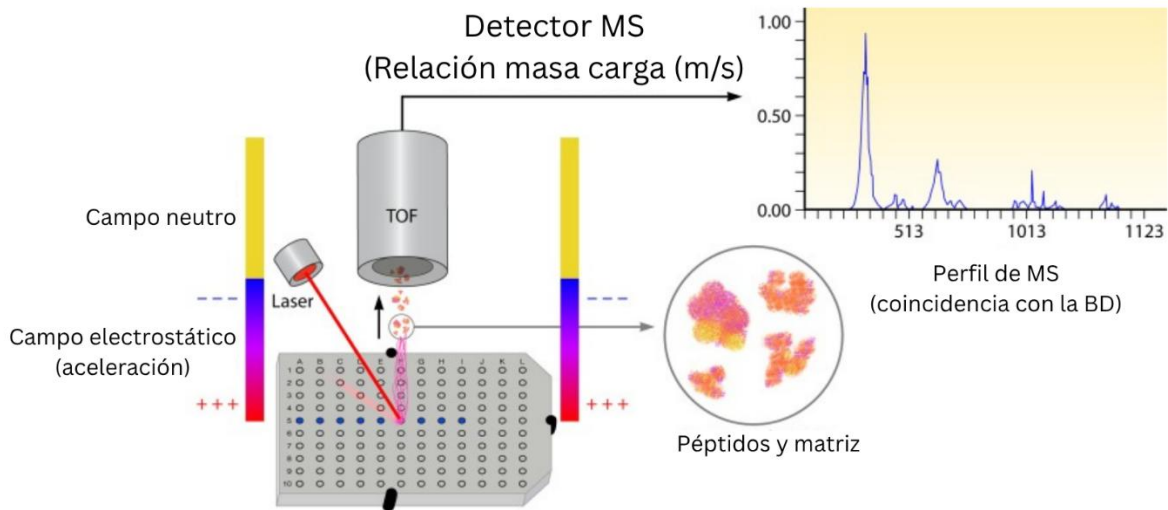


Figura 7. Esquema del análisis MALDI-TOF (adaptada de Clark et al. 2013)

3. Antecedentes

Se ha reportado que diferentes cepas de *Bacillus* son capaces de producir lipopéptidos cíclicos (CLPs), principalmente surfactinas, iturinas y fengicinas (Grifé-Ruiz et al., 2025), estos metabolitos secundarios han mostrado actividades antifúngicas, antioxidantes (Ren et al., 2022) y antibacterianas con posibles aplicaciones médicas (Shleeva et al., 2023). Sin embargo, cada cepa produce análogos de las principales familias de CLPs, además de producir otros lipopéptidos cíclicos menos estudiados, ya que pueden variar dependiendo del tiempo de crecimiento, temperatura y medios de cultivo (Moreno-velandia et al., 2021), sin embargo, ya se ha reportado que *B. velezensis* BS006 producen iturinas y fengicinas efectivas como biocontrol contra *Fusarium oxysporum*.

4. Justificación:

Bacterias del género *Bacillus* poseen un arsenal biológico entre ellos los Lipopéptidos cíclicos (CLPs) que pueden ser utilizados en diferentes industrias como la agrícola, farmacéutica, alimentaria y médica. Sin embargo, sus altos costos de producción evitan su uso comercial, *Bacillus velezensis* VM1054 una cepa que en ensayos *in vitro* demostró la capacidad de inhibir diferentes patógenos de interés médico y fitopatógenos se desconoce hasta el momento cuales son los CLPs que podría estar expresando para inhibir su desarrollo.

5. Objetivo e hipótesis

5.1 Objetivo general

Identificar CLPs producidas por la cepa *Bacillus Velezensis VM1054* y determinar la inhibición de bacterias de interés medico como lo son *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

5.1.1 Objetivos particulares

- Extracción y purificación de CLPs de interés antimicrobiano.
- Caracterización por RMN y MALDI-TOF de CLPs producidas
- Ensayos de inhibición en microorganismos de interés medico (*Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*)

5.2 Hipótesis

Bacillus velezensis VM 1054 produce CLPs con la capacidad de inhibir bacterias de interés medico como lo son *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

6. Material y métodos

6.1 Material biológico

Como cepa productora de CLPs se utilizó *Bacillus velezensis VM1054* obtenida de la colección del laboratorio de evolución microbiana del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, proveniente del interior de nódulos de *Prosopis laevigata*, perteneciente a la región de Chietla, Puebla, México.

Para la evaluación del efecto inhibitorio, se utilizaron cepas de *Staphylococcus aureus* adquiridas de Sigma-Aldrich y *Escherichia coli* adquirida de Thermo Fisher Scientific.

6.2 Amplificación de genes productores de CLPs de interés (Surfactina, Macrolactina A, Lactococina, tiazolipeptido)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que consiste en amplificar regiones específicas se llevó a cabo utilizando cebadores que amplifican fragmentos de DNA responsables de la producción de los CLPs macrolactina A y surfactina. Srf F: GCTGATGATGAGGAGAGCTATG (5' a 3'), R: GATGGTCGATACGTCCGATAAA (5' a 3') y MlnA F: GGCAGGGTCATACCTCATAATC (5' a 3'), R: AGCAGACTTTCGGTCTCATTC (5' a 3'), se usó la mezcla maestra para PCR DreamTaq Green 2X (Thermo Fisher Scientific™), así como un termociclador C1000 Touch™ (Bio-Rad, EE. UU.) y se realizó de la siguiente manera: 1) se llevó a cabo un sembrado por estría cruzada en medio agar LB de la cepa de *B. velezensis VM1054* y se mantuvo en incubación durante 24 horas, se tomó una colonia aislada con diámetro aproximado de 1mm y se agregó a un tubo de PCR de 0.2 ml que contenía 25 µl de la mezcla maestra, 1µM de cebadores y 27 µl de agua libre de

nucleasas; 2) el tubo de PCR se colocó en el termociclador para iniciar la amplificación, la cual se realizó con una desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 minutos y 34 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 59 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 1 minuto, seguida de una extensión final de 5 minutos a 72 °C. La temperatura de hibridación para PCR fue determinada mediante una calculadora en línea proporcionada por New England Biolabs (www.neb.com/tmcalculator). Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 2 % y se tiñeron con bromuro de etidio para fotografía.

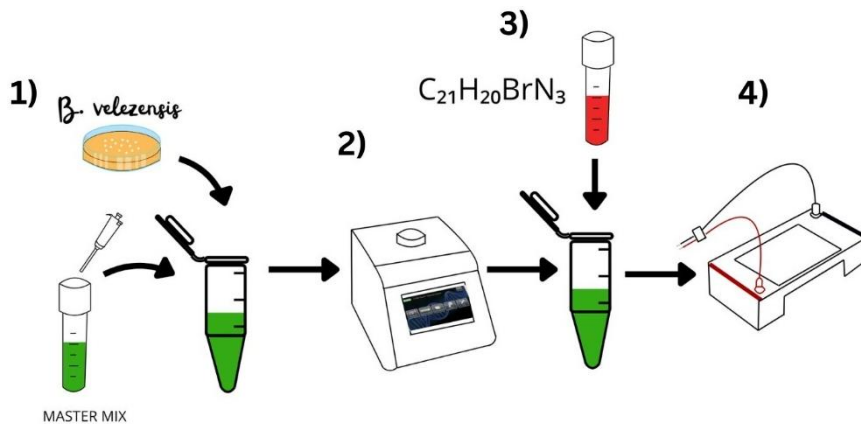


Figura 8. Amplificación de genes. 1) preparación de muestra para PCR, agregando la master mix y la colonia de *B.velezensis* VM1054; 2) PCR en termociclador Bio-Rad; 3) después de la PCR se agregó bromuro de etidio para poder identificar los genes amplificados; 4) corrimiento de electroforesis en gel de agarosa al 2 %.

6.3 Extracción de metabolitos producidos por *B.velezensis* VM1054

Un stock de *B.velezensis* fue inoculado en 800 ml de medio YM (Extracto de Levadura - Extracto de Malta) que contenía 10 g/l de manitol, 1g/l de extracto de levadura, 0.66g/l de K_2HP0_4 , 0.5g/l de glutamato de sodio y 0.05g/l de NaCl y se incubó por 24 h a 30 °C con agitación orbital a 90 rpm. Posteriormente se inactivaron las células irradiando con luz UV durante 15 min, pasado el tiempo de inactivación se filtró el medio utilizando filtros Sterifix® con porosidad de 0.2 μ m conectados a jeringas de 50 ml. Se recolectó el filtrado para utilizarlo posteriormente en la extracción de metabolitos.

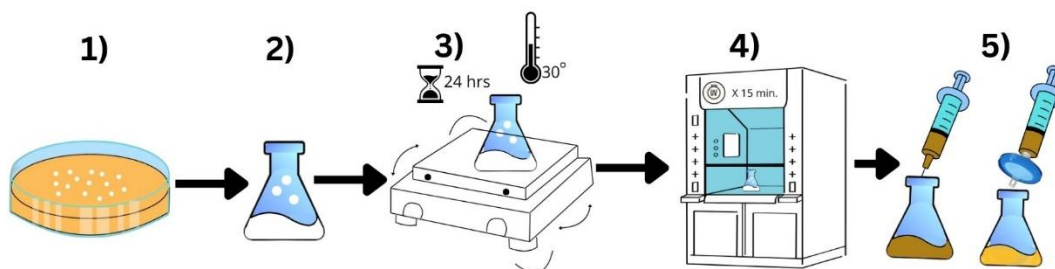


Figura 9. Filtración de medio de cultivo. 1) sembrado de *B.velezensis* VM1054 en medio LB; 2) inoculación de medio liquido; 3) incubación por 24 h a 30 °C con agitación orbital a 90 rpm; 4) Irradiación de luz UV durante 15 minutos para inactivar las células; 5) filtración del medio para retirar las células del medio, con ayuda de filtros para jeringas con porosidad de 0.2 µm.

El medio resultante se agregó en periodos de 100 ml compuestos por 50 ml de solvente y 50 ml de filtrado mezclados en embudo de separación el cual se agitó vigorosamente para conseguir una buena mezcla, después de la separación se recolectó el solvente y el medio por separado y se repitió el procedimiento hasta agotar todo el medio disponible, al terminar el procedimiento con un solvente se repitió con el solvente siguiente, empezando con el de menor polaridad hasta el de mayor polaridad siendo hexano, diclorometano (CH_2Cl_2), acetato de etilo (AcOEt) y acetonitrilo (CH_3CN) respectivamente.

Una vez terminado el proceso de separación se utilizó un rotavapor para retirar la mayor parte de los solventes recolectados y el resto se dejó reposar a temperatura ambiente, una vez evaporados los solventes se resuspendieron los metabolitos en CH_2Cl_2 y se juntaron en un solo matraz aforado. Los matraces originales fueron lavados con CH_2Cl_2 con lo necesario para asegurar que no quedaran residuos de metabolitos.

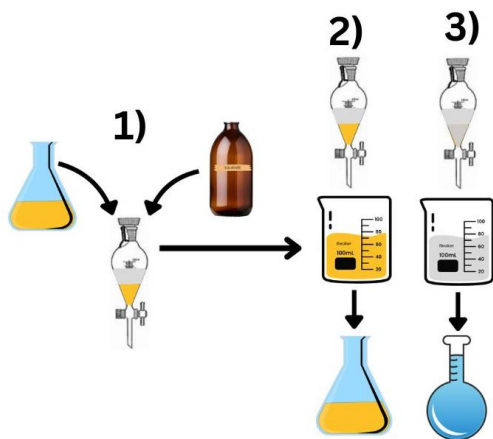


Figura 10. Extracción de metabolitos por solventes. 1) se agregaron 50 ml de solvente y 50ml de medio en un matraz de separación y se agitó; 2) el medio fue aislado y recuperado en un nuevo recipiente; 3) el solvente (ya mezclado con los metabolitos afines) fue separado y recuperado en otro nuevo recipiente.

6.4 Cromatografía

La muestra resultante de la extracción se concentró a 50 ml con CH_2Cl_2 . Para la purificación de los metabolitos extraídos se realizó una cromatografía preparativa donde se cargó la muestra con ayuda de un tubo capilar en la parte inferior de la columna de cromatografía con medidas de 5 cm de ancho y 20 cm de largo, una vez cargada la muestra se colocó en una cámara cromatográfica con 50 ml de eluyente compuesto por hexano/acetato de etilo con una proporción 80:20

volumen/volumen. Se permitió que el eluyente subiera por la placa inclinada durante 12 h y se procedió a revelar con luz ultravioleta de onda corta (254 nm).

Las fracciones resultantes se aislaron realizando un raspado a la capa cromatográfica y colocándolo en matraces de fondo redondo con un embudo previamente preparado con algodón para retener la sílice una vez retirada la sílice se realizó una segunda filtración hacia otro matraz de bola igualmente preparado con un embudo con algodón para evitar la presencia con cualquier otro contaminante, también se realizaron lavados con CH_2Cl_2 con lo que bastó para asegurar la correcta limpieza de la muestra, al igual que un lavado con metanol para garantizar que no queden residuos del metabolito en el primer matraz.

Posteriormente se preparó una columna de cromatografía (3.5 cm de ancho y 5 cm de largo) y se eluyó con soluciones de gradiente de hexano/acetato de etilo (de 60/40, 80/20, 90/10, v/v) para evaluar la pureza de los compuestos. Aquellos que muestran mezcla de compuestos se vuelven a separar por medio de cromatografía hasta obtener los compuestos puros. Una vez obtenidos los metabolitos puros fueron aislados y resuspendidos en CH_2Cl_2 para conservarlos y evitar que se mantuvieran adheridos al recipiente.

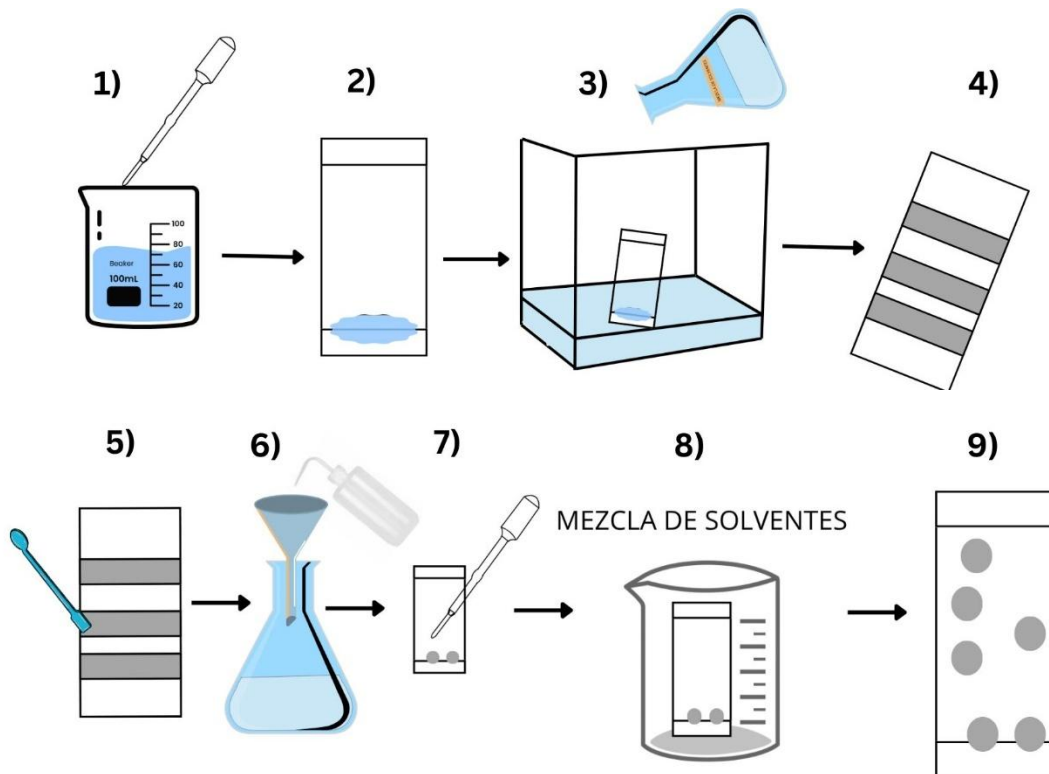


Figura 11. Purificación de metabolitos mediante cromatografía de capa fina. 1) se tomó la muestra obtenida por la extracción de solventes; 2) se aplicó la muestra en una placa cromatográfica con medidas de 5 cm x 20 cm; 3) se colocó la placa en un tanque para TLC y se agregó la mezcla de solventes que actuaron como fase móvil; 4) Se reveló la placa con luz UV para identificar la separación de los compuestos en la muestra original; 5) se

realizaron raspados para separar el compuesto de la placa; 6) la sílice con el compuesto adherido, se vertió en un matraz con un embudo preparado con algodón para retener la sílice y se agregó diclorometano para impulsar el paso de los compuestos y metanol para asegurar que no permanecieran residuos en las paredes del embudo o del matraz; 7) se tomó una muestra de los compuestos aislados y se colocó en una placa cromatográfica con medidas de 3.5 cm x 5 cm; 8) se colocó la placa cromatográfica en un vaso de precipitado con una mezcla de solventes como fase móvil; 9) después de la TLC se reveló la placa con luz UV, y aquellos compuestos que no mostraban impurezas se aislaron para futuros estudios y aquellos con impurezas fueron sometidos nuevamente al procedimiento hasta obtener únicamente compuestos puros.

