



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Potencial antimicrobiano de cepas del género
Bacillus spp contra bacterias patógenas**

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

JUAN BAUTISTA ROMERO

DIRECTORA:

NORMA ELENA ROJAS RUIZ

NOVIEMBRE 2024



Agradecimientos.

A mi madre y hermana por el apoyo incondicional en cada momento que me permitieron la oportunidad de cursar una carrera universitaria.

A mi asesora de tesis, la Dra. Norma Elena Rojas Ruiz, por su tiempo y paciencia en el desarrollo de esta tesis.

A la Universidad y los profesores que fueron parte de esta aventura.

Contenido

Resumen.....	6
Abstract.....	7
Introducción.....	8
1.1 Mecanismos de transferencia de información genética de forma horizontal.....	10
1.2 Clasificación taxonómica de los microorganismos.....	11
1.3 Características del género <i>Bacillus</i>	14
1.4 Pruebas bioquímicas empleadas para la caracterización del género <i>Bacillus</i>	16
1.5 Especies del género <i>Bacillus</i> de importancia en el área de la salud y el ambiente.....	17
<i>Bacillus subtilis</i>	17
<i>Bacillus anthracis</i>	19
Grupo <i>Bacillus cereus</i>	21
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	23
<i>Bacillus thuringiensis</i>	24
1.6 Metabolitos de importancia en la salud producidos por el género <i>Bacillus</i>	26
Bacitracina.....	28
Gramicidina.....	31
Tirocidina.....	31
Subtilina.....	32
Polimixina.....	33
Edeína.....	33
Butirosina.....	34
1.7 El problema de la resistencia a los antibióticos comerciales y los nuevos retos.....	34
1.8 Mecanismos de acción de los antibióticos.....	38
2. Objetivo General.....	39
2.1. Objetivos particulares:.....	39
3. Justificación del proyecto.....	40
4. Hipótesis.....	41
5. Materiales y métodos.....	42
5.1 Cepas empleadas en esta investigación:.....	42
5.2 Preparación de medios de cultivo.....	43
5.3 Tinción de Gram de las cepas empleadas.....	44
5.4 Tinción con verde de malaquita (Observación de esporas).....	45

5.5 Extracción de DNA Genómico y Electroforesis en Gel de Agarosa.	46
5.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	47
5.7 Antibiógramas de las cepas de <i>Salmonella spp</i> y <i>Shigella spp</i>	48
5.8 Obtención de metabolitos producidos por cepas de <i>Bacillus spp</i>	48
5.9. Ensayos de antagonismo de los metabolitos producidos por <i>Bacillus spp</i> contra cepas de <i>Salmonella spp</i> y <i>Shigella spp</i>	49
6. RESULTADOS	50
6.1. Cultivo de las cepas empleadas en medios selectivos.	50
6.2 Tinción de Gram de cepas de <i>Salmonella spp</i>	52
6.3 Extracción de ADN genómico de las cepas empleadas.	52
6.4. Identificación de las cepas de <i>Salmonella spp</i> y <i>Shigella spp</i> mediante Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).	53
6.5 Determinación de la sensibilidad o resistencia a antibiótico en cepas de <i>Salmonella spp</i> y <i>Shigella spp</i>	54
6.6 Tinción de Gram de la Cepas de <i>Bacillus spp</i>	56
6.7 Observación de esporas en cepas de <i>Bacillus spp</i> mediante tinción con verde de malaquita.	57
6.8. Ensayos de antagonismo de los metabolitos producidos por <i>Bacillus spp</i> contra cepas de <i>Salmonella spp</i> y <i>Shigella spp</i>	58
7. Discusión.	60
8. Conclusiones.	64
9. Perspectivas.	65
10. Referencias.	66

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. imagen modificada de El experimento de Griffith	3
Figura 2. Clasificación de las bacterias en 18 filos basado en el análisis de las secuencias del gen que codifica para el ARN 16s.	13
Figura 3. Muestra la preparación de un cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> en el proceso de esporulación.	15
Figura 4. Ilustración 2 Representación gráfica de los mecanismos de entrada de <i>B. anthracis</i> .	20
Figura 5. Mecanismo de acción de <i>B. thuringiensis</i> : ingestión de la bacteria	25
Figura 6. Estructura de la Bacitracina A	30
Figura 7. Representación gráfica de la interacción de la tirocina con la membrana celular.	32
Figura 8. Cepas presuntivas de <i>Salmonella</i> en medio Agar SS.	51
Figura 9. Cepa Sh 1 presuntiva de <i>Shigella</i> spp en el medio de cultivo Agar SS.	51
Figura 10. Tinción de Gram de la cepa de <i>Salmonella</i> spp Sal 1.	52
Figura 11. Extracción de ADN genómico en cepas de <i>Salmonella</i> spp y <i>Shigella</i> spp.	53
Figura 12. Detección mediante PCR del gen ipaH (<i>Shigella</i> spp) y del gen Inv A (<i>Salmonella</i> spp).	54
Figura 13. Antibiograma de las cepas probadas.	56
Figura 14. Cultivo de cepas de <i>Bacillus subtilis</i> en medio TrisG.	56
Figura 15. Tinción de Gram de <i>Bacillus</i> spp cepa 49.1	57
Figura 16. Tinción con verde de Malaquita para la observación de esporas en <i>Bacillus</i> spp cepa 49.1.	58
Figura 17. Análisis del efecto antimicrobiano de los metabolitos de las cepas de <i>Bacillus</i> spp (49.1, 49.2 y 49.3) contra cepas de <i>Salmonella</i> spp.	59

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Pruebas bioquímicas para la identificación de <i>Bacillus</i> spp.	16
Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>Bacillus subtilis</i> .	18
Tabla 3. Antibióticos producidos por distintas especies del género <i>Bacillus</i> empleados en salud humana.	27
Tabla 4. Cepas del género <i>Bacillus subtilis</i> empleadas en esta investigación	42
Tabla 5. Cepas del género <i>Salmonella</i> empleadas	42
Tabla 6. Cepas del género <i>Shigella</i> spp empleadas	43
Tabla 7. Oligonúcleotidos empleados	47
Tabla 8. Características morfológicas de las cepas empleadas en medio de cultivo Agar SS	50
Tabla 9. Antibiogramas de las cepas empleadas en agar SS.	54

Resumen.

Actualmente, la resistencia microbiana es un problema mundial de salud pública, se estima que unas 700.000 personas mueren al año por infecciones causadas por microorganismos resistentes a los antibióticos.

Al respecto la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2020 emitió una lista de patógenos multirresistentes prioritarios, entre los que se encuentra *Salmonella spp* como una bacteria de prioridad elevada debido al aumento de la resistencia en *salmonella* no tifoidea en Latinoamérica. En febrero de 2022 la OMS informó sobre el aumento inusual de casos de infecciones causadas por *Shigella sonnei* multirresistente a los antibióticos. En este contexto es indispensable la búsqueda de alternativas que permitan inhibir el desarrollo de estos microorganismos resistentes a los antibióticos.

El género *Bacillus spp.* está constituido por un grupo de bacterias que poseen la capacidad de formar endosporas, cuando los nutrientes disponibles para su óptimo crecimiento son escasos. Este grupo es muy importante por la diversidad de metabolitos que produce, algunos de naturaleza antibiótica como la bacitracina y la polimixina.

En el presente se identificaron molecularmente cepas de *Salmonella spp* (Sal 1 y Sal 2) y *Shigella spp* (Sh 1 y Sh 2) aisladas previamente a partir de muestras de agua residual, para la identificación se amplificaron genes característicos de estas especies: en *Salmonella spp* se detectó por PCR el gen *InvA* y para *Shigella spp* se amplificó el gen que codifica para las proteínas antígeno del plásmido de invasión (*ipaH*). Posteriormente se realizaron ensayos de inhibición de estas cepas cuando fueron expuestas a metabolitos que son producidos por tres cepas del género *Bacillus* (49.1, 49.2 y 49.3) que previamente mostraron tener actividad antimicrobiana. La amplificación por PCR de los genes de interés confirmó la identificación de las cepas como pertenecientes al género *Salmonella* y *Shigella*. Los resultados de los ensayos de inhibición indicaron que existe un efecto inhibitorio de las cepas probadas contra estas bacterias patógenas.

Abstract.

Currently, microbial resistance is a global public health problem; it is estimated that about 700,000 people die each year from infections caused by microorganisms resistant to antibiotics. In this regard, the World Health Organization (WHO) in 2020 issued a list of priority multidrug-resistant pathogens, among which *Salmonella spp* is a high priority bacteria due to the increase in resistance in non-typhoid *Salmonella* in Latin America. In February 2022, the WHO reported on the unusual increase in cases of infections caused by multi-resistant *Shigella sonnei*. In this context, it is essential to search for alternatives that can inhibit the development of these antibiotic-resistant microorganisms.

The genus *Bacillus spp*. It is made up of a group of bacteria that have the ability to form endospores, when the nutrients available for optimal growth are scarce. This group is very important for the diversity of metabolites it produces, some of an antibiotic nature such as bacitracin and polymyxin. In this work, strains of *Salmonella spp* (Sal 1 and Sal 2) and *Shigella spp* (Sh 1 and Sh 2) previously isolated from wastewater samples were molecularly identified; for identification, characteristic genes of these species were amplified: in *Salmonella spp*, the *InvA* gene was detected by PCR and for *Shigella spp*, the gene that codes for the invasion plasmid antigen proteins (*ipaH*) was amplified. Subsequently, inhibition tests were carried out on these strains when they were exposed to metabolites that are produced by three strains of the *Bacillus* genus (49.1, 49.2 and 49.3) that were previously shown to have antimicrobial activity. PCR amplification of the genes of interest confirmed the identification of the strains as belonging to the genus *Salmonella* and *Shigella*. The results of the inhibition assays indicated that there is an inhibitory effect of the strains tested against these pathogenic.

Introducción.

Las bacterias son organismos unicelulares extraordinarios, se tratan de algunas de las primeras formas de vida en habitar la tierra primitiva y se estima que sean las últimas formas de vida que existan sobre la faz del planeta una vez que los organismos pluricelulares hayamos desaparecido de esta (Knoll et al., 2016).

Estos microorganismos cohabitan con otras especies de complejidad similar o mayor, como organismos pluricelulares, son parte del microbioma de la especie humana y las podemos hallar en cualquier sitio en el que miremos, algunas actúan en sinergia con nuestro organismo facilitando el metabolizar algunos alimentos, pero a la vez, muchas otras perjudican nuestra existencia (Mikoley, 2019).