6.5 Pruebas de inhibición

Se realizó un cultivo de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en medio líquido enriquecido Luria-Bertani (LB) con una incubación de 24 h a una temperatura de 37 °C con agitación orbital a 90 rpm, una vez completado el tiempo de incubación se prepararon placas de agar LB en donde fueron sembradas por una técnica modificada de placa extendida, para lo que se utilizó una jeringa de 3 ml, para tomar el medio incubado y agregarlo a la placa de agar LB hasta cubrir la superficie en su totalidad y se procedió a retirar el medio restante y se dejó reposar por aproximadamente 3 minutos hasta constatar que el medio líquido se hubiera secado en su totalidad. Una vez sembradas las cepas patógenas se agregaron los metabolitos secundarios obtenidos, para eso se agregaron 100 microlitros de cada uno de los metabolitos, colocando en forma de gota un metabolito al centro de la placa para cada cepa, y dejando reposar hasta que el solvente se evaporara. Para el caso de los controles negativos se utilizaron 100 microlitros de solvente sin metabolito e igualmente aplicado al centro de la placa en forma de gota.

Una vez terminada la preparación de las placas, se procedió a incubarlas durante 24 h a una temperatura de 32 °C. posterior a la incubación se midieron los diámetros de los halos de inhibición con la ayuda de un vernier de la marca Truper.

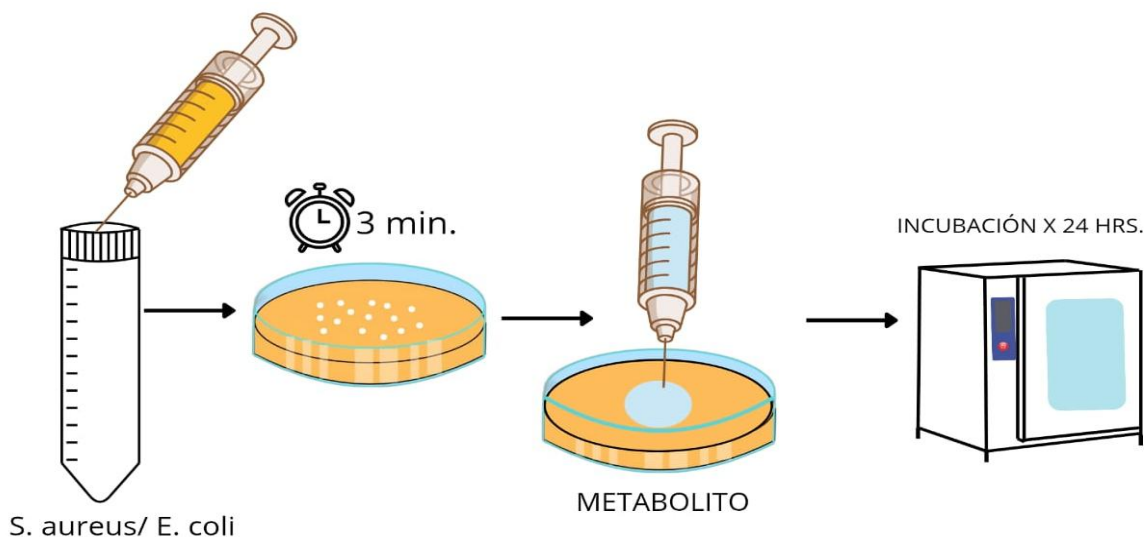


Figura 12. Pruebas de inhibición. 1) se tomó medio líquido inoculado de la cepa patógena, con ayuda de una jeringa; 2) se vertió el medio en una placa de agar LB y se dejó secar por 3 minutos; 3) Se agregó una gota del metabolito en el centro y se dejó secar; 4) se incubaron las placas preparadas durante 24 h a 30 °C,

6.6 Resonancia Magnética Nuclear

Los metabolitos secundarios obtenidos fueron sometidos a secado y resuspendidos en cloroformo deuterado (CDCl_3), posteriormente se prepararon tubos de Resonancia Magnética Nuclear para asegurar su limpieza fueron lavados con agua destilada, metanol y acetona en ese orden, y se secaron en una estufa a una temperatura de 50 °C. Una vez lavados los tubos de resonancia se le agregaron las soluciones de los compuestos a analizar hasta alcanzar una altura de 5 cm del tubo, y se colocó el tapón del tubo para evitar una contaminación. Los tubos preparados fueron enviados a un análisis de Resonancia Magnética Nuclear al laboratorio de análisis estructural (RMN) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, donde se solicitaron ensayos unidimensionales protón ^1H Hidrogeno, ^{13}C Carbono, prueba de protón adjunto (APT) y mejora sin distorsión mediante transferencia de polarización (DEPT) así como ensayos bidimensionales combinando espectroscopía de correlación y coherencia cuántica única heteronuclear seleccionada por gradiente (COSYgHSQC). Todo esto en un equipo Bruker de 500 MHz.

6.7 Análisis por MALDI-TOF

Se prepararon dos medios líquido YM (Extracto de Levadura - Extracto de Malta) de 250 ml y se inocularon con una colonia de *Bacillus velezensis* VM1054 incubando por 24 h a 30 °C con agitación orbital a 90 rpm. Posteriormente se tomó 1 ml y se usaron filtros de 0.2 μm para separar las células de los metabolitos producidos, las muestras fueron almacenadas en recipientes ámbar, llevando todo el procedimiento con poca luz. Las muestras fueron enviadas al laboratorio de servicios analíticos del instituto de química de la UNAM para analizar mediante MALDI-TOF MS (matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) con un espectrómetro de masas marca Bruker Microflex MALDI-TOF.

7. Resultados

7.1 Amplificación de genes

Los genes codificantes de las bacteriocinas de interés producidas por la cepa de *Bacillus velezensis* VM1054 se investigaron mediante la técnica de PCR de colonia usando los primers para las bacteriocinas de interés (véase tabla 1). Los resultados en la PCR plantean la presencia de los genes *srfA* para la síntesis de surfactina y *mlnA* para la síntesis de macrolactinas en la cepa VM1054 (imagen 1).

Los productos amplificados fueron del tamaño esperado mencionados en la tabla 1. Para macrolactina A de un tamaño de 920 pares de bases (pb) y para surfactina de

890 pb, mientras que no se mostró la presencia de los genes encargados de la síntesis de lactococina y la bacteriocina tipo tiazolipéptido.

Tabla 1

Secuencia de cebadores utilizados para la amplificación de genes responsable de la síntesis de metabolitos secundarios.

Bacteriocina	Primers		
	Forward (5' – 3')	Reverse (5' – 3')	Tamaño de producto (pb)
Surfactina	GCTGATGATGAGGAGAGCTATG	GATGGTCGATACGTCCGATAAA	890
Macrolactina A	GGCAGGGTCATACCTCATAATC	AGCAGACTTTCGGTCTCATT	920
Lactococina	TTTTGCCAGTCAGTCGAACG	AGAAATCCGGTGCTGTCTTGTA	375
bacteriocina tipo tiazolipéptido	AATAGCGGACTGTAGCCCAA	GGCATACCCGCGACTCTTTT	341

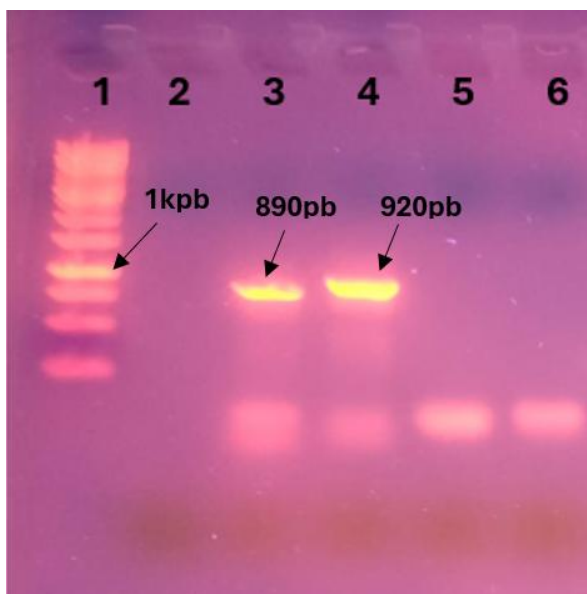


Imagen 1. Productos amplificados por PCR. 1) marcador de peso molecular; 2) control negativo; 3) gen de surfactina; 4) gen de macrolactina A; 5) gen de subtilosina A; 6) gen de bacteriocina tipo tiazolipéptido

7.2 Pruebas de inhibición

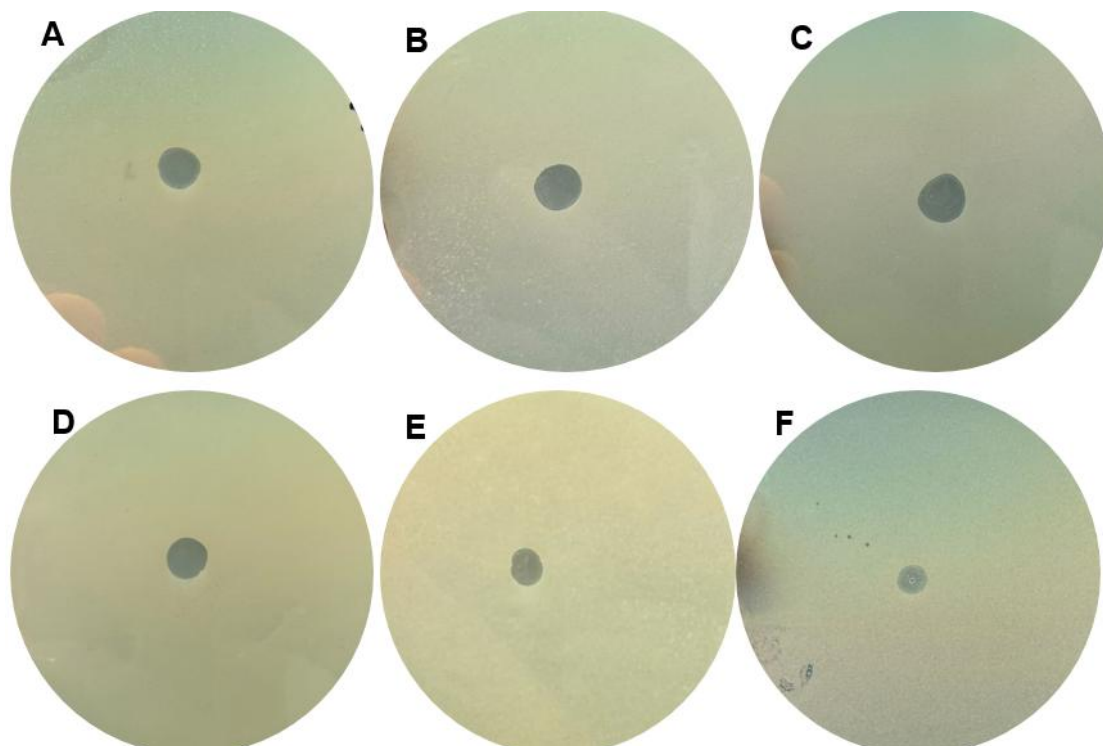
Se realizaron pruebas de inhibición donde se probaron todos los analitos obtenidos con las cepas *S.aureus* y la cepa *E.coli*. a continuación, en la tabla 2 se muestran los resultados de las pruebas más significativas en base a su halo de inhibición en comparación con los controles negativos, manteniendo resultados congruentes en el triplicado de *S.aureus* (véase imágenes 3,5,7) y *E.coli* (Véase imágenes 4,6,8),

siendo los compuestos denominados 5B y 1.1E los únicos que mostraron inhibición para ambas cepas.

Tabla 2

Diámetro de los halos de inhibición de los compuestos que presentaron resultados más significativos y los respectivos controles negativos (CH₂Cl₂).

<i>Staphylococcus aureus</i>				<i>Escherichia coli</i>			
Compuesto	Halo de inhibición (cm)			Compuesto	Halo de inhibición (cm)		
	1ra prueba	2da prueba	3ra prueba		1ra prueba	2da prueba	3ra prueba
5A	0.5	0.5	0.3	5B	0.5	0.45	0.5
5B	0.5	0.3	0.4	1.1E	0.4	0.3	0.3
3A	0.5	0.45	0.4	Control -	0.2	0.15	0
1.3C	0.41	0.3	0.4				
1.1E	0.2	0.4	0.41				
1.1A	0.3	0.4	0.3				
Control -	0.3	0.15	0.3				



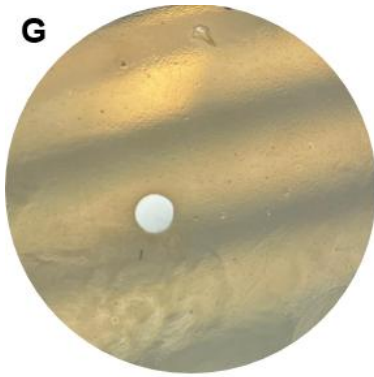


Imagen 2. Resultados de la primera prueba de inhibición para la cepa de *S.aureus*; A) 5A; B) 5B; C) 3A; D) 1.3C; E) 1.1E; F) 1.1A; G) control negativo.

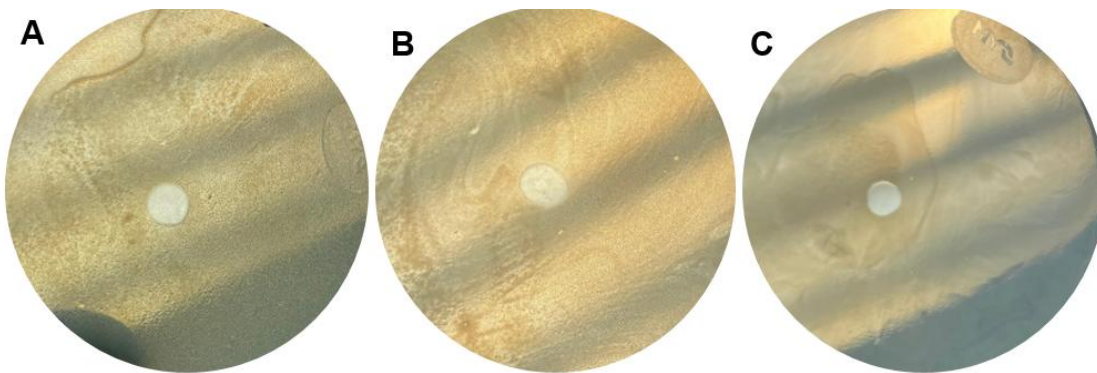
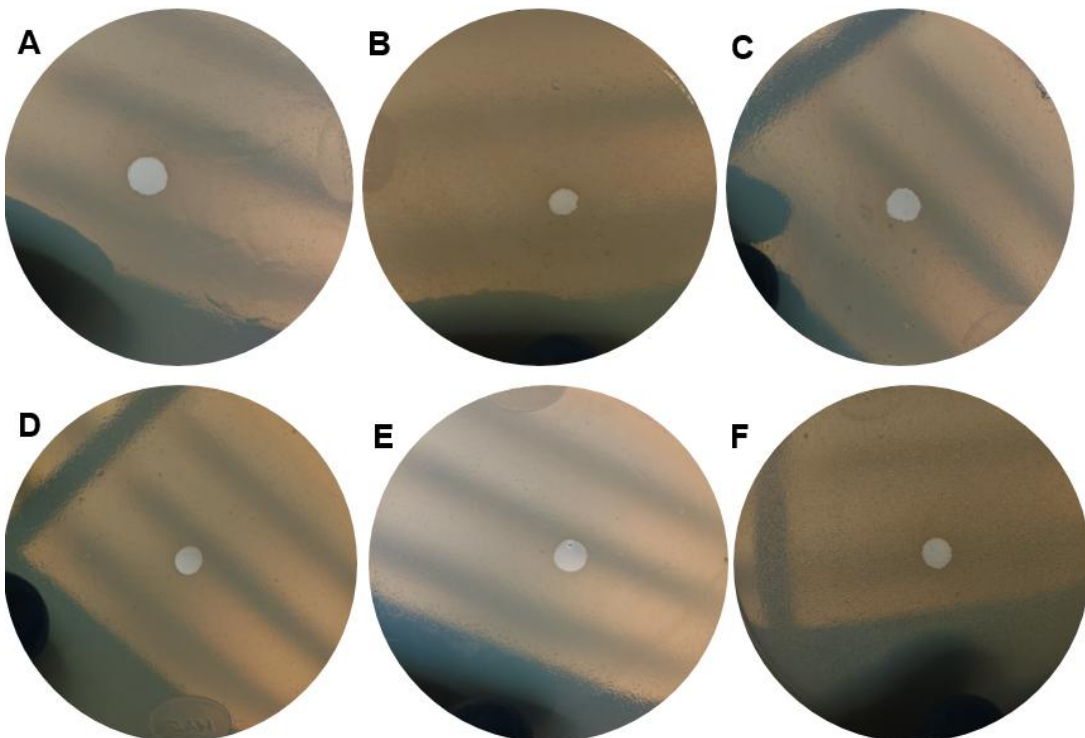


Imagen 3. Resultados de la primera prueba de inhibición para la cepa de *E.coli*; A) 5B; B) 1.1E; C) control negativo.



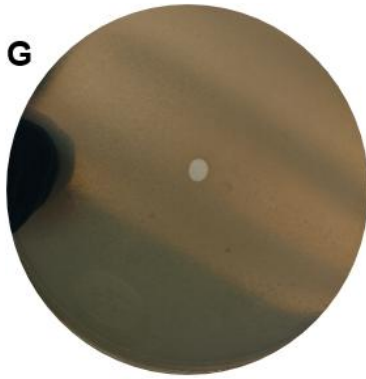


Imagen 4. Resultados de la segunda prueba de inhibición para la cepa de *S.aureus*; A) 5A; B) 5B; C) 3A; D) 1.3C; E) 1.1E; F) 1.1A; G) control negativo.

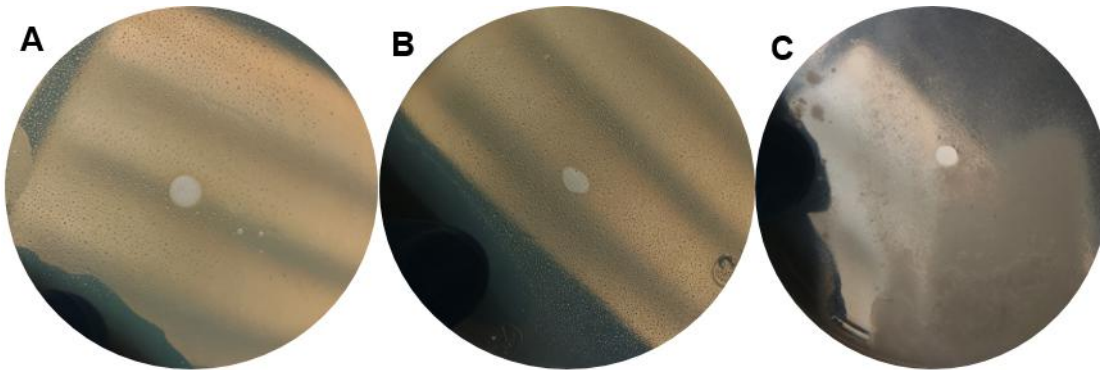
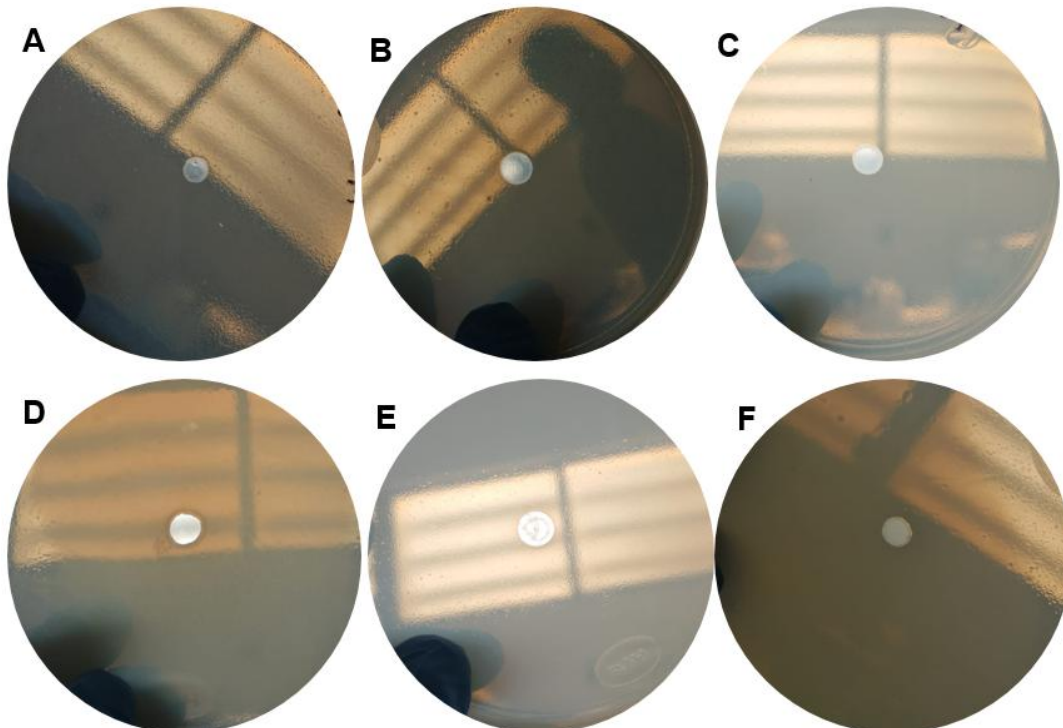


Imagen 5. Resultados de la segunda prueba de inhibición para la cepa de *E.coli*; A) 5B; B) 1.1E; C) control negativo.



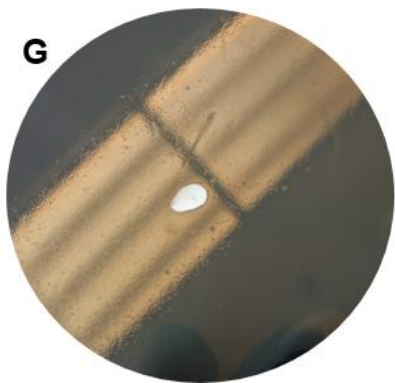


Imagen 6. Resultados de la tercera prueba de inhibición para la cepa de *S.aureus*; A) 5A; B) 5B; C) 3A; D) 1.3C; E) 1.1E; F) 1.1A; G) control negativo.

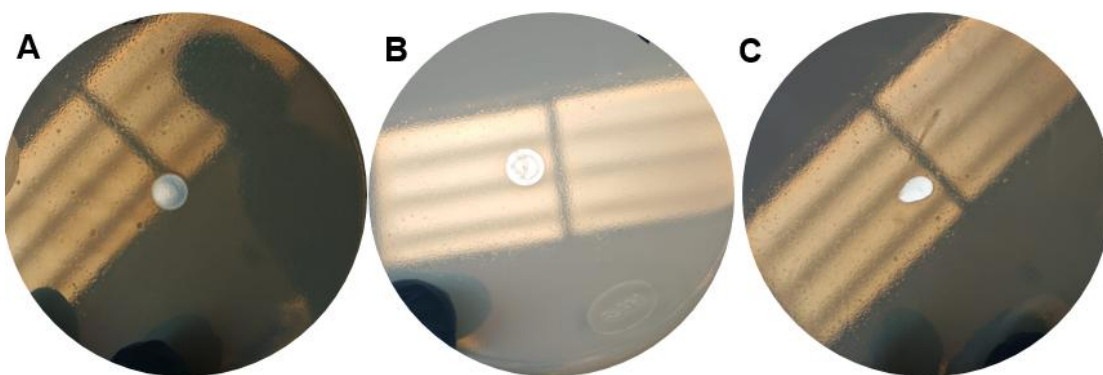


Imagen 7. Resultados de la tercera prueba de inhibición para la cepa de *E.coli*; A) 5B; B) 1.1E; C) control negativo.

7.3 Cromatografía

Los metabolitos se separaron utilizando soluciones con diferentes proporciones de solventes n-hexano – acetato de etilo (véase imagen 2). La imagen observada en luz ultravioleta de onda corta (254nm) nos muestra los diferentes compuestos que mostraron inhibición, los cuales como se pueden observar mantienen polaridades muy diferentes, a excepción de los compuestos 5A y 5B que mantienen una polaridad similar. Para los compuestos 5A y 1.3C se puede apreciar una mayor intensidad, lo que sugiere una mayor concentración que el resto de los compuestos. Aquellos compuestos que muestran una muy ligera intensidad se les puede atribuir que tienen una baja concentración.

Tabla 3

Rf de los compuestos que mostraron inhibición.

Compuesto	5A	5B	3A	1.3C	1.1E
Rf	0.93	0.87	0.05	0.83	0.95

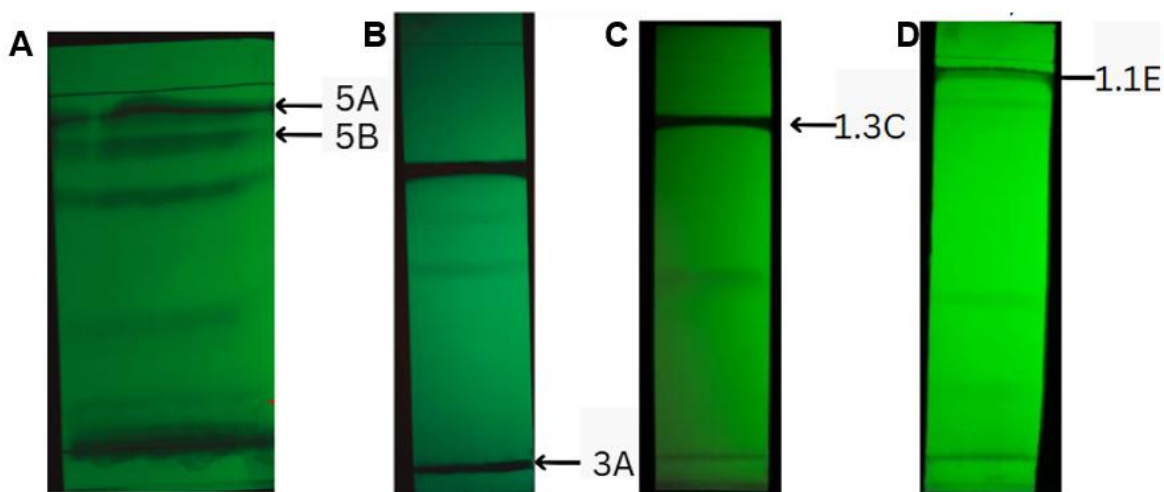


Imagen 8. Resultados de las cromatografías preparativas de los compuestos que mostraron mejor inhibición; A) sistema hexano: AcOEt 90:10 v/v en placa de 10cm x 5cm ; B) sistema hexano: AcOEt 100:00 v/v en placa de 20cm x 5cm; C) sistema hexano: AcOEt 80:20 v/v en placa de 20cm x 5cm; D) sistema hexano: AcOEt 50:50 v/v en placa de 20cm x 5cm.

7.4 Resonancia Magnética Nuclear

De los compuestos que fueron sometidos a Resonancia Magnética Nuclear solo el compuesto 1.3C mostró inhibición a la cepa de *S.aureus*. los resultados de la RMN del análisis de ^1H mostró la presencia de cadenas alifáticas (imagen 9A), la imagen 9B muestra picos que corresponden a hidrógenos alifáticos unidos a átomos electronegativos, en la imagen 9C se nos presentan picos que corresponden a protones vinílicos y en la imagen 9D podemos observar picos que corresponden a ^1H aromáticos, lo que sugiere la presencia de un anillo aromático en la estructura, además, se muestra una señal en la posición 7.26 correspondiente al cloroformo deuterado.