En la actualidad muchos microorganismos patógenos son resistentes a los antibióticos. Esta resistencia es adquirida por las bacterias y es transmitida a las siguientes generaciones por diversos mecanismos. En el experimento que se describirá a continuación se ilustra un mecanismo llamado transformación a través del cual las bacterias son capaces de transmitir información genética y adquirir virulencia, este mecanismo también puede ser empleado por la bacterias para el desarrollo de la resistencia a antibioticos lo cual se discutirá a lo largo de este trabajo. En 1928, el bacteriólogo británico Frederick Griffith experimentó con cepas de *Streptococcus pneumoniae* mientras buscaba una vacuna contra la neumonía, notó que existían dos cepas distintas, una "lisa" y otra "rugosa".

En la Figura 1 se muestra el experimento de Frederick Griffith donde:

1. Cepa R: Presentaban bordes bien definidos y un aspecto rugoso (razón de la sigla R). Esta cepa no era virulenta, es decir, al inocular al ratón con la muestra, este no desarrollaba neumonía.
2. Cepa S: En esta cepa las bacterias forman colonia redondas y lisas (S es la abreviatura de 'Smooth' en inglés.) Estas bacterias están cubiertas por una capa de polisacáridos, que son producidos por las propias bacterias, esta capa les protege contra el sistema inmunitario del organismo al que invaden, ya que los antígenos no están expuestos en la superficie de la célula bacteriana, lo que dificulta su identificación. El ratón inyectado con esta cepa desarrollaba neumonía y por consiguiente moría.

Continuando con los experimentos, Griffith expuso las bacterias de la cepa S a altas temperaturas, lo que las condujo a la muerte. Posteriormente procedió a inocular al ratón con esta muestra, como era de esperarse, los ratones no desarrollaron la enfermedad.

Por último, Griffith tomó muestras de las bacterias muertas por calor de la cepa S, las mezcló con bacterias vivas de la cepa R y procedió a inocular a otro ratón con la mezcla de estas dos cepas. Para sorpresa del científico, en esta ocasión el ratón desarrollo neumonía y murió, al hacer un análisis de sangre del animal, encontró bacterias S vivas.

Griffith descubrió que las bacterias rugosas se habían "transformado" en "lisas" durante el proceso. A este mecanismo de transferencia de información lo conocemos actualmente como "transformación" (Mukherjee & Chamorro Mielke, 2017).

Se ha demostrado que este mecanismo es utilizado ampliamente por las bacterias (Randhawa & Sengar, 2021).

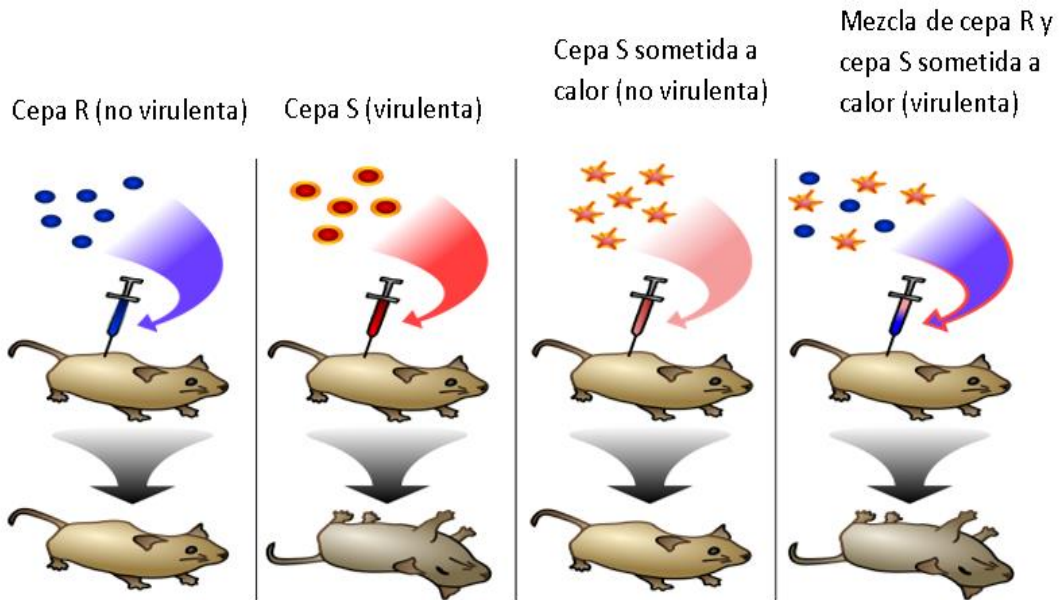


Figura1. Imagen modificada de *El experimento de Griffith* de Madboy74 (CC0/dominio público).

A esta forma de transferencia de información se le denomina horizontal, ya que la información pasa a bacterias que se encuentran en el medio circundante, cuando la información genética pasa de una bacteria madre a bacteria hija se conoce como transferencia vertical (San Millan & Maclean, 2019).

1.1 Mecanismos de transferencia de información genética de forma horizontal.

Los mecanismos de transferencia horizontal permiten a los microorganismos adquirir información genética de otros microorganismos presentes en el medio que lo rodea. Los mecanismos de transmisión de información se describen a continuación.

- 1) **Conjugación:** Proceso relevante en la transferencia de información genética en bacterias, ocurre entre una célula bacteriana donadora y otra receptora, la interacción se da de forma directa. Para que el

intercambio de información se pueda llevar a cabo es necesaria la interacción de las dos bacterias a través de estructuras de membrana como el pili conjugativo, a través de estos pueden pasar estructuras denominadas plásmidos, los cuales son moléculas de ADN circular de replicación autónoma son capaces de auto transmitirse entre células procariotas (Rozwandowicz et al., 2018).

- 2) Transformación: Anteriormente hemos descrito este proceso, con el experimento de Griffith. El mecanismo ocurre cuando la información genética se encuentra disuelta libremente en el medio en el que viven las bacterias, este material genético puede penetrar en alguna célula bacteriana si esta se encuentra en estado receptivo (Antibiotics, 2018).
- 3) Transducción: En este tipo de transferencia de información genética los bacteriófagos tienen un papel crucial, ya que son estos los que transportan los genes que luego se transferirán a las bacterias. Los bacteriófagos son virus que infectan únicamente a las bacterias (Burmeister, 2015).

1.2 Clasificación taxonómica de los microorganismos.

Inicialmente se identificaba dentro de cada reino cuatro niveles de categorías: clase, orden, género y especie. A la vez propuso un sistema de nomenclatura, en el cual cada organismo se define por dos términos: género y especie.

Esta clasificación no fue definitiva, conforme transcurrió el tiempo y la comprensión de la conformación biológica de los organismos avanzó, surgieron nuevas formas de ordenar a los seres que habitan la tierra. Por

ejemplo, el naturalista francés Jean-Baptiste Lamarck, fue quien propuso la distinción entre animales vertebrados e invertebrados (Vargas, 2012).

Todos los avances en la ciencia biológica permitieron una mejor comprensión de los organismos que habitan el planeta tierra, por lo que es importante clasificar a los seres vivos según sus características filogenéticas.

En 1923 se publicó por primera vez el manual de bacteriología sistémica de Bergey, el cual se utiliza específicamente para clasificar a las bacterias e identificar las distintas especies. Es un trabajo que tiene sus fundamentos en las reglas internacionales de la botánica.

En este manual, las clasificaciones se establecen según las características distintivas de cada especie, pero se consideran características filogenéticas según los resultados de los análisis de las secuencias de los genes que codifican para el ARN 16S y 5S. Actualmente, las bacterias se clasifican en 18 grupos, que se muestran en la Figura 2.

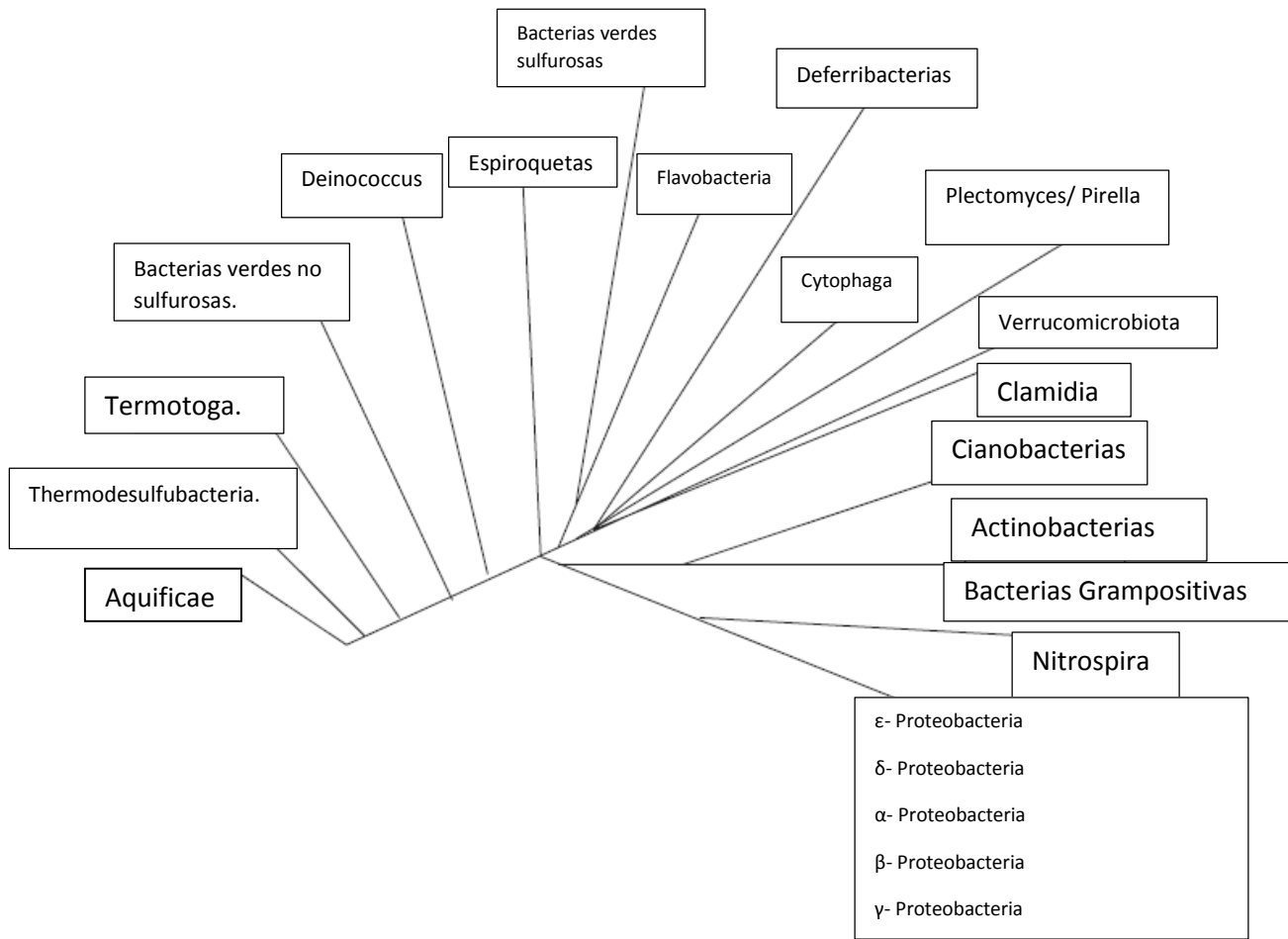


Figura 2. Clasificación de las bacterias en 18 filas basado en el análisis de las secuencias del gen que codifica para el ARN 16s.
Tomado de Madigan y Matinko 2006.