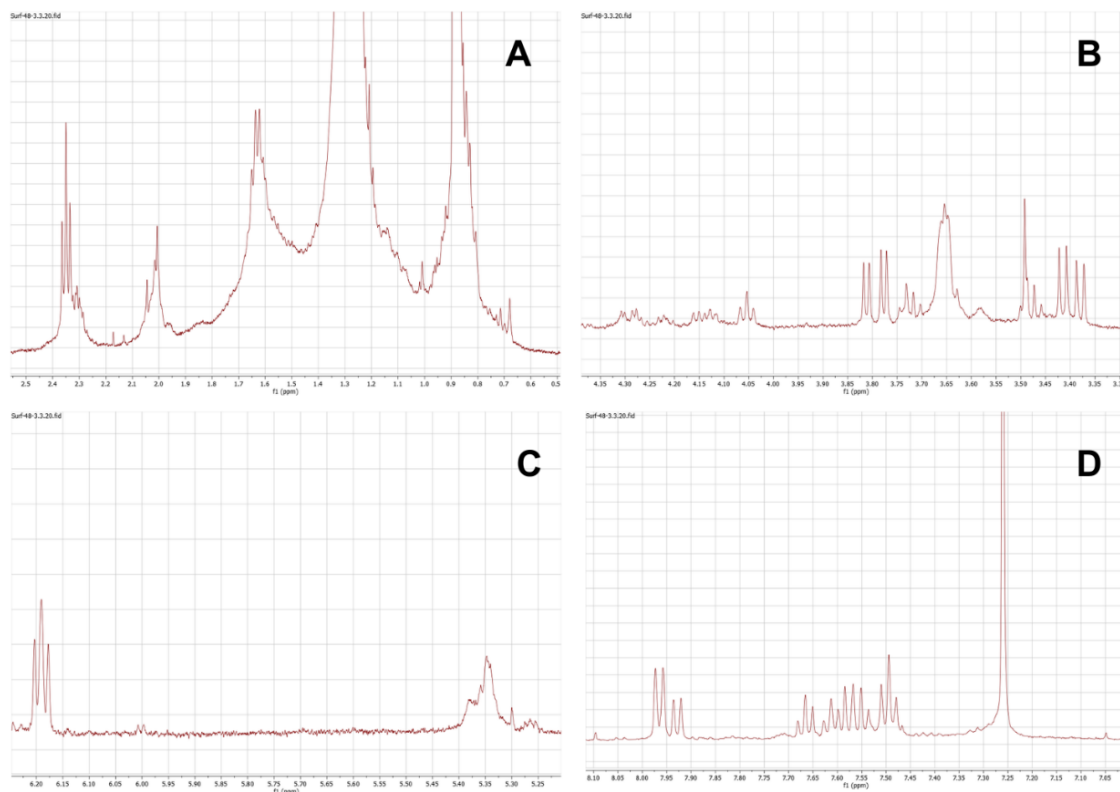


Imagen 9. Resultados de la Resonancia Magnética del ^1H del compuesto 1.3C; A) rango 0.50 – 2.50 ppm; B) rango 3.35 – 4.35 ppm; C) rango 5.25 – 6.20; D) rango 7.05 – 8.10

Por su parte el análisis de C^{13} mostró picos en el rango de 28.9-32.2 ppm (véase imagen 10A) donde los picos corresponden mayormente a carbonos alifáticos con un apantallamiento relativamente alto; en la imagen 10B se observan picos en el rango de 74.4 a 79.2 ppm que pueden corresponder a carbonos con enlaces triples internos o a carbonos unidos a átomos de oxígeno, el cual causa un gran apantallamiento a los carbonos, sin embargo, los picos observados en el rango de 76 a 78 corresponden al cloroformo deuterado que se utilizó para resuspender la muestra; en la región de 125.4 – 129 ppm aparecen principalmente carbonos no carbonílicos, típicos de sistemas aromáticos y alquenos (véase imagen 10C); los últimos picos que se pudieron apreciar corresponden al rango 132.8-135.2 ppm (véase imagen 10D) los cuales pueden indicar carbonos pertenecientes a carbonos cuaternarios y/o terciarios en anillos aromáticos.

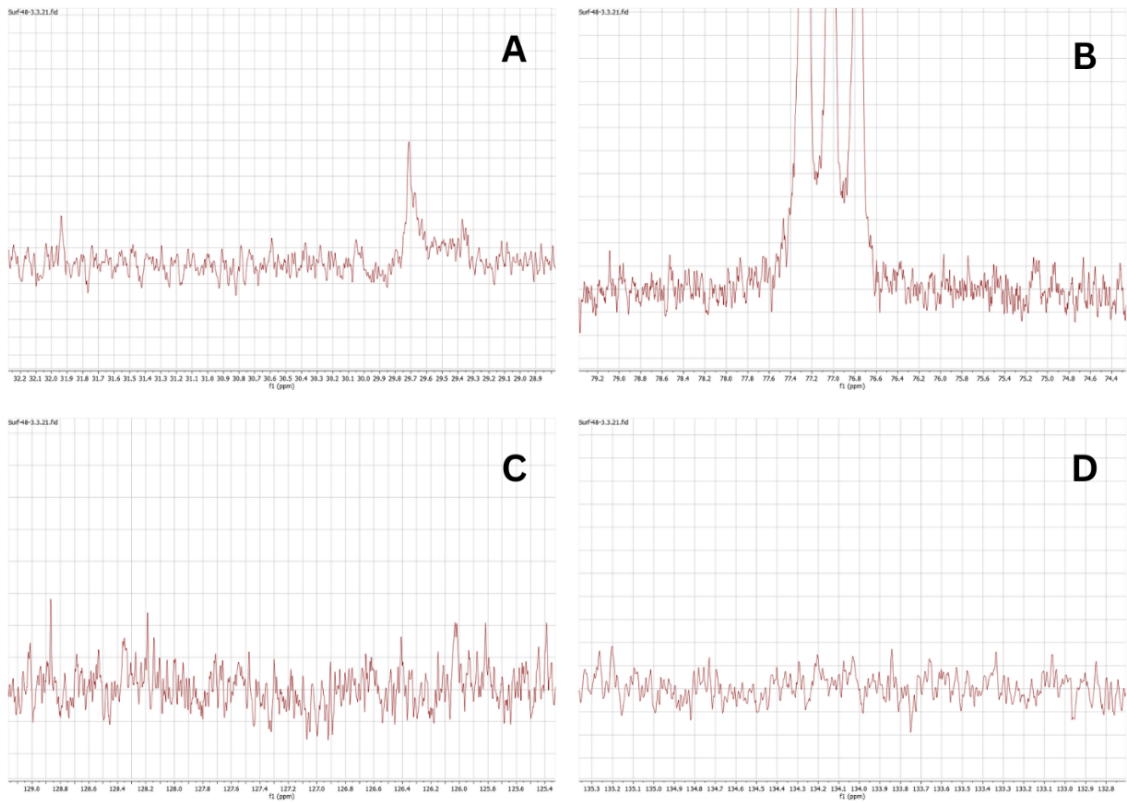


Imagen 10. Resultados de la Resonancia Magnética del ^{13}C del compuesto 1.3C; A) rango 28.90 – 32.20 ppm; B) rango 74.40 – 79.20 ppm; C) rango 125.40 – 129.00; D) rango 132.80 – 135.50

7.5 Análisis MALDI-TOF

El extracto de metabolitos secundarios fue analizado en cuanto a sus masas moleculares por la técnica de MALDI-TOF el cual reveló la presencia de tres familias de lipopéptidos cíclicos (véase imagen 11), entre los que contamos con surfactinas (rango 1022-1075 m/z), iturinas (rango 1043-1096 m/z) y fengicinas (rango 1463-1544 m/z), de esta última familia se encontraron múltiples variantes (véase imagen 12) las cuales muestran diferentes relaciones masa-carga que se pueden atribuir al cambio en su número de carbonos y/o sustituciones de los aminoácidos conformantes.

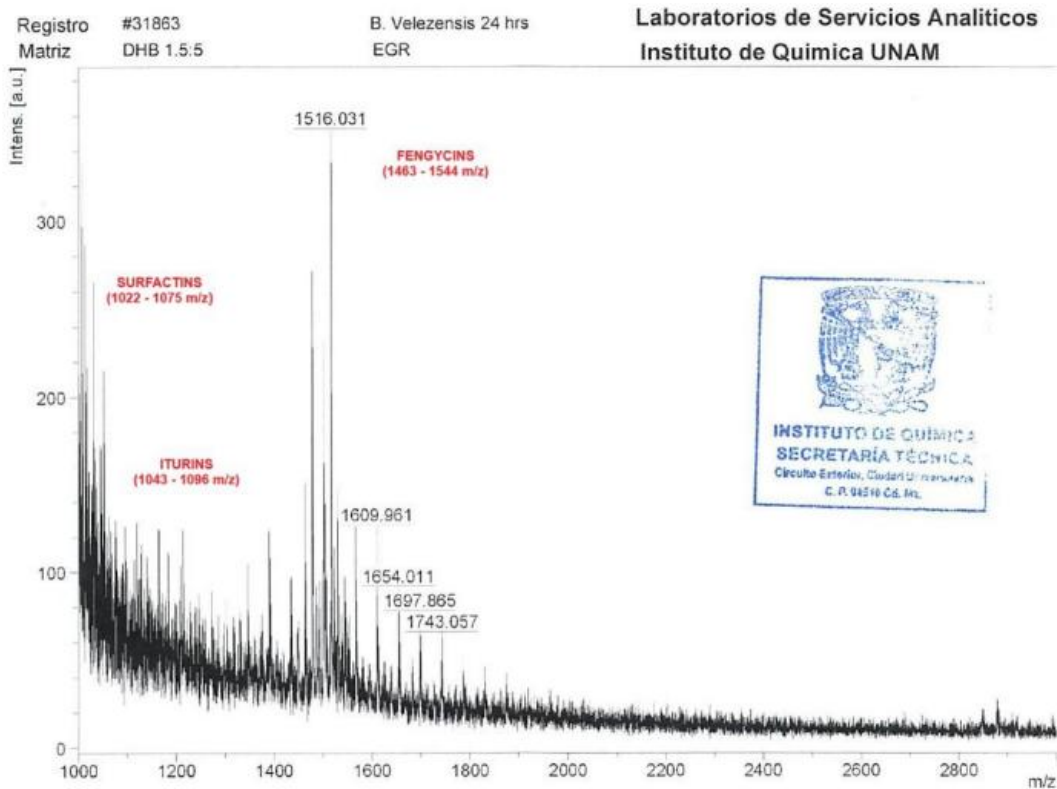


Imagen 11. Espectro de masas MALDI-TOF de rango 1000 – 3000 m/z

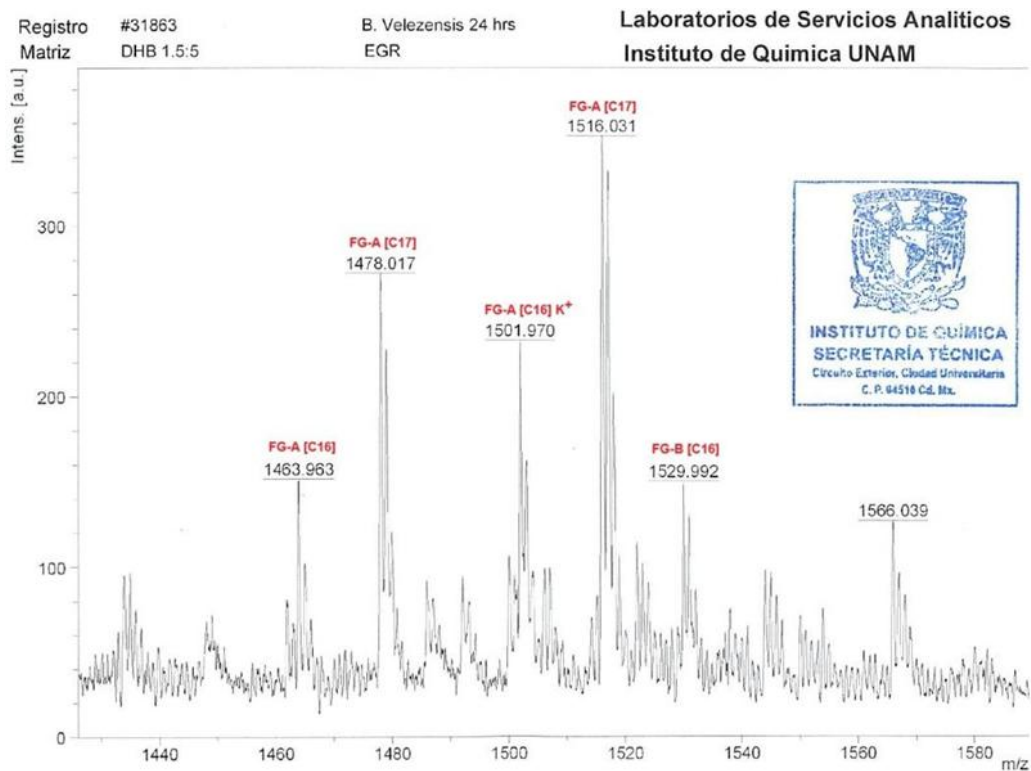


Imagen 12. Acercamiento del espectro MALDI-TOF entre el rango 1440-1560.

8. Discusión

Diferentes cepas de *Bacillus velezensis* producen metabolitos secundarios con la capacidad de inhibir el crecimiento de diferentes hongos patógenos, también se ha encontrado que son capaces de producir péptidos no ribosomales previamente identificados de otras cepas de *Bacillus* como antibacterianos (Liu et al., 2020; Kim et al., 2022; Sreelakshmi et al., 2024), sin embargo, no hay muchos estudios realizados que busquen identificar los diferentes metabolitos producidos por *B.velezensis* y los efectos que puedan tener contra otros tipos de bacterias, por lo que en este trabajo se buscó elucidar de mejor manera estos metabolitos.

Debido a la falta de información sobre metabolitos producidos por *B.velezensis* se empezó con la búsqueda de genes, donde gracias a la PCR de colonia realizada, logramos rectificar que contaba con los genes productores de surfactina y macrolactina A, lo cual fue consistente con lo encontrado por Zhang y colaboradores (2025), sin embargo, no se encontraron los genes productores de la bacteriocina lactococina 972 y la bacteriocina tipo tiazolipéptido los cuales son metabolitos secundarios que fueron producidas por otras cepas de *B.velezensis* (Zhao et al., 2022), lo que nos dio indicios de que la cepa era productora por lo menos de las familias de CLps de surfactinas y macrolactinas.

Durante la extracción por solventes y purificación mediante cromatografía de capa fina se observó que la mayoría de los compuestos se podían separar con mezclas de solventes poco polares, lo que sugiere que dichos compuestos eran apolares o tenían baja polaridad, ya que de acuerdo con Villagómez y colaboradores (2023) cuando es empleado un solvente no polar, éste interactúa principalmente con compuestos carentes de grupos polares o con muy pocos, esto nos indica que cuando se busca purificar los metabolitos producidos por *B.velezensis* es preferente utilizar mezclas de solventes con polaridad media-baja.

Pruebas de inhibición realizadas en otras investigaciones a metabolitos producidos por especies de *Bacillus* se enfocaron principalmente en hongos (Xiong et al., 2022), sin embargo, durante este trabajo se realizaron las pruebas de inhibición únicamente a una cepa de bacteria Gram positiva (*S.aureus*) y una Gram negativa (*E.coli*). y obtuvimos resultados consistentes con lo encontrado por Boottanun y colaboradores (2017) que mostraron que los metabolitos producidos por *B.amyloliquefaciens* la cual es una cepa altamente relacionada con *B.velezensis* fueron capaces de inhibir el crecimiento de *S.Aureus* y *E.coli*. Como se observó, las pruebas de inhibición mostraron que mientras 5 compuestos fueron capaces de inhibir el crecimiento de *S.aureus* solamente 2 de ellos inhibieron el crecimiento de *E.coli* lo que puede deberse a que los CLps afectan mayormente a las bacterias Gram+ debido a que su mecanismo consiste en desestabilizar la membrana, en el caso de las bacterias Gram- al contar con membrana citoplasmática y la membrana externa la cual al ser estabilizada por puentes con Ca^{2+} y Mg^{2+} lo cual de acuerdo a Balleza y colaboradores (2019) disminuyen la actividad de los CLps, además de que

en las bacterias Gram+ hay una menor concentración de cargas negativas, e incluso si penetran la membrana externa, pueden llegar a ser capaces de reparar pequeñas rupturas (Bishop R. E. 2000).

El número de señales obtenidas de una espectroscopia de RMN de ^1H y ^{13}C depende del número de núcleos de hidrogeno enlazados a un átomo de carbono inmediatamente adyacente (en cualquier dirección), por ejemplo, si el espectro del análisis de ^1H muestra 3 picos, nos indica que el carbono adyacente consta de dos átomos de hidrógeno (Ritgen, U.,2025), de igual manera debido al efecto de apantallamiento, podemos hacernos una idea del entorno del carbono analizado, ya que el desplazamiento que se observa dependerá de la existencia de dobles, triples enlaces, o la unión a átomos de oxígeno o nitrógeno, es por eso que se sabe que aquellas señales que aparezcan en determinados rangos, corresponden a ciertas estructuras, por ejemplo aquellas señales del análisis ^1H en el rango de 0.5 ppm a 2.5 ppm nos indican la presencia de protones en cadenas alifáticas. Dichos datos se pueden encontrar en diferentes bases de datos como la Organic Chemistry Data. Los resultados obtenidos de la RMN nos ayudaron a conocer algunas características de la estructura del compuesto 1.3C que fue capaz de inhibir el crecimiento de *S.aureus*, dichos resultados nos indican la presencia de cadenas alifáticas, ^1H unidos a átomos electronegativos e incluso la presencia de estructuras de compuestos aromáticos, lo cual es consistente con la estructura de los lipopéptidos cíclicos. En la RMN también se mostraron los picos en el rango 76 a 78 ppm correspondientes al cloroformo deuterado (CDCl_3) que fue el disolvente en el cual se resuspendieron las muestras. Así como existen base de datos que nos ayudan a conocer los tipos de átomos presentes en la estructura, también existen bases de datos como la proporcionada por Merck Chemical que nos ayuda a identificar impurezas en la muestra, y de esta forma garantizar resultados más confiables.

Por último, un análisis bioinformático realizado por Zongwang & Chun Hu (2019) reveló que la cepa de *B.velezensis* SH-B74 posee genes para la producción de bacilopeptina, plipastatina y surfactina, por su parte Moreno-Velandia y colaboradores (2021) encontraron que *B.velezensis* Bs006 produjo fengicinas, iturinas y surfactinas, en este trabajo el análisis de los metabolitos producidos por *B.velezensis* VM1054 después de 24h de cultivo por MALDI-TOF se reveló la presencia de surfactinas, iturinas y fengicinas al igual que algunas variantes de la fengicina, sin embargo, se ha encontrado que cambios en la temperatura, medio de cultivo y periodo de incubación permite la producción de diferentes tipos de CLps y en diferentes concentraciones (Moreno-Velandia et al.,2021; Yin et al.,2024).

El uso de solventes para realizar la extracción de metabolitos resultó ser bastante efectiva, así como el uso de cromatografía de capa fina para la purificación de dichos metabolitos, sin embargo una de las limitantes fue que al no conocer previamente todos los metabolitos que era capaz de producir la cepa, no había alguna idea pre establecida de las características de estos, por lo que fue necesario

emplear una gran cantidad de tiempo en encontrar la polaridad adecuada para separar cada uno de ellos, por lo que los resultados obtenidos pueden ayudar a disminuir este tiempo en futuras investigaciones similares.

Las pruebas de inhibición nos mostraron que al menos 5 metabolitos producidos por *B.velezensis VM1054* fueron capaces de inhibir a *S.aureus* y por lo menos 2 capaces de inhibir el crecimiento de *E.coli* y gracias a la espectrometría MALDI-TOF sabemos que entre los compuestos producidos encontramos surfactinas, iturinas y fengicinas y en base al mecanismo de acción de estos CLps podríamos intuir que pueden afectar a más cepas bacterianas (principalmente Gram+), aunque no es evidencia suficiente para afirmar que dichos metabolitos pueden ser igual de efectivo contra otras cepas y en condiciones diferentes a las trabajadas en este trabajo, pero establece a esta cepa como una opción para la producción de antimicrobianos que no generen resistencia como los antimicrobianos actuales.

Los análisis de RMN nos brindó información de las estructuras de la mayoría de los compuestos, desafortunadamente, por cuestiones ajenas a nuestro control no fue posible analizar todos los compuestos obtenidos, y de aquellos compuestos que mostraron inhibición, solo dos se sometieron a este análisis, de los cuales solo uno mostró características de un CLp, mientras que el compuesto 1.1e mostro características únicamente de una cadena lineal, por lo que fue descartado en este trabajo donde nos enfocamos únicamente al análisis de CLps.

Este trabajo aportó información sobre los metabolitos producidos por *Bacillus velezensis VM1054* después de 24 h de crecimiento, como la polaridad de los metabolitos mayoritarios, su capacidad inhibitoria contra bacterias Gram+ y Gram- y características de su estructura como los tipos de átomos y su conectividad entre ellos, el número y tipo de protones equivalentes, así como la presencia de ciertos grupos funcionales, sin embargo aún hace falta llevar a cabo más técnicas para identificar los metabolitos y dilucidar por completo la estructura de estos compuestos, ya que a pesar de saber que existen surfactinas, iturinas y fengicinas, no fuimos capaces de identificar qué compuestos aislados pertenecían a cada una de las familias, ni posibles cambios estructurales que tuvieran respecto a las estructuras de referencia reportadas.

9. Conclusión

Como se esperaba en este estudio se demostró que *Bacillus velezensis VM1054* puede producir en solo 24 h al menos cinco metabolitos con actividad antimicrobiana identificable contra *Staphylococcus aureus*, de los cuales dos también mostraron actividad contra *Escherichia coli*. Las técnicas de separación y análisis (extracción con solventes, cromatografía de capa fina y Resonancia Magnética Nuclear) fueron clave para aislar y caracterizar parcialmente estos compuestos, y a pesar de haber encontrado compuestos con estructuras lineales, el análisis MALDI-TOF nos confirmó la presencia de lipopéptidos cíclicos. Los resultados aportan evidencia de

potencial biotecnológico de cepas microbianas nativas como fuentes de nuevos antimicrobianos. Por lo que se sugiere realizar estudios complementarios de purificación, determinación completa de las estructuras moleculares, así como su evaluación de citotoxicidad y concentración mínima inhibitoria para posibles aplicaciones farmacéuticas de estos metabolitos.

10. Bibliografía

- Adeniji, A. A., Loots, D. T., & Babalola, O. O. (2019). *Bacillus velezensis*: phylogeny, useful applications, and avenues for exploitation. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(9), 3669–3682. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09710-5>
- Ait Kaki, A., Smargiasso, N., Ongena, M., Kara Ali, M., Moula, N., De Pauw, E., & Kacem Chaouche, N. (2020). Characterization of New Fengycin Cyclic Lipopeptide Variants Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* (ET) Originating from a Salt Lake of Eastern Algeria. *Current microbiology*, 77(3), 443–451. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01855-w>
- Akbar, N., Siddiqui, R., Iqbal, M., Sagathevan, K., Kim, K. S., Habib, F., & Khan, N. A. (2021). Gut Bacteria of *Rattus rattus* (Rat) Produce Broad-Spectrum Antibacterial Lipopeptides. *ACS omega*, 6(18), 12261–12273. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c01137>
- Asenjo, A., Oteo, J., & Alós, J. (2021). What's new in mechanisms of antibiotic resistance in bacteria of clinical origin? *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 39(6), 291-299 <https://doi.org/10.1016/j.eimce.2020.02.017>
- Balleza, D., Alessandrini, A., & Beltrán García, M. J. (2019). Role of Lipid Composition, Physicochemical Interactions, and Membrane Mechanics in the Molecular Actions of Microbial Cyclic Lipopeptides. *The Journal of membrane biology*, 252(2-3), 131–157. <https://doi.org/10.1007/s00232-019-00067-4>
- Baran, A., Kwiatkowska, A., & Potocki, L. (2023). Antibiotics and Bacterial Resistance-A Short Story of an Endless Arms Race. *International journal of molecular sciences*, 24(6), 5777. <https://doi.org/10.3390/ijms24065777>
- Barros, F., De Quadros, C., Maróstica, M., & Pastore, G. (2007). Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. *Química Nova*, 30(2), 409-414. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422007000200031>
- Beltran-Gracia E, Macedo-Raygoza G, Villafañá-Rojas J et al (2017) Production of lipopeptides by fermentation processes: endophytic bacteria, fermentation strategies and easy methods for bacterial selection. In: Menestrina G, Dalla Serra M, Faustino Jozala A (eds) *Fermentation processes*, 1st edn. Intech Open Science, London, pp 260–271
- Bérdy J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *The Journal of antibiotics*, 58(1), 1–26. <https://doi.org/10.1038/ja.2005.1>

- Beriashvili, D., Taylor, R., Kralt, B., Abu Mazen, N., Taylor, S. D., & Palmer, M. (2018). Mechanistic studies on the effect of membrane lipid acyl chain composition on daptomycin pore formation. *Chemistry and physics of lipids*, 216, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2018.09.015>
- Bishop R. E. (2000). The bacterial lipocalins. *Biochimica et biophysica acta*, 1482(1-2), 73–83. [https://doi.org/10.1016/s0167-4838\(00\)00138-2](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(00)00138-2)
- Boottanun, P., Potisap, C., Hurdle, J. G., & Sermswan, R. W. (2017). Secondary metabolites from *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from soil can kill *Burkholderia pseudomallei*. *AMB Express*, 7(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0302-0>
- Bosák, J., Hrala, M., Micenková, L., & Šmajš, D. (2021). Non-antibiotic antibacterial peptides and proteins of *Escherichia coli*: efficacy and potency of bacteriocins. *Expert review of anti-infective therapy*, 19(3), 309–322. <https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1816824>
- Breton, R. C., & Reynolds, W. F. (2013). Using NMR to identify and characterize natural products. *Natural product reports*, 30(4), 501–524. <https://doi.org/10.1039/c2np20104f>
- Březina, V. (2024). Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. In: *Supramolecular Complexes of Oxoporphyrinogens with Organic Molecules*. Springer Theses. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-68646-7_3
- Chen, J., Liu, T., Wei, M., Zhu, Z., Liu, W., & Zhang, Z. (2019). Macrolactin a is the key antibacterial substance of *Bacillus amyloliquefaciens* D2WM against the pathogen *Dickeya chrysanthemi*. *European Journal Of Plant Pathology*, 155(2), 393-404. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01774-3>
- Chen, M., Wang, H., Zhang, C., Zhang, Y., Sun, H., Yu, L., Zhang, Q., Chen, X., & Xiao, H. (2025). Recent advances in antimicrobial lipopeptide fengycin secreted by *Bacillus*: Structure, biosynthesis, antifungal mechanisms, and potential application in food preservation. *Food chemistry*, 489, 144937. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.144937>
- Cheng, G., Dai, M., Ahmed, S., Hao, H., Wang, X., & Yuan, Z. (2016). Antimicrobial Drugs in Fighting against Antimicrobial Resistance. *Frontiers in microbiology*, 7, 470. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00470>
- Chun, B. H., Kim, K. H., Jeong, S. E., & Jeon, C. O. (2019). Genomic and metabolic features of the *Bacillus amyloliquefaciens* group- *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, and *B. siamensis*- revealed by pan-genome analysis. *Food microbiology*, 77, 146–157. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.09.001>
- Clark, A. E., Kaleta, E. J., Arora, A., & Wolk, D. M. (2013). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clinical microbiology reviews*, 26(3), 547–603. <https://doi.org/10.1128/CMR.00072-12>

- Cochrane, S. A., & Vederas, J. C. (2016). Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: A Gold Mine of Antibiotic Candidates. *Medicinal research reviews*, 36(1), 4–31. <https://doi.org/10.1002/med.21321>
- Cohn F. 1872. Untersuchungen Über Bakterien. Beitrage zur Biologie Pflanz. 1:127-1224.
- Dunlap, C. A., Kim, S. J., Kwon, S. W., & Rooney, A. P. (2016). *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and 'Bacillus oryzicola' are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(3), 1212–1217. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000858>
- Ebada, S. S., Edrada, R. A., Lin, W., & Proksch, P. (2008). Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates. *Nature Protocols*, 3(12), 1820-1831. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.182>
- Eeman, M., Francius, G., Dufrêne, Y. F., Nott, K., Paquot, M., & Deleu, M. (2009). Effect of cholesterol and fatty acids on the molecular interactions of fengycin with Stratum corneum mimicking lipid monolayers. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 25(5), 3029–3039. <https://doi.org/10.1021/la803439n>
- Elshaghabe, F. M. F., Rokana, N., Gulhane, R. D., Sharma, C., & Panwar, H. (2017). *Bacillus* As Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives. *Frontiers in microbiology*, 8, 1490. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01490>
- Falardeau, J., Wise, C., Novitsky, L., & Avis, T. J. (2013). Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* lipopeptides on plant pathogens. *Journal of chemical ecology*, 39(7), 869–878. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0319-7>
- Fan, B., Blom, J., Klenk, H. P., & Borriss, R. (2017). *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* Form an "Operational Group *B. amyloliquefaciens*" within the *B. subtilis* Species Complex. *Frontiers in microbiology*, 8, 22. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00022>
- Funakoshi (28 de septiembre 2023) *Plipastatina A1*. Recuperado el 20 de julio de 2025, de https://www.funakoshi.co.jp/exports_contents/520064
- Gao, L., Han, J., Liu, H., Qu, X., Lu, Z., & Bie, X. (2017). Plipastatin and surfactin coproduction by *Bacillus subtilis* pB2-L and their effects on microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110(8), 1007–1018. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0874-y>
- Grifé-Ruiz, M., Hierrezuelo-León, J., de Vicente, A., Pérez-García, A., & Romero, D. (2025). Diversification of Lipopeptide Analogues Drives Versatility in Biological Activities. *Journal of agricultural and food chemistry*, 73(2), 1403–1416. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.4c11372>

- Gu, Q., Yan, J., Lou, Y., Zhang, Z., Li, Y., Zhu, Z., Liu, M., Wu, D., Liang, Y., Pu, J., Zhao, X., Xiao, H., & Li, P. (2024). Bacteriocins: Curial guardians of gastrointestinal tract. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 23(1), e13292. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13292>
- Hamley I. W. (2015). Lipopeptides: from self-assembly to bioactivity. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 51(41), 8574–8583. <https://doi.org/10.1039/c5cc01535a>
- Hamley, I. W., Dehsorkhi, A., Jauregi, P., Seitsonen, J., Ruokolainen, J., Coutte, F., Chataigné, G., & Jacques, P. (2013). Self-assembly of three bacterially-derived bioactive lipopeptides. *Soft matter*, 9(40), 9572–9578. <https://doi.org/10.1039/c3sm51514a>
- Han, D., Ji, Y., Yang, S., Song, P., Shi, Y., Shao, D., Chen, X., Shang, L., Shi, J., & Jiang, C. (2024). Therapeutic effect of iturin A on *Candida albicans* oral infection and its pathogenic factors. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 68(1), e0094823. <https://doi.org/10.1128/aac.00948-23>
- Honma, M., Tanaka, K., Konno, K., Tsuge, K., Okuno, T., & Hashimoto, M. (2012). Termination of the structural confusion between plipastatin A1 and fengycin IX. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 20(12), 3793–3798. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.04.040>
- Hunger, M., Brunner, E. NMR Spectroscopy. In: Karge, H.G., Weitkamp, J. (eds) *Characterization I. Molecular Sieves – Science and Technology*, vol 4. Springer, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/b94236>
- Jang, S., Choi, S. K., Zhang, H., Zhang, S., Ryu, C. M., & Kloepper, J. W. (2023). History of a model plant growth-promoting rhizobacterium, *Bacillus velezensis* GB03: from isolation to commercialization. *Frontiers in plant science*, 14, 1279896. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1279896>
- Jung, J. W., Kim, J. M., Kwon, M. H., Kim, D. H., & Kang, H. E. (2014). Pharmacokinetics of macrolactin A and 7-O-succinyl macrolactin A in mice. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*, 44(6), 547–554. <https://doi.org/10.3109/00498254.2013.861542>
- Kenfaoui, J., Dutilloy, E., Benchli, S., Lahlali, R., Ait-Barka, E., & Esmaeel, Q. (2024). *Bacillus velezensis*: a versatile ally in the battle against phytopathogens-insights and prospects. *Applied microbiology and biotechnology*, 108(1), 439. <https://doi.org/10.1007/s00253-024-13255-7>
- Kim, D. H., Kim, H. K., Kim, K. M., Kim, C. K., Jeong, M. H., Ko, C. Y., Moon, K. H., & Kang, J. S. (2011). Antibacterial activities of macrolactin A and 7-O-succinyl macrolactin A from *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 against vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Archives of pharmacal research*, 34(1), 147–152. <https://doi.org/10.1007/s12272-011-0117-0>
- Kim, J. A., Song, J. S., Kim, P. I., Kim, D. H., & Kim, Y. (2022). *Bacillus velezensis* TSA32-1 as a Promising Agent for Biocontrol of Plant Pathogenic