Otra de las entidades que se ha encargado de organizar de forma objetiva a las arqueas y bacterias es la revista *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. En dicha revista se publican la mayoría de las nuevas clasificaciones y se comparan con otras revistas de igual autoridad como *Systematic and Applied Microbiology* y *Archives of Microbiology* (Vargas, 2012).

1.3 Características del género *Bacillus*.

Se tratan de bacterias en forma de bastón (característica que les confiere el nombre), son Gram positivas, aerobios estrictos o anaerobios facultativos. Sus esporas pueden reflejar la luz, son refringentes y resisten altas temperaturas debido a su cubierta. Se les puede encontrar principalmente en suelo, agua y en organismos en descomposición; en laboratorio, sus condiciones óptimas de crecimiento son 37°C con un pH de 7 (Zeigler Daniel, 2008).

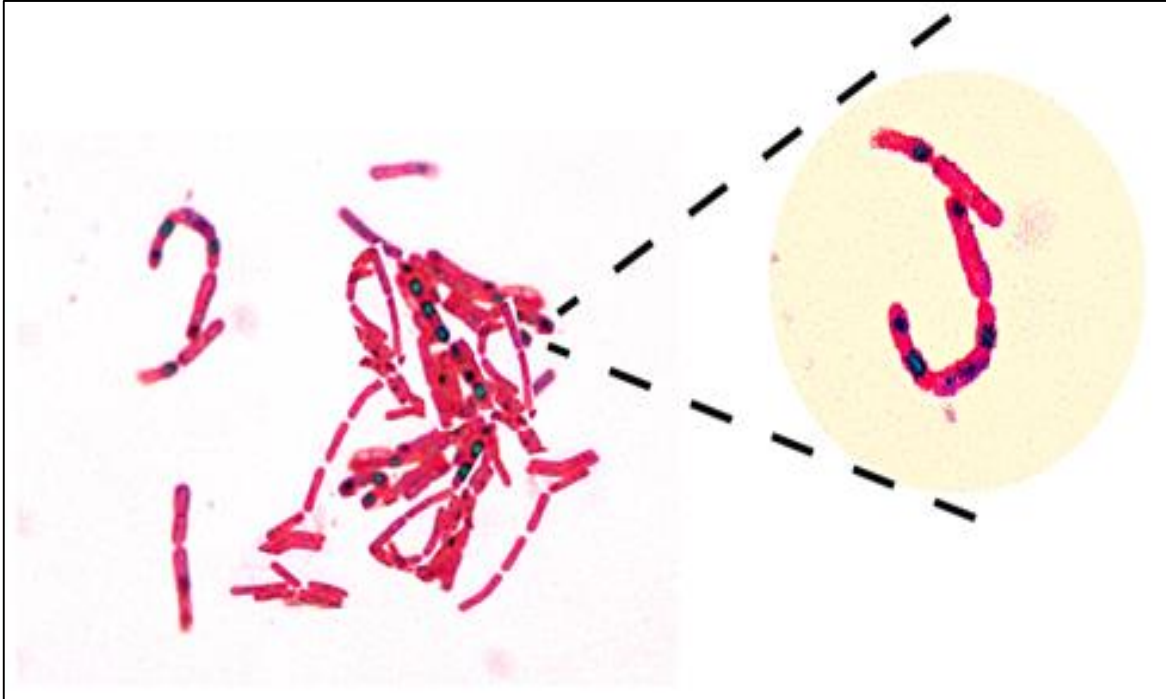
Los microorganismos de este género son considerados generalmente como inoocuos, *Bacillus subtilis* por ejemplo se encuentra dentro del grupo GRAS por sus siglas en inglés, lo que significa que es generalmente considerado seguro, por lo cual ha sido empleado como probiótico en la industria alimenticia para incrementar la producción y calidad de la leche en el ganado vacuno (Westers et al., 2004).

Este microorganismo suele encontrarse en el medio en forma de espora, esta estructura se desarrolla en un esporangio formado por dos compartimentos celulares: célula madre y espora. Este proceso consiste en diferentes etapas, conocidas como estadios. En el estadio 1: Son activados los genes involucrados en el inicio al proceso de esporulación. En este punto, el desarrollo de las endosporas puede interrumpirse si se añaden nutrientes en el medio de los microorganismos, por lo que se considera reversible. Durante el estadio 2 no obstante, una vez que inicia el proceso se vuelve irreversible y continua hasta que la espora se encuentra completamente formada (Soberón y Bravo, 2001).

La habilidad de formar endosporas cuando las condiciones del medio no son favorables permite su persistencia, por ejemplo, en ambientes en los que los nutrientes son escasos, o el agua no se encuentra disponible. La

esporulación es un proceso de diferenciación celular que se encuentra mediado por señales fisiológicas, ambientales, moléculas de señalización (Setlow, 2014).

En la figura 3 se muestran células vegetativas de *Bacillus subtilis* y la endospora en formación.



*Figura 3. Muestra la preparación de un cultivo de Bacillus subtilis en el proceso de esporulación. La muestra fue teñida con verde de malaquita, la célula vegetativa se encuentra teñida de rojo, mientras que la espora se observa de color verde.
Elaboración Propia.*

El género *Bacillus* comprende solo una fracción de los microorganismos que son capaces de producir endosporas, además está reportado en literatura su habilidad para producir diversos metabolitos secundarios de naturaleza antibiótica (Zaman et al., 2017).

1.4 Pruebas bioquímicas empleadas para la caracterización del género *Bacillus*.

Las pruebas bioquímicas se realizan determinando las características metabólicas de las bacterias, son los métodos de identificación bacteriana más empleados en los laboratorios.

Algunas de las pruebas bioquímicas de rutina son: Fermentación de carbohidratos, la prueba de rojo de metilo (la cual determina la capacidad de un microorganismo de fermentar glucosa), la prueba de lactosa en la que se determina la capacidad de los microorganismos para fermentar lactosa y diferenciar entre las enterobacterias y coliformes, la prueba de catalasa que permite distinguir a los microorganismos que cuentan con esta enzima y son capaces de descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno en comparación con los que carecen de ella, existen además otras pruebas como son la de movilidad en medio SIM en la que se determina la movilidad de los microorganismos y la producción de indol y sulfuro de hidrógeno.

Estas pruebas son muy útiles en el laboratorio porque reducen el tiempo de identificación de los microorganismos, son precisos y por lo tanto confiables, para la identificación de alguna especie bacteriana de interés (Techniques for Oral Microbiology , 2015).

Algunas de las pruebas bioquímicas empleadas para identificar bacterias pertenecientes al género *Bacillus* son las mostradas en la tabla 1:

Tabla 1. Pruebas bioquímicas para la identificación de *Bacillus spp.*

Prueba bioquímica.	Reacción
Oxidasa	Positivo
Catalasa	Positivo

Fermentación de glucosa	Positivo
Prueba en agar hierro triple azúcar	Positivo
Producción de lecitinasa	Positivo
Prueba de la hidrolisis del almidón	Positivo

Elaboración propia usando como fuente (Izurieta & Andrade, 2015) y (Jiménez et al., 2010).

1.5 Especies del género *Bacillus* de importancia en el área de la salud y el ambiente.

Este género comprende bacterias Gram positivas, usualmente halladas en suelo, también se pueden encontrar en el tracto digestivo de humanos y ganado, se ha usado para la producción de proteínas heterólogas, industrialmente han sido empleadas debido que producen una variedad de enzimas para degradar diversos sustratos (Su et al., 2020).

La presencia del género *Bacillus* en la biosfera es abundante, se podría decir que en todos los lugares que los microbiólogos han buscado nuevos microorganismos se han encontrado bacterias Gram positivas de este género (Zeigler Daniel, 2008).

Algunas de las especies de interés que incluye este género son las siguientes:

Bacillus subtilis.

Con respecto a su origen se comenta que, durante la segunda guerra mundial, los soldados de tropas de Alemania morían por disentería, causada principalmente por la bacteria *Shigella*, cuando se encontraban en el desierto del norte de África. El cuerpo médico notó algo peculiar, cuando las personas que vivían en esa zona se encontraban afectados por esta enfermedad recogían restos de excremento de los camellos y se lo comían.

Sorprendentemente a los pocos días se hallaban curados de la enfermedad. Los habitantes de esa localidad no sabían cómo o porque se curaban, sólo sabían que funcionaba, y lo habían hecho por cientos de años. Así que los médicos alemanes tomaron muestras del excremento y lo analizaron, al hacerlo aislaron a *Bacillus subtilis* (Philipp Dettmer, 2021).

Con este conocimiento, los médicos comenzaron a administrar dosis de estas bacterias a los soldados alemanes que se encontraban moribundos, consiguiendo que estos se curaran (Philipp Dettmer, 2021).

B. subtilis es una de las especies bacterianas que son aisladas con mayor frecuencia, su distribución en el ambiente es ubicua, lo cual está relacionado con su alta resistencia al frío, calor y desinfectantes comunes. Es un microorganismo modelo para el estudio de la división celular, secreción de proteínas, desarrollo de biopelículas, producción de metabolitos secundarios, intercambio de citoplasma a través de nanotubos intercelulares, se considera una especie esencial en la industria, biotecnología, ciencia básica y la medicina (Sapkota, 2022).

Esta especie ha sido empleada como un microorganismo modelo en estudios que se relacionan con la replicación del cromosoma bacteriano. En la tabla 2 se muestra la clasificación taxonómica de esta especie.

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Bacillus subtilis*.

Dominio.	Bacteria.
Filo.	Firmicutes.
Clase.	Bacili.
Orden.	Bacillales.
Familia.	Bacillaceae.
Género.	<i>Bacillus</i> .
Especie.	<i>B. subtilis</i>

Elaboración propia

Bacillus subtilis, fue la primera bacteria Gram positiva cuyo genoma fue secuenciado. El genoma completo contiene unos 4200 genes, de los que solo son esenciales 253 para realizar el cultivo en el laboratorio, esto significa que ese es el número mínimo de genes necesarios para que la bacteria tenga un desarrollo óptimo. Las propiedades antimicrobianas y antifúngicas son debidas a la bioactividad de los metabolitos secundarios que esta bacteria sintetiza, tales como surfactina y plipastatina. La surfactina es un lipopeptido que actúa irrumpiendo las membranas celulares al intercalarse en ellas, lo que conduce eventualmente a la muerte de la bacteria; la plipastatina es otro lipopéptido producido por *Bacillus subtilis* y se le conoce principalmente por sus propiedades antifúngicas (Kovács, 2019).

Bacillus anthracis.

B. anthracis es el microorganismo causante del ántrax, su descubrimiento se atribuye a Pasteur y Koch hacia finales del siglo XIX. A principios de 1876, Robert Koch aisló *Bacillus anthracis* de vacas y ovejas, las visualizó bajo el microscopio y lo que observó células transparentes y con forma de bastón. La bacteria también podía formar esporas redondas inactivas, altamente resistentes al calor o la desecación, a los cuales al adicionarse nutrientes se multiplicaban rápidamente. Koch tomó una pequeña muestra de sangre de las vacas infectadas con el bacilo, realizó una incisión en la cola de un ratón y lo inoculó con estas bacterias. El ratón desarrolló las lesiones típicas de la enfermedad conocida como ántrax. Al realizar una disección de estos animales, el bazo se observaba oscuro e inflamado con muchas células del tejido muertas, estas mismas lesiones se podían apreciar en el pulmón del animal. Cuando Koch analizó bajo microscopios los tejidos del modelo animal, observó los mismos microorganismos en forma de bastón (Mukherjee, 2022).

Existen tres vías de entrada de *B anthracis* al ser humano, las cuales son: cutánea, gastrointestinal y por vías respiratorias (Mock, M.; Fouet, 2001).

Para que la infección se pueda llevar a cabo, *B anthracis* debe cruzar las barreras epiteliales. La mayoría de los estudios reportados se refieren a infecciones en las vías respiratorias. En cuanto a la formas en como *B. anthracis* puede lograr ingresar al organismo hospedero son mediante: un corte en la piel, consumo de carne contaminada con el microorganismo o a través la inhalación de esporas que se encuentran dispersas en el aire(Goossens & Tournier, 2015).

Recientemente se ha descrito una cuarta forma de entrada, que se ha denominado ántrax por inyección, en la cual la bacteria entra al hospedero por los piquetes de agujas, por ejemplo, en personas que consumen heroína (Hicks et al., 2012).

Los mecanismos de entrada de *B. anthracis* se muestran en la figura 4.

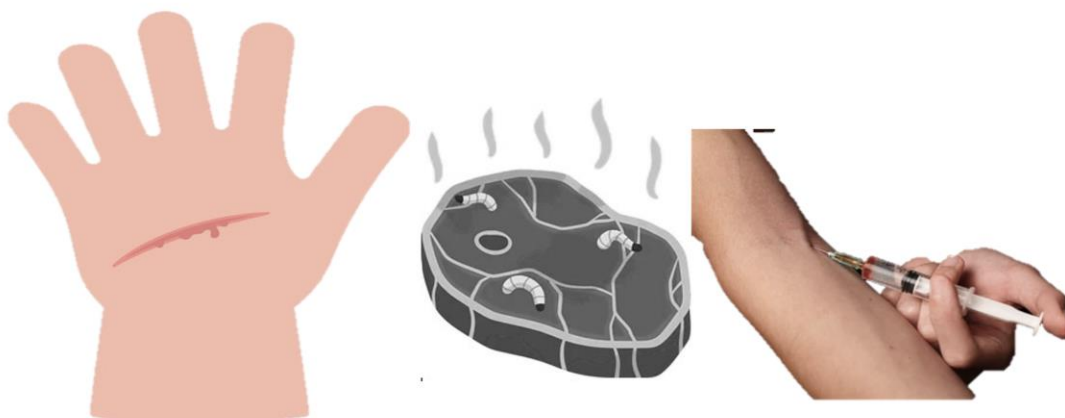


Figura 4. Representación gráfica de los mecanismos de entrada de *B. anthracis*.

a) Vía cutánea b) Alimentos contaminados. C) Objetos punzocortantes.

Elaboración propia.

B anthracis ingresa al hospedero en forma de esporas, como se ha mencionado, estas estructuras son la forma inactiva de la bacteria. Cuando reciben señales que indican que el medio en el que se encuentran es favorable para su proliferación, se rehidratan, reanudan la actividad metabólica, germinando y cambiando a la forma activa o célula vegetativa (Ross, 1957).

La patogenicidad de *B anthracis* depende principalmente de dos factores de virulencia: Toxinas y una capsula de poli- γ - δ - glutamato. Las toxinas actúan interfiriendo en el proceso de señalización de las células del huésped y la capsula evade el sistema inmunológico (Candela & Fouet, 2006).

De acuerdo con Lowe, et al., 2013, no se conoce cuál es el número de esporas necesarias para cruzar la barrera epitelial y comenzar la infección, estas son capaces de reactivarse en cuanto las condiciones del medio sean favorables (Lowe et al., 2013).

Cuando las esporas ingresan en el organismo, la bacteria se reactiva y comienzan a liberar toxinas, se ha reportado que el efecto principal de estas toxinas es la supresión del sistema inmunológico y la muerte de las células del hospedero (S. Liu et al., 2014).

Grupo *Bacillus cereus*.

El grupo *Bacillus cereus* comprende las siguientes especies: *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides* y *B anthracis*. Recientemente se ha añadido la bacteria *Bacillus weihenstephanensis* (Lechner et al., 1998).

La especie *Bacillus cereus* son bacterias Gram positiva, capaces de formar esporas, aerobios o anaerobios facultativos, poseen forma de bastón, ampliamente distribuidos en la naturaleza y se encuentra estrechamente

relacionada de forma fenotípica y genotípica con otras especies del género *Bacillus*, especialmente con *B anthracis* (Ashy et al., 1991).

B. cereus y *B. thuringiensis* son especies prácticamente idénticas, las diferencias radican en los plásmidos y los genes cry (sólo presentes en *B thuringiensis*). Las enterotoxinas que producen ambas especies son las mismas. Se ha reportado que *B. cereus* es responsable de intoxicaciones alimentarias; la diarreica y la emética, siendo una enterotoxina y toxina emética respectivamente, las causantes de estas afecciones (Jackson et al., 1995).

Algunas cepas de *B. cereus* han sido consideradas benéficas y han sido utilizadas como probióticos (*Properties of the Bacillus Cereus Strain Used in Probiotic CenBiot*, 2016).

Los reservorios naturales para esta especie son: materia orgánica en descomposición, cuerpos de agua y fómites (Jensen et al., 2003).

Las esporas germinan una vez que entran en contacto con materia orgánica o bien en un organismo rico en nutrientes y por lo tanto apto para su proliferación (Arnesen et al., 2008).

Patogénesis: La patogenicidad de *B. cereus*, ya sea intestinal o no intestinal se presenta debido a que estos microorganismos tienen la capacidad de producir exoenzimas destructoras de tejidos (Granum, 1994).

Dado que *B. cereus* se encuentra ampliamente distribuida en el ambiente, se ha hallado desde 1988 que son causa de enfermedades nosocomiales a personas con un sistema inmunológico deprimido (Richard et al., 1988).

Paenibacillus polymyxa.

Anteriormente, a esta especie se le conocía como *Bacillus polymyxa*, se consideraba en el género *Bacillus* debido a sus características fenotípicas, como lo son la forma de bastón y la formación de endosporas. Esto cambió cuando en 1993, Ash y colaboradores demostraron mediante técnicas comparativas de ARN ribosómico 16S, que esta bacteria que se conocía como *B. polymyxa* pertenecía a un género diferente, al cual se denominó *Paenibacillus polymyxa*. Se le otorgó este nombre a partir de la raíz en latín *Paene*: casi o parecido; el género de la bacteria *Bacillus*, por consiguiente, *Paenibacillus* significa "casi un bacilo", puesto que deriva de dicho género de bacterias, no obstante, es filogenéticamente diferente (Ash et al., 1993).

Fenotípicamente, las especies que se agrupan en *Paenibacillus* reaccionan débilmente a la tinción de Gram, siendo en los cultivos más jóvenes donde aparentan no reaccionar a la tinción de Gram. Distintas cepas de *P. polymyxa* han sido capaces de generar enzimas degradadoras de la pared celular, tales como β -1-3 glucanasas, celulasas, quitinasas, proteasas y xy lanasa (Lal & Tabacchioni, 2009).

P. polymyxa se encuentra naturalmente en diversos sitios, tales como son: suelos y en la rizosfera de diferentes cultivos (Guemouri-athmani et al., 2000).

De acuerdo con un estudio llevado a cabo por Zengguo, et. al., 2023, Se demostró con una cepa de *Paenibacillus polymyxa* es capaz de coproducir dos antibióticos, la polimixina E1 y otro compuesto, un péptido antimicrobiano denominado paenibacilina, el cual se caracterizó como un lantibiótico. La polimixina E1 tuvo actividad contra bacterias Gram negativas, en cuanto al lantibiótico se observó actividad hacia bacterias Gram positivas (He et al., 2007).

Bacillus thuringiensis.

Es un bacilo Gram positivo, sus dimensiones son de 3 a 5 μm de largo por 1 a 2 μm de ancho. Posee la característica de producir esporas (de igual forma que las demás bacterias del mismo género). Se trata de un microorganismo principalmente aerobio y anaerobio facultativo, con actividad de catalasa positivo. Tiene la capacidad de fermentar glucosa, fructosa, trealosa, maltosa y ribosa (Sauka & Benintende, 2008).

Esta bacteria se encuentra naturalmente en el suelo, pertenece al grupo *Bacillus cereus* y su principal uso es como bioinsecticida en los cultivos. Se distingue de las otras bacterias del mismo grupo, por el hecho de poseer estructuras cristalinas de naturaleza proteica con actividad entomopatogena conocidas como toxinas Cry (del inglés Crystal) y Citolitica (Cyt). Las toxinas Cry son muy diversas y atacan principalmente a insectos del orden Lepidoptera, Diptera y Coleoptera, mientras que las tóxicas Cyt se hallan principalmente en cepas que tienen actividad contra Dípteros. Un hecho importante en la biotecnología fue la incorporación a través de ingeniería genética de los genes *Cry* en plantas, por lo que estas plantas modificadas genéticamente (cultivos Bt) son capaces de producir por ellas mismas las toxinas que les confieran protección contra las plagas (Lagadic et al., 2014).

Las toxinas producidas por *B thuringiensis* son específicas contra ciertas especies de insectos, pero no son dañinos para los seres humanos u otros organismos (Bravo et al., 2011).