- Fungi. *Journal of fungi* (Basel, Switzerland), 8(10), 1053. <https://doi.org/10.3390/jof8101053>
- Kumar, P., Patel, S. K., Lee, J. K., & Kalia, V. C. (2013). Extending the limits of *Bacillus* for novel biotechnological applications. *Biotechnology advances*, 31(8), 1543–1561. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.08.007>
 - Liu, Y., Lu, J., Sun, J., Zhu, X., Zhou, L., Lu, Z., & Lu, Y. (2019). C16-Fengycin A affect the growth of *Candida albicans* by destroying its cell wall and accumulating reactive oxygen species. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(21-22), 8963–8975. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10117-5>
 - Liu, Y., Teng, K., Wang, T., Dong, E., Zhang, M., Tao, Y., & Zhong, J. (2020). Antimicrobial *Bacillus velezensis* HC6: production of three kinds of lipopeptides and biocontrol potential in maize. *Journal of applied microbiology*, 128(1), 242–254. <https://doi.org/10.1111/jam.14459>
 - Liu, Y., Zheng, H., Zhan, G., Qin, W., Tian, L., & Li, W. (2014). Establishment of an efficient transformation protocol and its application in marine-derived *Bacillus* strain. *Science China. Life sciences*, 57(6), 627–635. <https://doi.org/10.1007/s11427-014-4632-3>
 - Lohman, J. R., Ma, M., Osipiuk, J., Nocek, B., Kim, Y., Chang, C., Cuff, M., Mack, J., Bigelow, L., Li, H., Endres, M., Babnigg, G., Joachimiak, A., Phillips, G. N., Jr, & Shen, B. (2015). Structural and evolutionary relationships of "AT-less" type I polyketide synthase ketosynthases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(41), 12693–12698. <https://doi.org/10.1073/pnas.1515460112>
 - Lopardo, H. (2020). Antibióticos: clasificación, estructura, mecanismos de acción y resistencia. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). <https://doi.org/10.35537/10915/103061>
 - Ma, Z., & Hu, J. (2018). Plipastatin A1 produced by a marine sediment-derived *Bacillus amyloliquefaciens* SH-B74 contributes to the control of gray mold disease in tomato. *3 Biotech*, 8(2), 125. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1144-z>
 - Maithani, D., Sharma, A., Gangola, S., Chaudhary, P., & Bhatt, P. (2022). Insights into applications and strategies for discovery of microbial bioactive metabolites. *Microbiological research*, 261, 127053. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127053>
 - Maughan, H., & Van der Auwera, G. (2011). *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 11(5), 789–797. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.02.001>
 - Mnif, I., & Ghribi, D. (2015). Review lipopeptides biosurfactants: Mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental

applications. *Biopolymers*, 104(3), 129–147.
<https://doi.org/10.1002/bip.22630>

- Monzón-Atienza, L., Bravo, J., Torrecillas, S., Montero, D., Canales, A. F. G., de la Banda, I. G., Galindo-Villegas, J., Ramos-Vivas, J., & Acosta, F. (2021). Isolation and Characterization of a *Bacillus velezensis* D-18 Strain, as a Potential Probiotic in European Seabass Aquaculture. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 13(5), 1404–1412. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09782-8>
- Moreno-Velandia, C. A., Ongena, M., Kloepper, J. W., & Cotes, A. M. (2021). Biosynthesis of Cyclic Lipopeptides by *Bacillus velezensis* Bs006 and its Antagonistic Activity are Modulated by the Temperature and Culture Media Conditions. *Current microbiology*, 78(9), 3505–3515. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02612-8>
- Nasompag, S., Dechsiri, P., Hongsing, N., Phonimdaeng, P., Daduang, S., Klaynongsruang, S., Camesano, T. A., & Patramanon, R. (2015). Effect of acyl chain length on therapeutic activity and mode of action of the CX-KYR-NH₂ antimicrobial lipopeptide. *Biochimica et biophysica acta*, 1848(10 Pt A), 2351–2364. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.07.004>
- National Center for Biotechnology Information (2025). PubChem Compound Summary for CID 5491283, Plipastatin. Retrieved May 23, 2025 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Plipastatin>.
- Nazari, M., Yaghoubian, I., & Smith, D. L. (2022). The stimulatory effect of Thuricin 17, a PGPR-produced bacteriocin, on canola (*Brassica napus* L.) germination and vegetative growth under stressful temperatures. *Frontiers in plant science*, 13, 1079180. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1079180>
- Ortiz, A., & Sansinenea, E. (2020). Macrolactin Antibiotics: Amazing Natural Products. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 20(7), 584–600. <https://doi.org/10.2174/1389557519666191205124050>
- Patel, S., & Gupta, R. S. (2020). A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new genera of *Bacillus* species, *Peribacillus* gen. nov., *Cytobacillus* gen. nov., *Mesobacillus* gen. nov., *Neobacillus* gen. nov., *Metabacillus* gen. nov. and *Alkalihalobacillus* gen. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(1), 406–438. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003775>
- Rabbee, M. F., Ali, M. S., Choi, J., Hwang, B. S., Jeong, S. C., & Baek, K. H. (2019). *Bacillus velezensis*: A Valuable Member of Bioactive Molecules within Plant Microbiomes. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(6), 1046. <https://doi.org/10.3390/molecules24061046>
- Ragazzo-Sánchez, Juan Arturo, Robles-Cabrera, Alejandra, Lomelí-González, Leopoldo, Luna-Solano, Guadalupe, & Calderón-Santoyo, Montserrat. (2011). Selección de cepas de *Bacillus* spp. productoras de antibióticos aisladas de frutos tropicales. *Revista Chapingo. Serie*

horticultura, 17(spe1), 5-11. Recuperado en 21 de junio de 2025, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2011000400002&lng=es&tlng=es.

- Rahman FB, Sarkar B, Moni R, Rahman MS. Molecular genetics of surfactin and its effects on different sub-populations of *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Rep (Amst)*. 2021 Oct 26;32:e00686. doi: 10.1016/j.btre.2021.e00686. PMID: 34786355; PMCID: PMC8578018.
- Ren, L., Yuan, Z., Xie, T., Wu, D., Kang, Q., Li, J., & Li, J. (2022). Extraction and characterization of cyclic lipopeptides with antifungal and antioxidant activities from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of applied microbiology*, 133(6), 3573–3584. <https://doi.org/10.1111/jam.15791>
- Reuben, R. C., & Torres, C. (2024). Bacteriocins: potentials and prospects in health and agrifood systems. *Archives of microbiology*, 206(5), 233. <https://doi.org/10.1007/s00203-024-03948-y>
- Riley, Margaret A., & Wertz, John E. (2002). Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. *Annual Review Of Microbiology*, 56(1), 117-137. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.161024>
- Ritgen, U. (2025). Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR). In: *Analytical Chemistry II*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-68710-9_3
- Saxena, A. K., Kumar, M., Chakdar, H., Anuroopa, N., & Bagyaraj, D. J. (2020). *Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. *Journal of applied microbiology*, 128(6), 1583–1594. <https://doi.org/10.1111/jam.14506>
- Schneider, K., Chen, X. H., Vater, J., Franke, P., Nicholson, G., Borriss, R., & Süssmuth, R. D. (2007). Macrolactin is the polyketide biosynthesis product of the pks2 cluster of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of natural products*, 70(9), 1417–1423. <https://doi.org/10.1021/np070070k>
- Schneider, T., Müller, A., Miess, H., & Gross, H. (2014). Cyclic lipopeptides as antibacterial agents - potent antibiotic activity mediated by intriguing mode of actions. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 304(1), 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.08.009>
- Shleeva, M. O., Kondratieva, D. A., & Kaprelyants, A. S. (2023). *Bacillus licheniformis*: A Producer of Antimicrobial Substances, including Antimycobacterials, Which Are Feasible for Medical Applications. *Pharmaceutics*, 15(7), 1893. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15071893>
- Simon, D.S. (2025). Nuclear Magnetic Resonance. In: *Introduction to Quantum Science and Technology*. Undergraduate Texts in Physics. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-81315-3_23
- Simons, A., Alhanout, K., & Duval, R. E. (2020). Bacteriocins, Antimicrobial Peptides from Bacterial Origin: Overview of Their Biology and Their Impact

- against Multidrug-Resistant Bacteria. *Microorganisms*, 8(5), 639. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050639>
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., & Viridi, J. S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in microbiology*, 6, 791. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791>
 - Soltani, S., Hammami, R., Cotter, P. D., Rebuffat, S., Said, L. B., Gaudreau, H., Bédard, F., Biron, E., Drider, D., & Fliss, I. (2021). Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: toxicity aspects and regulations. *FEMS microbiology reviews*, 45(1), fuaa039. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa039>
 - Sreelakshmi, K. P., Madhuri, M., Swetha, R., Rangarajan, V., & Roy, U. (2024). Microbial lipopeptides: their pharmaceutical and biotechnological potential, applications, and way forward. *World journal of microbiology & biotechnology*, 40(4), 135. <https://doi.org/10.1007/s11274-024-03908-0>
 - Sugrue, I., Ross, R. P., & Hill, C. (2024). Bacteriocin diversity, function, discovery and application as antimicrobials. *Nature reviews. Microbiology*, 22(9), 556–571. <https://doi.org/10.1038/s41579-024-01045-x>
 - Sun, J., Qi, X., & Du, C. (2025). Biosynthesis and yield improvement strategies of fengycin. *Archives of microbiology*, 207(4), 90. <https://doi.org/10.1007/s00203-025-04301-7>
 - Uluseker, C., Kaster, K. M., Thorsen, K., Basiry, D., Shobana, S., Jain, M., Kumar, G., Kommedal, R., & Pala-Ozkok, I. (2021). A Review on Occurrence and Spread of Antibiotic Resistance in Wastewaters and in Wastewater Treatment Plants: Mechanisms and Perspectives. *Frontiers in microbiology*, 12, 717809. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.717809>
 - Urajová, P., Hájek, J., Wahlsten, M., Jokela, J., Galica, T., Fewer, D. P., Kust, A., Zapomělová-Kozlíková, E., Delawská, K., Sivonen, K., Kopecký, J., & Hrouzek, P. (2016). A liquid chromatography-mass spectrometric method for the detection of cyclic β -amino fatty acid lipopeptides. *Journal of chromatography. A*, 1438, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.02.013>
 - Vahidinasab, M., Lilge, L., Reinfurt, A., Pfannstiel, J., Henkel, M., Morabbi Heravi, K., & Hausmann, R. (2020). Construction and description of a constitutive plipastatin mono-producing *Bacillus subtilis*. *Microbial cell factories*, 19(1), 205. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01468-0>
 - Valenzuela Ruiz, V., Gálvez Gamboa, G. T., Villa Rodríguez, E. D., Parra Cota, F. I., Santoyo, G., & de los Santos Villalobos, S. (2020). Lipopéptidos producidos por agentes de control biológico del género *Bacillus*: revisión de herramientas analíticas utilizadas para su estudio. *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas*, 11(2), 419–432. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i2.2191>
 - Vanittanakom, N., Loeffler, W., Koch, U., & Jung, G. (1986). Fengycin: un nuevo antibiótico lipopéptido antifúngico producido por *Bacillus subtilis* F-29-

3. *Revista de antibióticos*, 39(7), 888–901.
<https://doi.org/10.7164/antibiotics.39.888>

- Vasilchenko, A. S., Lukyanov, D. A., Dilbaryan, D. S., Usachev, K. S., Poshvina, D. V., Taldaev, A. K., Nikandrova, A. A., Imamutdinova, A. N., Garaeva, N. S., Bikmullin, A. G., Klochkova, E. A., Rusanov, A. L., Romashin, D. D., Luzgina, N. G., Osterman, I. A., Sergiev, P. V., & Teslya, A. V. (2025). Macrolactin a is an inhibitor of protein biosynthesis in bacteria. *Biochimie*, S0300-9084(25)00012-4. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2025.01.003>
- Villagómez, D. G. D., Ramírez, R. E. H., Cruz, D. C., & Gómez, C. V. (2023). Análisis fitoquímico: Una visión integral de los métodos de extracción de productos naturales. *Naturaleza y Tecnología*, 10(1).
- Wang, L. T., Lee, F. L., Tai, C. J., and Kuo, H. P. (2008) *Bacillus velezensis* is a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 671-675
- Wang, M., Zheng, J., Sun, S., Wu, Z., Shao, Y., Xiang, J., Yin, C., Sedjoah, R. C. A. A., & Xin, Z. (2024). An Integrated Pipeline and Overexpression of a Novel Efflux Transporter, YoeA, Significantly Increases Plipastatin Production in *Bacillus subtilis*. *Foods (Basel, Switzerland)*, 13(11), 1785. <https://doi.org/10.3390/foods13111785>
- Wu, T., Xiao, F., & Li, W. (2020). Macrolactins: biological activity and biosynthesis. *Marine life science & technology*, 3(1), 62–68. <https://doi.org/10.1007/s42995-020-00068-6>
- Xiao, J., Guo, X., Qiao, X., Zhang, X., Chen, X., & Zhang, D. (2021). Activity of Fengycin and Iturin A Isolated From *Bacillus subtilis* Z-14 on *Gaeumannomyces graminis* Var. *tritici* and Soil Microbial Diversity. *Frontiers In Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.682437>
- Xiong, Z. R., Cobo, M., Whittal, R. M., Snyder, A. B., & Worobo, R. W. (2022). Purification and characterization of antifungal lipopeptide produced by *Bacillus velezensis* isolated from raw honey. *PloS one*, 17(4), e0266470. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266470>
- Yang, S., Ji, Y., Xue, P., Li, Z., Chen, X., Shi, J., & Jiang, C. (2024). Insights into the antifungal mechanism of *Bacillus subtilis* cyclic lipopeptide iturin A mediated by potassium ion channel. *International journal of biological macromolecules*, 277(Pt 2), 134306. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.134306>
- Yaraguppi, D. A., Bagewadi, Z. K., Patil, N. R., & Mantri, N. (2023). Iturin: A Promising Cyclic Lipopeptide with Diverse Applications. *Biomolecules*, 13(10), 1515. <https://doi.org/10.3390/biom13101515>
- Ye, M., Tang, X., Yang, R., Zhang, H., Li, F., Tao, F., Li, F., & Wang, Z. (2018). Characteristics and Application of a Novel Species of *Bacillus*: *Bacillus*