El grupo más grande de proteínas Cry que existe es el grupo de la familia 3D, de las cuales existen más de 50 grupos diferentes. Las distintas proteínas de este grupo poseen una estructura similar, lo cual sugiere que tengan un mecanismo de acción acorde. El mecanismo de acción de estas proteínas

es altamente específico, se muestra en la figura 5 y está integrado por las siguientes etapas (Bravo et al., 2011, Schünemann et al., 2014):

- 1) Solubilización de los cristales en condiciones de pH alcalino para la liberación de la protoxina
- 2) Activación de las proteínas, para ser activa debe sufrir proteólisis por parte de las enzimas proteolíticas del intestino de los insectos
- 3) Unión a receptores específicos en las microvellosidades de las células intestinales, esta unión se ha reportado que es irreversible.
- 4) Formación del poro, las proteínas activas unidas a las células intestinales, se oligomerizan y forman poros en la membrana, disruptiendo el tejido y alterando el equilibrio osmótico
- 5) Lisis celular, ocasionada por la entrada y salida de material, además de ocurrir una infección generalizada (sepsis) que conduce a la muerte.

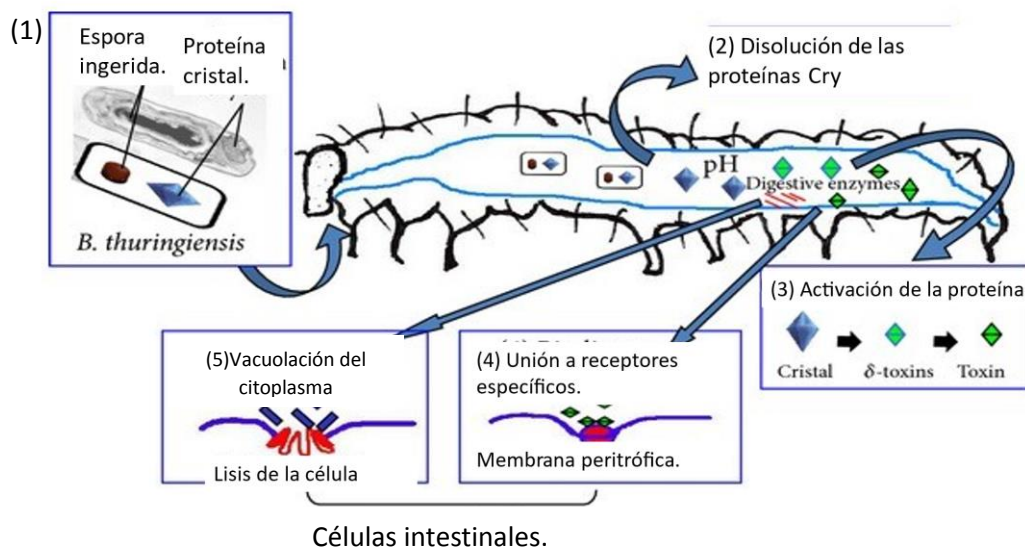


Figura 5. Mecanismo de acción de *B. thuringiensis*: ingesta de la bacteria (1); solubilización de los cristales (2); activación de la proteína (3); unión de las proteínas a los receptores (4); formación del poro en la membrana y lisis de la célula (5). Imagen modificada en base a la referencia (Schünemann et al., 2020).

Las toxinas que *Bacillus thuringiensis* produce y son efectivas contra insectos, son de los metabolitos más estudiados de este microorganismo, además *B. thuringiensis* es capaz de sintetizar otras sustancias con cualidades antimicrobianas, especialmente nos referimos a las bacteriocinas. Estas estructuras son péptidos pequeños, formados por unos 12 a 70 aminoácidos, poseen actividad antibiótica y sintetizados por organismos procariontes. Se ha hallado que estas bacteriocinas son eficaces tanto para bacterias Gram positivas como para las Gram negativas (Salazar-marroqui et al., 2016).

1.6 Metabolitos de importancia en la salud producidos por el género *Bacillus*

Los compuestos antibióticos producidos por este género se pueden clasificar en dos tipos: Los sintetizados mediante ribosomas, que son péptidos, incluyen a las bacteriocinas y los de síntesis no ribosomal que comprenden pequeños péptidos sintetizados enzimáticamente. Algunos ejemplos de antibióticos producidos de forma ribosomal son los lantibióticos, los cuales se encuentran modificados con aminoácidos no estándar como la lantionina, esto refuerza la actividad antimicrobiana. Es importante aclarar que estos antibióticos no suelen ser tan comunes en el mercado de antibióticos médicos, dado que son más utilizados en la industria alimentaria. Entre los antibióticos no ribosomales podemos encontrar Penicilina, vancomicina, daptomicina (Rukmini et al., 2015).

Existen diversas especies del género *Bacillus* capaces de producir una diversidad de metabolitos con propiedades antimicrobianas que proporcionan beneficios a la salud humana (Zeigler Daniel, 2008).

La investigación en este campo es de suma importancia, ya que, con el paso del tiempo y el uso indiscriminado de los antibióticos, las bacterias

patógenas han evolucionado y adquirido genes de resistencia que les permiten contrarrestar los efectos de los antibióticos disponibles; si esto continúa, en algunos años será extremadamente complicado hallar algún fármaco efectivo para contrarrestar a las bacterias patógenas multirresistentes causantes de enfermedades en los humanos (Abebe et al., 2016).

En la tabla 3 se muestran algunos de los principales productos del metabolismo de estos microorganismos.

Tabla 3. Antibióticos producidos por distintas especies del género *Bacillus* que son usados en salud humana.

Antibiótico producido	Uso contra	Especies del género <i>Bacillus</i>	Referencias
Bacitracina	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Pantoea ananatis</i> , <i>Bacillus cereus</i> .	<i>B. licheniformis</i>	(Rukmini M, Sahoo D, Dalei J, 2015)
Gramicidina	Bacterias gram positivas y ciertas bacterias Gram negativas.	<i>Brevibacillus brevis</i>	(Kaman WE, Nazmi K, Voskamp-Visser AI, 2022)
Tyrocidina	<i>Salmonella typhi</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , bacterias Gram positivas.	<i>B. brevis</i>	(Jibao Zhu et al., 2021)
Subtilina	<i>Listeria monocytogene</i> , Bacterias Gram positivas y Gram negativas.	<i>B. subtilis</i>	(Halami, 2019)
Polimixina	Bacterias Gram negativas.	<i>P. polymyxa</i>	(Stoica et al., 2019)
Edeína	<i>Conidia sp.</i> , Bacterias Gram positivas y Gram negativas	<i>B. brevis</i>	(Johnson ET, Bowman MJ, 2020)
Butirosina	Bacterias Gram negativas, moho y levaduras.	<i>B. circulans</i>	(Pournajati R, Gust R, 2019)

Elaboración propia

Es de suma relevancia los continuos trabajos en investigación científica en el área de la salud, en especial en la búsqueda de nuevos antibióticos, ya que, hasta el momento, no se conocen agentes antimicrobianos a los cuales las bacterias no hayan sido capaces de desarrollar resistencia, con excepción quizá de péptidos antibacterianos que son producidos normalmente por el sistema inmunológico (Henriques Normark & Normark, 2002).

Estos péptidos antimicrobianos son un producto de la evolución, se encuentran distribuidos ampliamente en plantas y animales, lo que sugiere que han tenido un papel fundamental en el éxito de la evolución de organismos multicelulares complejos. El principio estructural de estos péptidos es la habilidad de las moléculas de adoptar una forma en la que grupos de aminoácidos hidrofóbicos y catiónicos están organizados especialmente en ciertos sectores de la molécula, con un diseño anfipático. Un modelo que explica la actividad de los péptidos antimicrobianos es el Shai-Matsuzaki-Huang o SMH. Este modelo propone la interacción del péptido con la membrana, seguido del desplazamiento de lípidos, alteración de la estructura de la membrana y en algunos casos, el péptido accede al interior de la célula objetivo (Zaslhoff, 2002).

A continuación, se describen algunos de los antibióticos que son producidos por el género *Bacillus*.

Bacitracina.

En el año de 1943 se aisló un bacilo aerobio esporulado Gram positivo de una fractura de tibia expuesta de los tejidos necrosados que padecía una niña de nombre Margaret Tracey (de ahí el nombre bacitracina). Se halló que producía una sustancia antibiótica que funcionaba como

bacteriostático en un gran número de microorganismos. Se comenzaron a hacer pruebas en ratones, inoculándole dosis mínimas letales de agentes bacterianos (estreptococo hemolítico) y se demostró que la bacitracina evitaba el crecimiento de estos patógenos (William & Daniel, 1982).

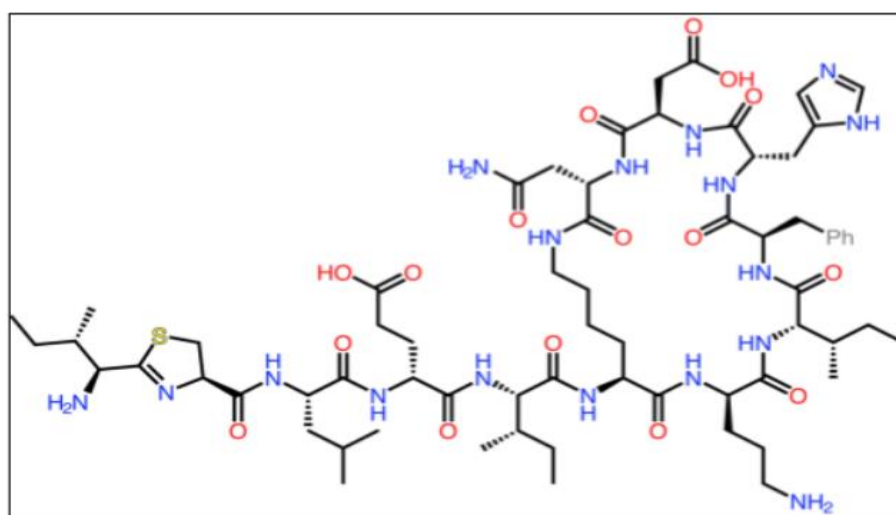
Los péptidos que conforman al fármaco bacitracina fueron descubiertos e identificados por primera vez en 1945 como un producto de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus subtilis*, desde entonces se ha realizado un gran esfuerzo con el objeto de comprender los mecanismos de acción del antibiótico. La bacitracina posee una estructura única, con péptidos que no se suelen encontrar normalmente en proteínas. La biosíntesis de este antibiótico se da por la bacitracina sintetasa, el cual es un complejo multienzimático, la síntesis de este metabolito se presenta en las etapas de crecimiento exponencial tempranas y se estabilizan en la fase estacionaria (William & Daniel, 1982).

Se ha reportado de igual forma que la bacitracina presenta actividad contra un gran número de bacterias Gram positivas, no obstante, su efecto es menor en bacterias Gram negativas (William & Daniel, 1982).