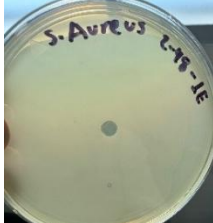






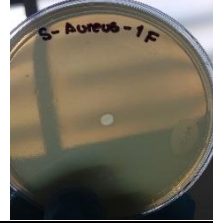

- velezensis. *ACS chemical biology*, 13(3), 500–505.
<https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00874>
- Yin, Y., Wang, X., Zhang, P., Wang, P., & Wen, J. (2024). Strategies for improving fengycin production: a review. *Microbial cell factories*, 23(1), 144.
<https://doi.org/10.1186/s12934-024-02425-x>
 - Zeigler, D. R., & Perkins, J. B. (2021). The genus bacillus. In *Practical handbook of microbiology* (pp. 249-278). CRC Press.
 - Zhang, D. J., Liu, R. F., Li, Y. G., Tao, L. M., & Tian, L. (2010). Two new antifungal cyclic lipopeptides from *Bacillus marinus* B-9987. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 58(12), 1630–1634.
<https://doi.org/10.1248/cpb.58.1630>
 - Zhang, L., Jin, M., Shi, X., Jin, L., Hou, X., Yu, Y., Liu, B., Cao, J., & Quan, C. (2022). Macrolactin Metabolite Production by *Bacillus* sp. ZJ318 Isolated from Marine Sediment. *Applied biochemistry and biotechnology*, 194(6), 2581–2593. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-03841-8>
 - Zhang, Y., Gao, W., Zhang, H., Sun, T., Yang, H., Liu, Y., Han, X., Yin, D., & Xu, W. (2025). Antagonistic mechanism of *Bacillus velezensis* HX0039 as a biocontrol agent against *Trichoderma virens*-induced "Sanghuang" green mold. *Applied and environmental microbiology*, e0000525. Advance online publication. <https://doi.org/10.1128/aem.00005-25>
 - Zhang, Y., Liu, C., Dong, B., Ma, X., Hou, L., Cao, X., & Wang, C. (2015). Actividad antiinflamatoria y mecanismo de la surfactina en macrófagos activados por lipopolisacáridos. *Inflamación*, 38(2), 756–764.
<https://doi.org/10.1007/s10753-014-9986-y>
 - Zhao, J., Zhou, Z., Bai, X., Zhang, D., Zhang, L., Wang, J., Wu, B., Zhu, J., & Yang, Z. (2022). A novel of new class II bacteriocin from *Bacillus velezensis* HN-Q-8 and its antibacterial activity on *Streptomyces scabies*. *Frontiers in microbiology*, 13, 943232.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.943232>







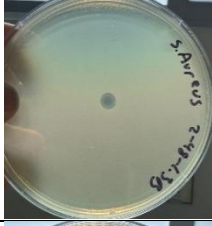





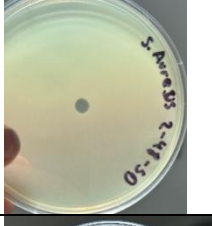





11. Anexos

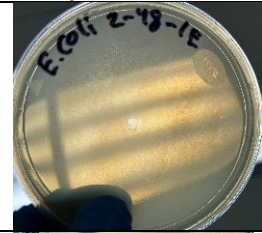
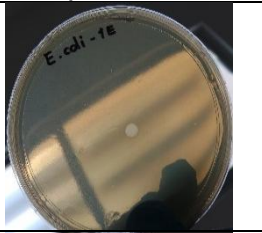


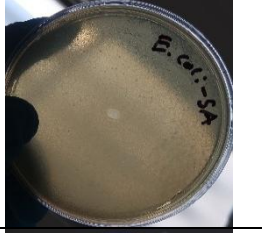
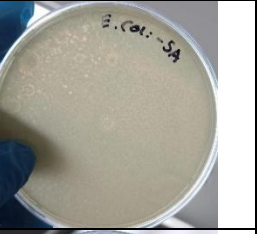





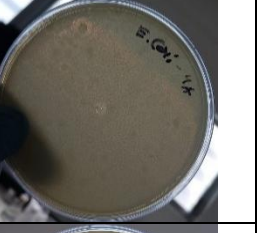









Anexo 1. Halos de inhibición de metabolitos producidos por *B. velezensis* VM1054.







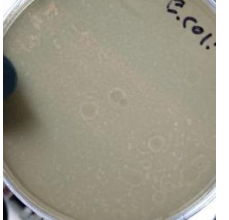




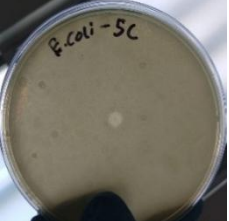




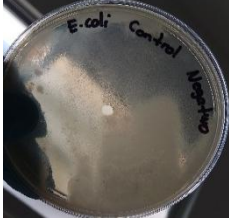

Compuesto	<i>Staphylococcus aureus</i>				<i>Escherichia coli</i>			
	Diámetro del halo de inhibición (cm)				Diámetro del halo de inhibición (cm)			
	Primera prueba	Segunda prueba	Tercera prueba	Promedio	Primera prueba	Segunda prueba	Tercera prueba	Promedio
2-48-1E	0.40	0.20	0.10	0.23	0.20	0.30	0.08	0.19
2-48-4A	0.30	0.25	0.30	0.28	0.30	0.45	0.10	0.28
2-48-5A	0.50	0.50	0.30	0.43	0.20	0.20	0.20	0.20
2-48-3A	0.50	0.41	0.38	0.43	0.30	0.25	0.50	0.35
2-48-1F	0.30	0.20	0.10	0.20	0.30	0.20	0.30	0.26
2-48-1.3C	0.41	0.30	0.38	0.36	0.30	0.30	0.30	0.30
2-48-1.3A	0.40	0.25	0.30	0.32	0.20	0.20	0.12	0.17
2-48-5B	0.50	0.30	0.40	0.40	0.50	0.30	0.50	0.43
2-48-1.1E	0.20	0.40	0.41	0.34	0.40	0.30	0.30	0.33
2-48-1G	0.20	0.30	0.21	0.24	0.20	0.30	0.10	0.20
2-48-1.3B	0.40	0.25	0.30	0.32	0.10	0.30	0.30	0.23
2-48-5C	0.21	0.30	0.20	0.24	0.30	0.20	0.20	0.23
2-48-1.1A	0.30	0.40	0.30	0.33	0.20	0.30	0.30	0.26
2-48-5D	0.35	0.30	0.20	0.28	0.20	0.20	0.20	0.20
Control -	0.30	0.15	0.30	0.25	0.20	0.15	0.00	0.11

Imágenes de las pruebas de inhibición de los compuestos que no mostraron inhibición

<i>Staphylococcus aureus</i>			
Compuestos	1ra prueba	2da prueba	3ra prueba
1E			
4A			
1F			

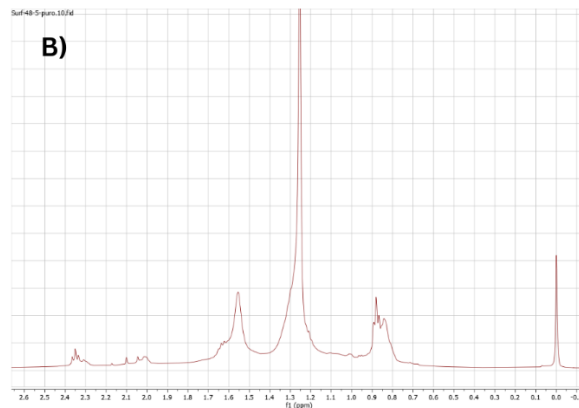
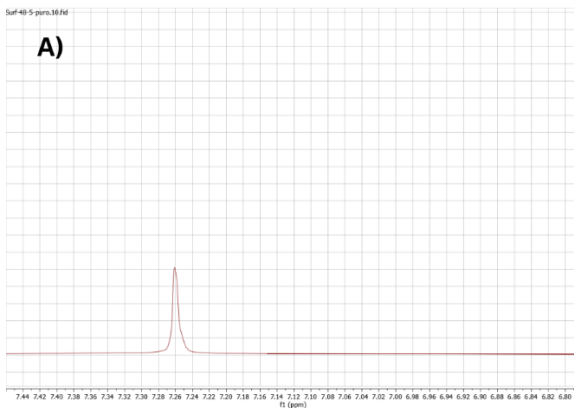
1.3A	 A petri dish with a yellow agar surface and a small white spot in the center. The label "S. Aureus 2-48-1.3A" is written on the lid.	 A petri dish with a yellow agar surface and a small white spot in the center. The label "S. Aureus-1.3A" is written on the lid.	 A petri dish with a yellow agar surface and a small white spot in the center. The label "S. Aureus 1.3A" is written on the lid.
1G	 A petri dish with a yellow agar surface and a small white spot in the center. The label "Aureus 2-48-1G" is written on the lid.	 A petri dish with a yellow agar surface and a small white spot in the center. The label "S. Aureus-1G" is written on the lid.	 A petri dish with a yellow agar surface and a small white spot in the center. The label "Aureus-1G" is written on the lid.
1.3B	 A petri dish with a yellow agar surface and a small white spot in the center. The label "S. Aureus 2-48-1.3B" is written on the lid.	 A petri dish with a yellow agar surface and a small white spot in the center. The label "S. Aureus-1.3B" is written on the lid.	 A petri dish with a yellow agar surface and a small white spot in the center. The label "S. Aureus-1.3B" is written on the lid.
5C	 A petri dish with a yellow agar surface and a small white spot in the center. The label "S. Aureus 2-48-5C" is written on the lid.	 A petri dish with a yellow agar surface and a small white spot in the center. The label "S. Aureus-5C (C)" is written on the lid.	 A petri dish with a yellow agar surface and a small white spot in the center. The label "S. Aureus-5C" is written on the lid.
5D	 A petri dish with a yellow agar surface and a small white spot in the center. The label "S. Aureus 05-48-2" is written on the lid.	 A petri dish with a yellow agar surface and a small white spot in the center. The label "S. Aureus-5D" is written on the lid.	 A petri dish with a yellow agar surface and a small white spot in the center. The label "Aureus-5D" is written on the lid.
Control negativo	 A petri dish with a yellow agar surface and a small white spot in the center. The label "S. Aureus control" is written on the lid.	 A petri dish with a yellow agar surface and a small white spot in the center. The label "S. Aureus (C)" is written on the lid.	 A petri dish with a yellow agar surface and a small white spot in the center. The label "S. Aureus" is written on the lid.

<i>Escherichia coli</i>			
Compuestos	1ra prueba	2da prueba	3ra prueba
1E	 Petri dish showing a small white spot on a yellowish agar. Handwritten label: E. coli 2-49-1E	 Petri dish showing a small white spot on a yellowish agar. Handwritten label: E. coli -1E	 Petri dish showing a small white spot on a yellowish agar. Handwritten label: 2. coli -1E
5A	 Petri dish showing a small white spot on a yellowish agar. Handwritten label: E. coli -5A	 Petri dish showing a small white spot on a yellowish agar. Handwritten label: E. coli -5A	 Petri dish showing a small white spot on a yellowish agar. Handwritten label: E. coli -5A
3A	 Petri dish showing a small white spot on a yellowish agar. Handwritten label: E. coli 2-49-3A	 Petri dish showing a small white spot on a yellowish agar. Handwritten label: E. coli -3A	 Petri dish showing a small white spot on a yellowish agar. Handwritten label: E. coli -3A
4A	 Petri dish showing a small white spot on a yellowish agar. Handwritten label: E. coli 2-49-4A	 Petri dish showing a small white spot on a yellowish agar. Handwritten label: E. coli -4A	 Petri dish showing a small white spot on a yellowish agar. Handwritten label: E. coli -4A
1.3C	 Petri dish showing a small white spot on a yellowish agar. Handwritten label: E. coli 2-49-1.3C	 Petri dish showing a small white spot on a yellowish agar. Handwritten label: E. coli -1.3C	 Petri dish showing a small white spot on a yellowish agar. Handwritten label: E. coli -1.3C
1.1A	 Petri dish showing a small white spot on a yellowish agar. Handwritten label: E. coli 2-49-1.1A	 Petri dish showing a small white spot on a yellowish agar. Handwritten label: E. coli 1.1A	 Petri dish showing a small white spot on a yellowish agar. Handwritten label: E. coli -1.1A
1F	 Petri dish showing a small white spot on a yellowish agar. Handwritten label: E. coli 2-49-1F	 Petri dish showing a small white spot on a yellowish agar. Handwritten label: E. coli -1F	 Petri dish showing a small white spot on a yellowish agar. Handwritten label: E. coli -1F

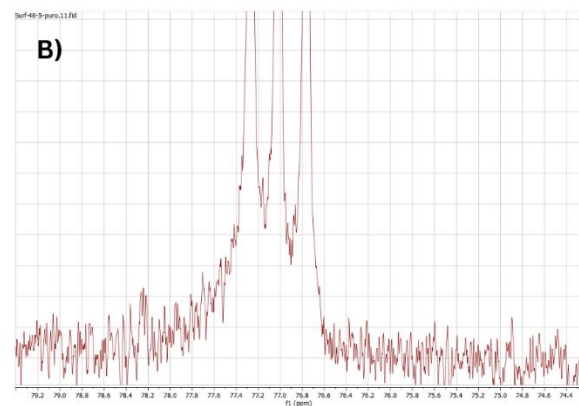
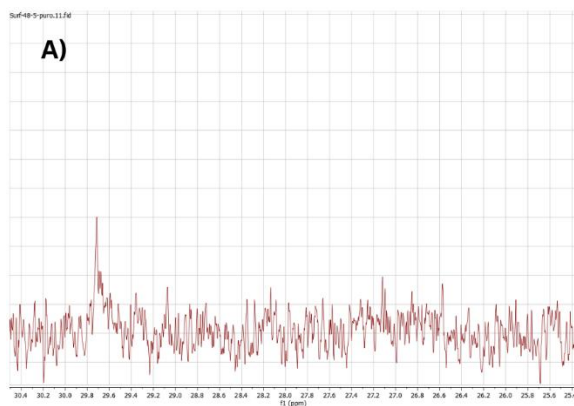
1.3A			
1G			
1.3B			
5C			
5D			
Control negativo			

Anexo 2. Resultados de metabolitos producidos por *B.velezensis* VM1054 que no mostraron suficiente inhibición.

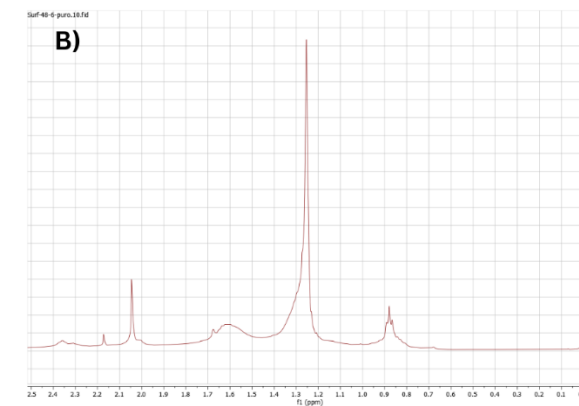
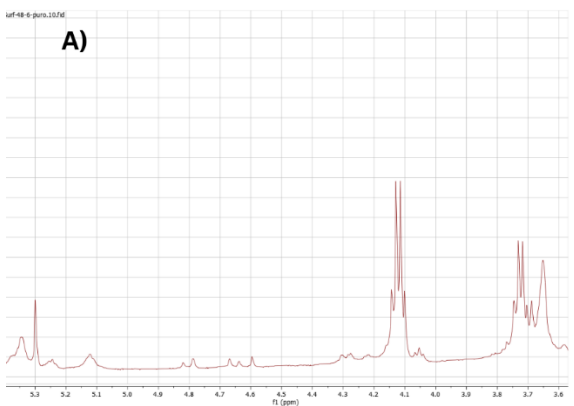
RMN del ^1H del compuesto 1F; A) rango 6.80 – 7.44 ppm; B) rango 0.00 – 2.60 ppm.



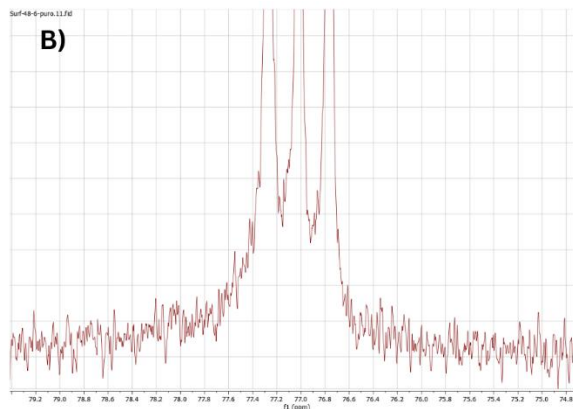
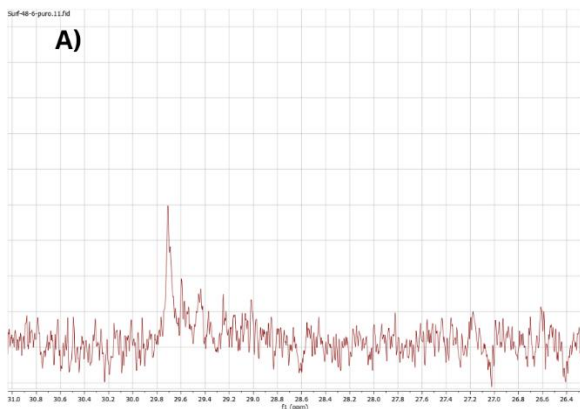
RMN del ^{13}C del compuesto 1F; A) rango 25.40 – 30.40 ppm; B) rango 74.40 – 79.20 ppm.



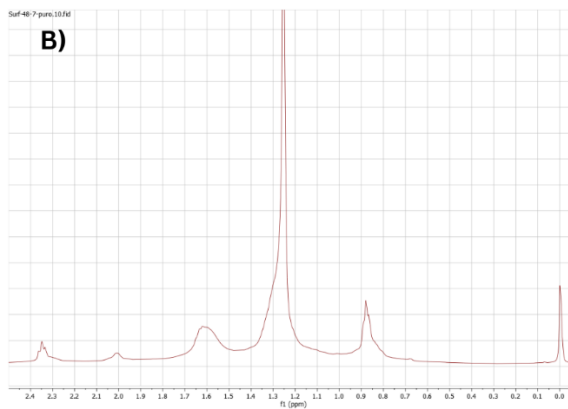
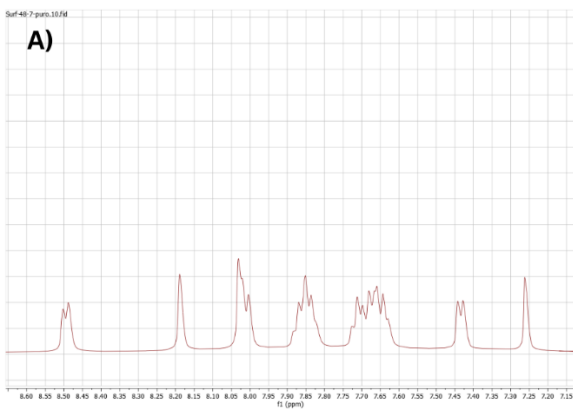
RMN del ^1H del compuesto 1E; A) rango 3.60 – 5.30 ppm; B) rango 0.00 – 2.50 ppm.



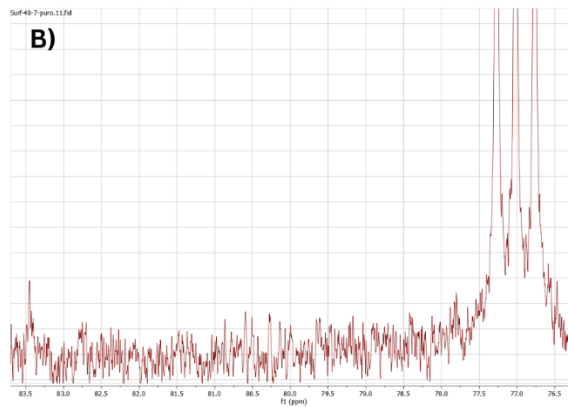
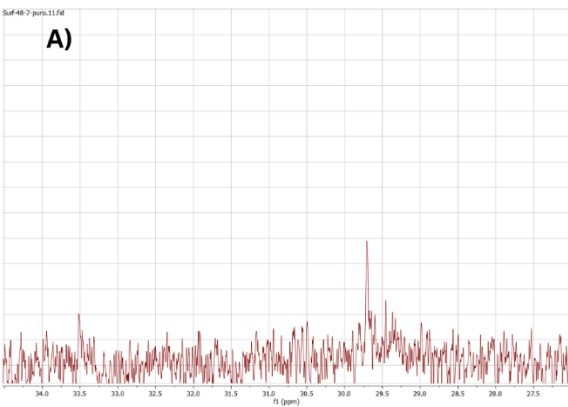
RMN del ^{13}C del compuesto 1E; A) rango 26.40 – 31.00 ppm; B) rango 74.80 – 79.20 ppm.

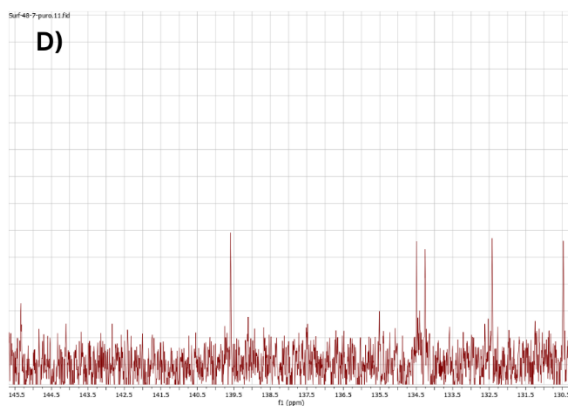
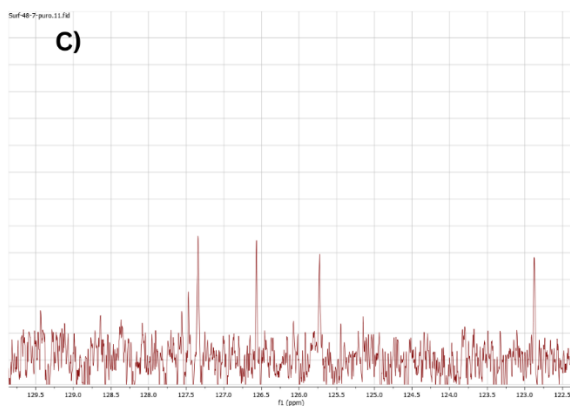


RMN del ^1H del compuesto 1G; A) rango 7.15 – 8.60 ppm; B) rango 0.00 – 2.40 ppm.

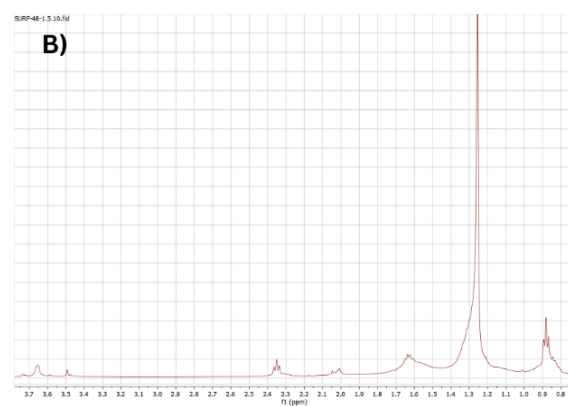
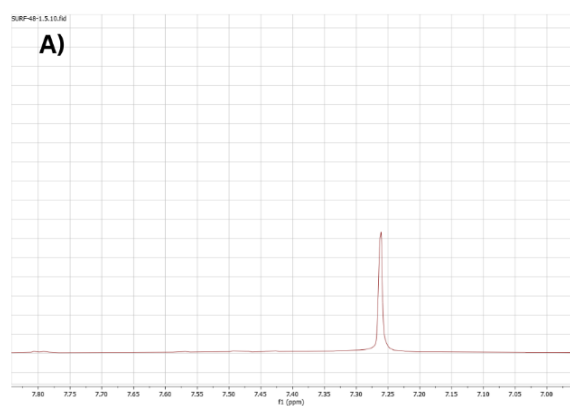


RMN del ^{13}C del compuesto 1G; A) rango 27.50 – 34.00 ppm; B) rango 76.50 – 83.50 ppm; C) rango 122.50 – 129.50 ppm; D) rango 130.50 – 145.50 ppm.

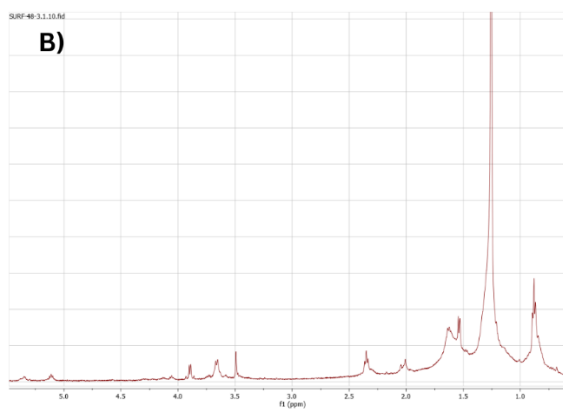
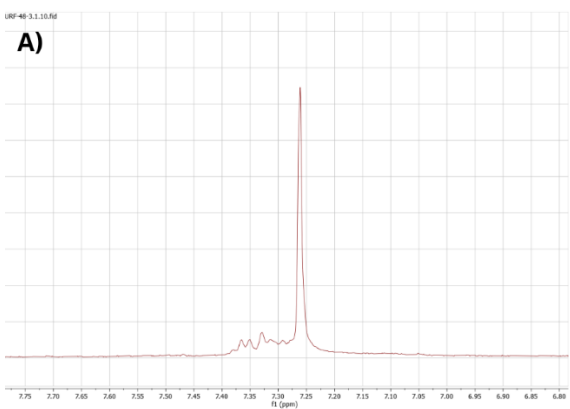




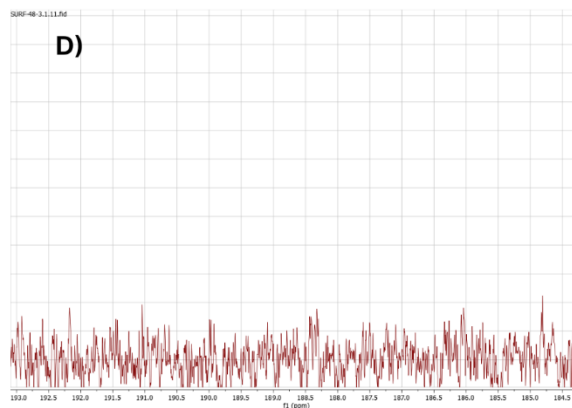
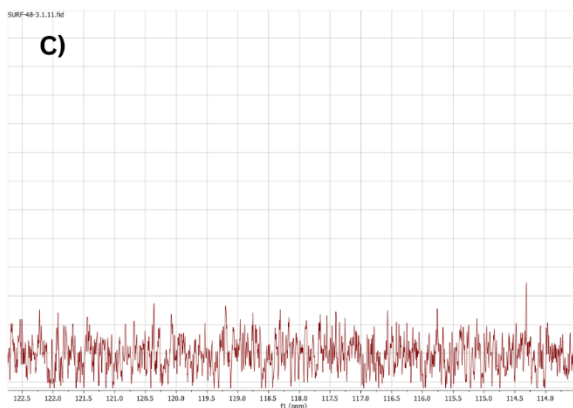
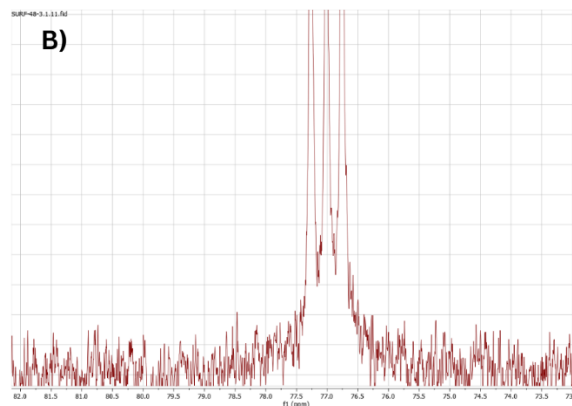
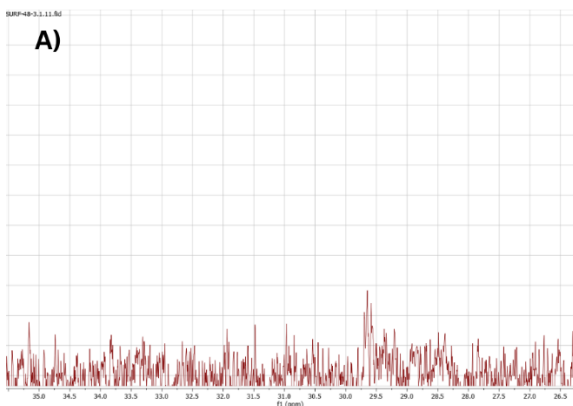
RMN del ^1H del compuesto 1.1E; A) rango 7.00 – 8.00 ppm; B) rango 0.80 – 3.70 ppm.



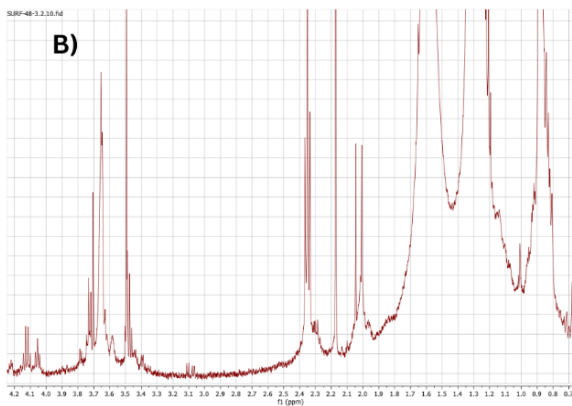
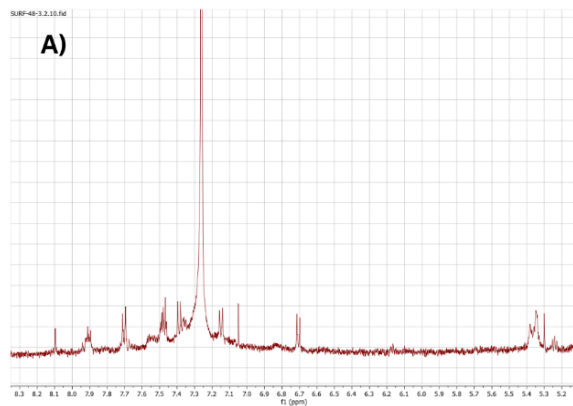
RMN del ^1H del compuesto 1.3A; A) rango 6.80 – 7.80 ppm; B) rango 0.70 – 5.50 ppm.



RMN del ^{13}C del compuesto 1.3A; A) rango 26.50 – 35.00 ppm; B) rango 73.00 – 82.00 ppm; C) rango 114.00 – 122.50 ppm; D) rango 184.50 – 193.00 ppm.



RMN del ^1H del compuesto 1.3B; A) rango 5.20 – 8.30 ppm; B) rango 0.70 – 4.20 ppm.



RMN del ^{13}C del compuesto 1E; A) rango 28.20 – 30.90 ppm; B) rango 76.00 – 78.30 ppm.