La bacitracina purificada, es una forma concentrada y refinada del antibiótico bacitracina, después de obtener el antibiótico del medio de fermentación, se somete a un proceso de purificación para eliminar impurezas y compuestos no deseados. Este compuesto contiene al menos 10 diferentes dodecapéptidos que son similares, la única distinción radica en uno o dos aminoácidos. La bacitracina purificada se presenta como una mezcla de variantes de péptidos con propiedades antimicrobianas. Dentro de estas variantes, la estructura que se encuentra mejor descrita es la Bacitracina A. La síntesis de este antibiótico es de forma no ribosomal, mediante un gran complejo enzimático (Konzl et al., 1997).

La estructura de la bacitracina la conforma un ciclo péptido que está compuesto por diferentes aminoácidos, entre los que destacan L- histidina, L- aspargina, L-lisina, D-ornitina, D-aspartato, D-fenilalanina, D-glutamato, entre algunos más. Entre los diferentes péptidos que existen de la bacitracina, la que mejor desempeño ha presentado en cuanto a actividad biológica, ha sido la Bacitracina A. Este compuesto posee un amplio espectro antimicrobiano, una tasa de excreción rápida, y funciona restringiendo la síntesis de la pared celular en la mayoría de las bacterias Gram positivas y en algunas de las bacterias Gram negativas (Jiang Zhu et al., 2023).

En la figura 6 se muestra la estructura de la bacitracina A.



*Figura 5. Estructura de la bacitracina A.
Elaboración propia.*

La bacitracina es usada como agente antiinfeccioso en una variedad de preparaciones farmacéuticas, incluyendo aerosoles, lociones tópicas, ungüentos y cremas para piel (Jiang Zhu et al., 2023).

Gramicidina.

El fármaco conocido Gramicidina está compuesto por varios péptidos, es decir es un polipéptido, es similar a la bacitracina y a la polimixina. Este antibiótico, aunado a la tirocidina en una proporción de 20/80 compone el fármaco firotricina, la cual se obtiene de *Bacillus brevis*. Este compuesto es activo contra bacterias Gram negativas. Se suele usar como antibiótico tópico junto a otros antimicrobianos (Herrell & Heilman, 1941).

Tirocidina.

La tirocidina A-D junto con gramicidina en una mezcla, fue el primer péptido antibiótico que se usó de forma clínica para combatir infecciones tópicas. Estos péptidos son obtenidos por *Bacillus brevis*. La tirocidina tiene la propiedad de poder interactuar con la membrana bacteriana esto debido a su naturaleza anfifílica (Jibao Zhu et al., 2021).

La estructura anfipática del dímero tirocidina sugiere un modelo de como la molécula interactúa con la membrana, en el modelo, la cara convexa hidrofóbica se inserta en la membrana orientándose hacia el interior de la bicapa, en tanto que el lado polar cóncavo se orienta hacia la fase acuosa (Loll et al., 2014).

En la figura 7 se muestra la interacción de la tirocidina con la membrana celular.

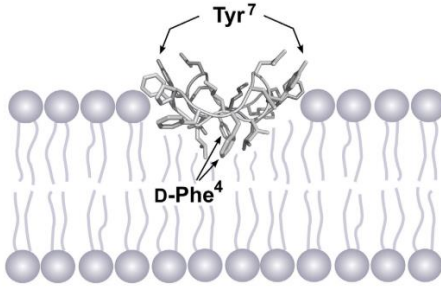


Figura 7. Representación gráfica de la interacción de la tirocina con la membrana celular.
Tomado de Loll et al., 2014.

El mecanismo exacto sobre como la tirocidina mata bacterias no se tiene del todo dilucidado, no obstante, se asume que las tirocidinas permean la membrana bacteriana (Zaitseva et al., 2018).

Subtilina.

La subtilina es una variante natural de la bacteriocina nisin, se ha usado para realizar diversos estudios genéticos y moleculares, en la investigación de los mecanismos biosintéticos de los antibióticos pentacíclicos de clase 1. Existen algunas variantes de la subtilina, las cuales son la entianina y la ericina, debido a que su estructura es bastante similar se consideran lantibióticos parecidos a subtilina. Exhiben actividad principalmente contra bacterias Gram positivas. Los lantibióticos son una clase especializada de péptidos antimicrobianos, que son producidos principalmente por bacterias Gram positivas, su nombre se debe a su estructura molecular, ya que contienen aminoácidos modificados como la lantionina y la metil-lantionina, estas modificaciones estructurales le confieren la capacidad de unirse de forma específica a las membranas bacterianas o interferir en procesos celulares esenciales (Halami, 2019).

Se halló que la ericina se produce en *Bacillus subtilis*, son dos variantes de lantibióticos parecidos a la subtilina: ericina S y ericina A (Stein et al., 2002).

La subtilina muestra actividad antibiótica en el rango nano molar contra un amplio espectro de bacterias Gram positivas. La actividad antibacteriana ocurre por la permeabilización de la membrana citoplasmática de bacterias sensibles (Parisot et al., 2008).

Polimixina.

Desde la década de 1970, los antibióticos como la polimixina dejaron de administrarse en personas por la nefrotoxicidad y neurotoxicidad, sin embargo en los últimos años se han vuelto a usar como último recurso contra microorganismos multirresistentes (Lenhard et al., 2019).

Las polimixinas son la colistina (polimixina E) y polimixina B, son antibióticos constituidos por múltiples péptidos, que funcionan alterando la membrana celular de la bacteria, neutralizan la toxicidad del microorganismo y provocan su muerte. La colistina es la forma más usada de las polimixinas (Bergen et al., 2012).

Edeína.

La edeína es un antibiótico pentapéptido lineal, es obtenido a partir de *Bacillus brevis*, una de sus características es que posee actividad de amplio espectro. Su mecanismo de acción se basa en inhibir la síntesis del ADN, ARN y ribosomas bacteriano (Q. Liu et al., 2022).

Dado que las edeínas son péptidos antibacteriales no son sintetizados por los ribosomas, sino por un complejo multifuncional enzimático, mediante el mecanismo de la polimerasa de azufre. Entre otras de las funciones de la

edeína se encuentra la capacidad de eliminar la resistencia bacteriana causada por plásmidos al inhibir la división de *Bacillus subtilis* (Du et al., 2022).

Butirosina.

La butirosina es un antibiótico aminoglucósidos, posee la característica de inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Una de las cualidades principales que este antibiótico posee es su actividad contra la especie *Pseudomonas aeruginosa* (Heifetz et al., 1972).

En la familia de los antibióticos del grupo de los aminoglucósidos, también se incluyen antibióticos como kanamicina, neomicina y gentamicina (Lanz & Booker, 2012).

1.7 El problema de la resistencia a los antibióticos comerciales y los nuevos retos.

En el planeta, mueren aproximadamente 700 mil personas al año a causa de una infección provocada por microorganismos resistentes a tratamientos de primera elección. Se estima que esta cifra llegue a ser de 10 millones por año para 2050 (Olguín Michel, 2021).

Los cambios en el genoma que permiten a los microorganismos volverse resistentes a los antibióticos se han presentado gradualmente desde que se administró por primera vez a un paciente un compuesto con efecto antimicrobiano.

La forma en que este proceso ocurre es debido a que el genoma de las bacterias sufre mutaciones, y en algunos casos, éstas le confieren al organismo características que le permiten adaptarse mejor al ambiente, e

incrementar sus posibilidades de supervivencia y reproducción (Hershberg & Petrov, 2010).

Los tipos de resistencia bacteriana se dividen en 3 tipos principales.

Resistencia natural o intrínseca: Las bacterias de una especie con resistencia intrínseca son naturalmente insensibles a ciertos antibióticos debido a sus características estructurales o funcionales.

Resistencia adquirida: Ocurre cuando una bacteria originalmente susceptible al efecto de un antibiótico, desarrolla resistencia mediante mutaciones o a través de la adquisición de genes de resistencia de otras bacterias.

Resistencia adaptativa: Es una respuesta temporal y reversible, es un tipo de resistencia menos estable y no implica cambios permanentes en el material genético (Giedraitiene et al., 2011)

Las mutaciones ocurren de forma aleatoria, y algunas de ellas pueden conferir a los microorganismos la capacidad de sobrevivir ante la exposición a los antibióticos o a ciertos agentes, que en condiciones habituales le provocarían la muerte. Estas nuevas cualidades se pueden transferir verticalmente a las siguientes generaciones entre las células madre y las descendientes o a través de los mecanismos de transferencia horizontal entre los microorganismos que se encuentren en el mismo entorno (Mukherjee & Chamorro Mielke, 2017).

Esto no es algo reciente, ya que se considera que desde que Alexander Fleming descubrió la penicilina en 1928 alertaba los peligros que podría traer el uso indiscriminado de este fármaco (Fleming, 1945).

En 1940, doce años después del descubrimiento de la penicilina, pero unos años antes de que se usara terapéuticamente, dos miembros del equipo hallaron una penicilinasas bacteriana, una enzima que degrada el fármaco,

inhibiendo sus efectos, por lo que desde esas fechas los microorganismos ya mostraban un comportamiento adaptativo (Davies, 1996).

El problema de la resistencia a los antibióticos no solo es el resultado de la automedicación, la falta de conocimiento del uso adecuado de estos, o el uso indiscriminado por parte del personal de salud en hospitales, también se debe al empleo indiscriminado de estos en prácticas como en la ganadería (Arenas & Melo, 2018). Tomemos por ejemplo el caso de la ganadería, tan solo en Estados Unidos de América, el 80% de los antibióticos que se venden son destinados para su uso en el ganado, esto con el fin de incrementar el rendimiento de la producción, mejorar la salud de estos animales y estimular su crecimiento (Elliott, 2015).

Thomas P. van Boeckel, Ramanan Laxminarayan y colegas en 2010 dieron estimaciones aproximadas del consumo global de antimicrobianos usados en agricultura. Usando proyecciones del rápido consumo de productos de origen animal, principalmente en países en vías de desarrollo. Los autores usaron modelos estadísticos en donde combinaron datos de “densidad del ganado, proyecciones de la demanda de productos cárnicos y estimaciones de la demanda de consumo de antimicrobianos por países desarrollados para hacer el mapeo del uso de antibióticos en el ganado (Boeckel et al., 2015).

En el 2010 Thomas P. van Boeckel, Ramanan Laxminarayan y colegas estimaron que los cinco países que más consumieron antimicrobianos para su uso en el ganado fueron: China, Estados Unidos de América, Brasil, India y Alemania. Para el año 2030 se estima que México desplazará a Alemania como el quinto país que más antibióticos consuma para su uso en el ganado (Boeckel et al., 2015).

En el ámbito del empleo de antibióticos en la ganadería los microorganismos resistentes a estos pueden transmitir los genes de resistencia a las siguientes

generaciones (Van Boeckel et al., 2015; Denamur & Matic, 2006), estos microorganismos se pueden incorporar a la cadena alimenticia y llegar al consumidor final en los productos que se venden en supermercados.

Por lo anteriormente planteado con respecto a la resistencia de las bacterias a los antibióticos es de suma relevancia realizar investigación en la búsqueda de nuevos antibióticos eficaces en el tratamiento de bacterias patógenas que causan enfermedades, algunas de ellas incluso pueden conducir a la muerte en el ambiente intrahospitalario o son de alta prioridad debido a su multiresistencia a los antibióticos comerciales (Denamur & Matic, 2006).

Para adquirir estos genes, las bacterias emplean los mecanismos descritos anteriormente: transformación, conjugación y transducción, que permiten intercambiar información genética horizontalmente a diferencia de los eucariotas, que solo pueden adquirir genes verticalmente (Giedraitiene, Agne, et al, 2011).

Esto permite que el flujo de genes ocurra de forma más rápida, y a la vez admite la transferencia de genes que pueden resultar ventajosos para la supervivencia, las bacterias circundantes (Hogan & Kolter, 2002).

El organismo de salud pública internacional más importante del mundo, la Organización Mundial de la Salud, ha alertado acerca de los peligros que implican las bacterias multiresistentes a antibióticos. A juicio del Dr. Tedros Adhanom Ghebreyesus, director general de la OMS:

“La resistencia a los antimicrobianos es una emergencia para la salud mundial que comprometerá gravemente el avance de la medicina moderna. Hay una necesidad urgente de aumentar la inversión en investigación y desarrollo para luchar con las infecciones resistentes a los antibióticos, entre ellas la tuberculosis. De otro modo, volveremos a los

tiempos en que la gente temía contraer infecciones habituales y ponía en riesgo su vida si se sometía a intervenciones quirúrgicas sencillas" (Organización Mundial de la Salud, 2017).

Este reto que enfrenta la humanidad se complica por diversas razones: la necesidad de investigar suficiente en el área, la escasez de financiamiento de las grandes farmacéuticas, que se enfocan en desarrollar fármacos que generen mayores ganancias. Los lugares donde se realiza investigación en desarrollo de nuevos antibióticos son principalmente las universidades (Forward, 2023).

1.8 Mecanismos de acción de los antibióticos.

El tratamiento prescrito para inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos ha sido principalmente con el empleo de antibióticos que inhiban la proliferación de los patógenos, que destruyan su pared celular o que alteren la síntesis de su ADN o proteínas, también se han empleados métodos experimentales como es el uso de fagos para el combate de microorganismos patógenos (Ganewatta et al., 2017).

Los antibióticos pueden ser clasificados con base en su mecanismo de acción o cómo actúan al matar a las bacterias o inhibiendo su proliferación (Kohanski et al., 2010).

Clasificación en función de su efecto

- 1) Bacteriostático: Suprime el crecimiento de las bacterias (las mantiene en la fase estacionaria de crecimiento)
- 2) Bactericida: Mata a las bacterias (Bernatová et al., 2013).

2. Objetivo General.

Determinación del potencial antimicrobiano de cepas de *Bacillus* spp contra bacterias patógenas del género *Salmonella* spp y *Shigella* spp.

2.1. Objetivos particulares:

Identificar cepas de *Salmonella* spp mediante la amplificación por PCR del gen *InvA*.

Identificar cepas de *Shigella* spp mediante la amplificación por PCR del gen *ipaH*.

Determinar la actividad antimicrobiana de cepas de *Bacillus* spp contra cepas de *Salmonella* spp y *Shigella* spp.

3. Justificación del proyecto.

La resistencia a los antimicrobianos es una problemática a nivel mundial, en 2024 la OMS ha actualizado la lista de patógenos bacterianos prioritarios, integrada por 15 familias de bacterias resistentes, las cuales se clasifican en prioridad crítica, alta y media de acuerdo con su resistencia a los antibióticos y la necesidad del desarrollo de tratamientos eficaces. En el grupo de prioridad alta se encuentran *Salmonella spp* y *Shigela spp*, las cuales, en países en vías de desarrollo y de bajos recursos, tienen una morbimortalidad importante. Por lo anterior mencionado es necesario realizar investigaciones que nos ayuden a encontrar nuevos fármacos para enfrentar esta crisis. En este trabajo se propone investigar el efecto antimicrobiano de los metabolitos producidos por cepas de *Bacillus spp* en cepas de *Salmonella spp* y *Shigela spp*, esto debido a que el género *Bacillus* ha sido ampliamente reportado como productor de una variedad de metabolitos de naturaleza antibiótica y previamente en el laboratorio se demostró su capacidad como antifúngico.

4. Hipótesis.

Los metabolitos producidos por las cepas 49.1 , 49,2 y 49.3 del género *Bacillus* tienen capacidad antimicrobiana contra cepas del género *Salmonella spp* y *Shigella spp*.

5. Materiales y métodos.

5.1 Cepas empleadas en esta investigación:

Las cepas del *Bacillus spp* empleadas en esta investigación pertenecen a la colección de cepas aisladas de la rizósfera de planta medicinal del Laboratorio de Microbiología 402 del EMA-6. (Tabla 4).

Tabla 4. Cepas del género *Bacillus spp* empleadas en esta investigación

Cepa	Origen	Referencia
<i>Bacillus spp</i> 49.1	Rizósfera de planta medicinal	Cepario del Laboratorio 402 EMA-6
<i>Bacillus spp</i> 49.2	Rizósfera de planta medicinal	Cepario del Laboratorio 402 EMA-6
<i>Bacillus spp</i> 49.3	Rizósfera de planta medicinal	Cepario del Laboratorio 402 EMA-6

Elaboración propia

Las cepas de *Salmonella spp* empleadas en esta investigación pertenecen al cepario del Laboratorio de Microbiología 402-EMA- 6 y se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Cepas del género *Salmonella* empleadas

Cepa	Origen	Referencia
Sal 1	Agua residual	Cepario del Laboratorio 402 EMA-6
Sal 2		Cepario del Laboratorio 402 EMA-6

Elaboración propia

Las cepas de *Shigella spp* empleadas en esta investigación pertenecen al cepario del Laboratorio de Microbiología 402-EMA- 6 y se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Cepas del género *Shigella spp* empleadas

Cepa	Origen	Referencia
Sh 1	Agua residual	Cepario del Laboratorio 402 EMA-6
Sh 2		Cepario del Laboratorio 402 EMA-6

Elaboración propia

5.2 Preparación de medios de cultivo.

En esta investigación se emplearon los siguientes medios de cultivo:

Medio Luria Bertani (LB): Es Uno de los principales medios empleados en el ámbito de la Microbiología, la composición química por litro es: 10 g de Peptona de caseína, 5 g de Extracto de levadura, 10 g de Cloruro de sodio y para el medio sólido se adicionaron 15 g de Agar bacteriológico, este medio proporciona los nutrientes necesarios para el desarrollo óptimo de la mayoría de los microorganismos, una vez preparado el medio fue esterilizado en autoclave a 121° C durante 15 minutos, posteriormente fue vertido en placas Petri. Este medio fue empleado para el cultivo de las cepas de *Bacillus spp* empleadas para los ensayos de antagonismo.

Medio Agar SS: Es un medio de cultivo selectivo para el aislamiento de bacterias del género *Salmonella spp* y *Shigella spp*, el cual fue preparado de acuerdo con las indicaciones del proveedor, adicionando la cantidad necesaria del medio en el agua destilada, el medio fue calentado con

agitación hasta el punto de ebullición durante unos minutos y no es necesario esterilizarlo en autoclave.

Medio Tris G: El medio Tris G fue empleado para el cultivo de las cepas de *Bacillus* spp, la composición química por litro fue la siguiente Cloruro de Calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0.008 %, Sulfato de Hierro ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.00025 %, Sulfato de Cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0.0005 %, Sulfato de Zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.0005 %, Sulfato de Manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0.005 %, Sulfato de Magnesio (MgSO_4) 0.02 %, Sulfato de Amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2 %, Glucosa 0.2 %, Tris 50 mM pH 7.5, Extracto de levadura 0.15 %, Fosfato de Potasio Di básico (K_2HPO_4) 0.05 % y agar al 1.5 % (opcional para medio sólido).

5.3 Tinción de Gram de las cepas empleadas.

El principio de la tinción de Gram se basa en la composición y estructura de la pared celular de las bacterias. Las bacterias Gram positivas poseen una pared celular gruesa por las capas de peptidoglicano, en esta región se fija el colorante cristal violeta, en cambio las bacterias Gram negativas poseen capas delgadas de peptidoglicano y de alto contenido lipídico. En soluciones acuosas el cristal violeta se disocia en iones positivos (CV^+) y cloro negativo (Cl^-), estos iones pueden penetrar la pared celular y membrana de las bacterias Gram positivas y negativas. El CV^+ interactúa con los componentes negativamente cargados de las células bacterianas, dándoles el color, posteriormente los agentes decolorantes interactúan con los lípidos presentes en la membrana de las bacterias Gram negativas y positivas. La membrana externa de las bacterias Gram negativas es removida de la célula, dejando la capa de peptidoglicano expuesta, es así como el colorante se puede drenar. Después de la decoloración, las bacterias Gram positivas mantienen el color purpura gracias a las múltiples

capas entrecruzadas de peptidoglicano, mientras que las bacterias Gram negativas pierden el color. (Paray et al., 2023)

Los pasos de la tinción son los siguientes:

1. Colocar en un portaobjetos bajo condiciones de esterilidad una gota de agua inyectable PiSA, se tomó una asada del cultivo a analizar, se realizó un frotis.

2. Se fijó la muestra pasando el portaobjetos rápidamente por la flama del mechero.

3. Se adicionan unas gotas de colorante cristal-violeta, se dejó tiñendo durante 1 minuto y se realizó un lavado con agua destilada.

4. Se adicionó una gota de Lugol, se dejó actuar por 30 segundos y se realizó un lavado con agua destilada.

5. Posteriormente se colocó una gota de alcohol-acetona, se dejó actuar por 15 segundos, se realizó un lavado con agua destilada.

6. Se colocó una gota de colorante de contraste safranina, se dejó actuar por 1 minuto, se realizó un lavado con agua destilada y finalmente la muestra se dejó secar.

7. Se colocó un cubreobjetos sobre la muestra y se observó en el microscopio óptico empleando el objetivo 100x.

5.4 Tinción con verde de malaquita (Observación de esporas).

Se realizó la técnica de tinción con verde de malaquita para observar el proceso de esporulación en cepas de *Bacillus* spp, de la siguiente forma:

1.- Se colocó una gota en un portaobjetos de un cultivo de 8 días de incubación

2.- Se adicionó una gota de verde de malaquita

3.- Calentar hasta que se emitan vapores durante 3 minutos

- 4.- Lavar con agua eliminando el exceso de colorante
- 5.- Colocar una gota de safranina y dejar actuar 1 minuto
- 6.- Lavar con agua y secar la muestra
- 7.- Observar al microscopio

5.5 Extracción de DNA Genómico y Electroforesis en Gel de Agarosa.

Las cepas de *Salmonella* spp y *Shigella* spp fueron cultivadas en tubos conteniendo 3ml de medio LB líquido, se colocaron en agitación continua durante 8 horas, posteriormente los tubos fueron centrifugados a 11000 rpm por 5 minutos, para obtener la pastilla celular, se decantó el sobrenadante y se adicionaron 150 µl de buffer de lisis, para mezclar se agitó en vórtex, se adicionó lisozima a cada tubo con la punta de un palillo estéril y se incubaron a 37°C por 15 minutos, posteriormente se agregaron 22 µl de sarcosil [1M] y 150 µl de fenol-cloroformo-isoamílico, se mezcló por inversión y los tubos fueron centrifugados a 11000 rpm por 5 minutos. La fase acuosa fue transferida en un tubo nuevo, esto se repitió dos veces, las fases acuosas fueron colocadas en un tubo nuevo, al cual se le agregó un volumen de cloroformo, se homogenizó y se centrifugó a las mismas condiciones del paso anterior. La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo y se adicionó un volumen de etanol absoluto y 10% de acetato de sodio, se mezcló por inversión y se colocó en refrigeración a -20°C por 20 minutos para la precipitación del DNA. Transcurrido el tiempo se realizó una centrifugación a 11000 rpm por 5 minutos, a la pastilla obtenida se le adicionaron 100 µl de etanol al 70 %, se eliminó por decantación el alcohol y la muestra de ADN se dejó secar. La pastilla fue resuspendida en 20 µl de agua estéril y conservada en refrigeración a -20°C (Sambrook et al., 1989).

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa a una concentración al 1 %, para teñir las muestras se empleó el colorante smartglow™ loading dye with safe Green y visualizado con luz ultravioleta.

5.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción de PCR se realizó empleando un mix que contenía: buffer PCR 10X, dNTP (2,5 mM de cada uno), 1 µl de Taq ADN- polimerasa, 1 µl de cada oligonucleótido y 120 ng de DNA. En la tabla (7) se muestran las secuencias de los oligonucleótidos empleados. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización a 94 °C por 1 min, 94 °C por 30 seg, un gradiente de temperatura de 54 a 65 °C por 30 seg, 72 °C por 1 min, extensión final a 72 °C por 4min, durante 30 ciclos. Se empleó un Termociclador marca BIORAD Mod T100. Posteriormente se corrió un gel de agarosa al 0.1 % en buffer TBE 0.5 X y fue teñido con el colorante smartglow™ loading dye with safe Green y visualizado con luz ultravioleta.

Tabla 7. Oligonucleótidos empleados

Oligonucleótido	Secuencia	Longitud	Referencia
Sal 1 Gen InvA	GCTGCGCGCAACGGCGAAG	20 pb	[88, 89]
Sal 2 Gen InvA	TCCCGGCAGAGTCCCATT	19 pb	[88, 89]
Sh 1 Gen ipaH (Invasión Plásmid Antígeno H)	G TTCCTTGACCGCCTTTCCGTACCGT C	27 pb	[90, 91]
Sh 2 Gen ipaH (Invasión Plásmid Antígeno H)	GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTA C	26 pb	[90, 91]

Elaboración propia

5.7 Antibiogramas de las cepas de *Salmonella spp* y *Shigella spp*.

Se realizaron ensayos de resistencia a los antibióticos en cepas de *Salmonella spp* y *Shigella spp* para lo cual se empleó la técnica de difusión por disco, esta técnica ha sido utilizada durante más de 70 años en los laboratorios de microbiología.

Los pasos de esta técnica fueron los siguientes:

1. Seleccionar la colonia de la cepa de interés
2. Inocular con asa bacteriológica un tubo con 3 mL de medio de cultivo LB líquido, incubar por 12 horas a 37 °C, transcurrido el tiempo realizar diluciones seriadas del cultivo (10^{-1} a 10^{-6})
3. Estandarizar la suspensión del inóculo con respecto al tubo 0.5 de la escala de McFarland
4. Inocular la placa de medio Agar SS con 100 μ L del cultivo por la técnica de extensión en placa
5. Colocar discos de antimicrobiano comerciales para Gram negativos serie 2 (Marca Investigación Diagnóstica).
6. Incubar las placas por 12 horas a 37°C
7. Medir las zonas de inhibición
8. Interpretar los resultados

5.8 Obtención de metabolitos producidos por cepas de *Bacillus spp*.

Se cultivaron las cepas de *Bacillus sp* (49.1, 49.2 y 49.3) en medio Tris G líquido durante 10 días en agitación a 120 rpm en una temperatura de incubación 28 °C, transcurrido el tiempo de incubación se observaron las células al microscopio para corroborar la presencia principalmente de esporas. Esta prueba se realizó debido a que los metabolitos producidos por el género

Bacillus son sintetizados durante la fase estacionaria de crecimiento, durante la cual se agotan los nutrientes y las células vegetativas comienzan a esporular. Una vez que el cultivo está completamente esporulado se procedió a obtener los metabolitos producidos microfiltrando el cultivo con filtros de jeringa estériles con membranas de poro de 22 µm de diámetro. Los metabolitos se incubaron para probar de su esterilidad.

5.9. Ensayos de antagonismo de los metabolitos producidos por *Bacillus* spp contra cepas de *Salmonella* spp y *Shigella* spp.

Los ensayos de antagonismo en cepas de *Salmonella* spp y *Shigella* spp se realizaron de la siguiente forma:

- 1.- Se cultivó las cepas de *Salmonella* spp inoculando con asa bacteriológica un tubo con 3 mL de medio de cultivo LB líquido, los tubos se incubaron por 12 horas a 37 °C, transcurrido el tiempo se realizaron diluciones seriadas del cultivo (10^{-1} a 10^{-6})
2. Se seleccionó la dilución del inóculo similar al tubo 0.5 con respecto a la escala de McFarland
3. Se sembraron 100 µL del cultivo diluido por la técnica de extensión en placa en placas Petri con medio LB.
4. Las cajas Petri fueron incubadas durante 1 hora a 37 °C, transcurrido el tiempo de incubación se colocaron gotas de 20 µL de los metabolitos producidos por las cepas de *Bacillus* spp.
5. Las cajas fueron incubadas a a 37 °C durante 12 horas, transcurrido el tiempo se midieron los halos de inhibición.

6. RESULTADOS

6.1. Cultivo de las cepas empleadas en medios selectivos.

Las cepas de *Salmonella spp* y *Shigella spp* aisladas previamente de muestras de agua residual del Río Atoyac, fueron cultivadas en el medio selectivo diferencial Agar SS (*Salmonella* y *Shigella*), la morfología colonial de las cepas fue la esperada en este medio, las cepas Sal 1 y Sal 2 presentaron color negro en Agar SS lo cual concuerda con las especificaciones del proveedor par *Salmonella spp* y la cepa Sh 1 presentaba un color claro y traslucido correspondiente a *Shigella spp* (Tabla 8).

Tabla 8. Características morfológicas de las cepas empleadas en medio de cultivo Agar SS

Cepa	Origen	Morofología colonial	Género Presuntivo
Sal 1	Agua residual del río Atoyac	Colonias de color negro	<i>Salmonella sp</i>
Sal 2	Agua residual del río Atoyac	Colonias de color negro	<i>Salmonella sp</i>
Sh 1	Agua residual del río Atoyac	Colonias de color claro traslucido	<i>Shigella sp</i>

La morfología colonial de las cepas presuntivas de *Salmonella spp* presentó la coloración característica negra en Agar SS (Figura 8).

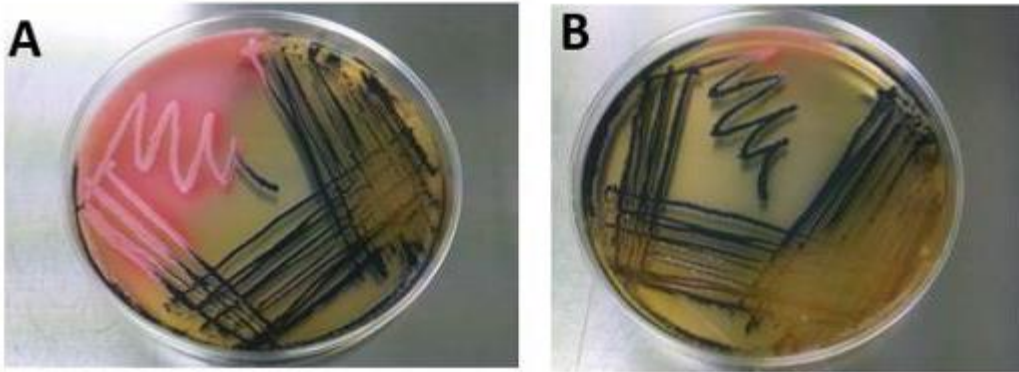


Figura 7. Cepas presuntivas de *Salmonella* en medio Agar SS. A) *Salmonella* spp cepa Sal 1 a las 24 horas de incubación, B) *Salmonella* spp cepa Sal 2 a las 48 horas de incubación.

Para el caso de *Shigella* spp en Agar SS se observó que las colonias presentaban una coloración clara y de aspecto translucido, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura para este microorganismo (Figura 9).



Figura 9. Cepa Sh 1 presuntiva de *Shigella* spp en el medio de cultivo Agar SS.

6.2 Tinción de Gram de cepas de *Salmonella spp.*

Al realizar la tinción de Gram de las cepas presuntivas de *Salmonella spp* se observó al microscopio que las bacterias presentaban un color rosa-rojizo, lo cual concuerda con la tinción de bacterias Gram negativas (Figura 10). De la misma forma las cepas de *Shigella spp* Sh 1 y Sh2, mostraron el mismo patrón de tinción.

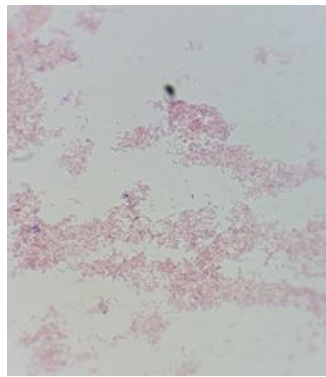


Figura 10. Tinción de Gram de la cepa Sal 1 de Salmonella spp.
La observación fue hecha empleando el objetivo de 40X.

6.3 Extracción de ADN genómico de las cepas empleadas.

Se realizó la extracción de DNA genómico de las cepas de *Salmonella spp* y *Shigella spp*, este procedimiento se realizó mediante el empleo de solventes (Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico). Se realizó la electroforesis de las muestras de DNA extraídas para corroborar la cantidad e integridad del ADN (Figura 11).

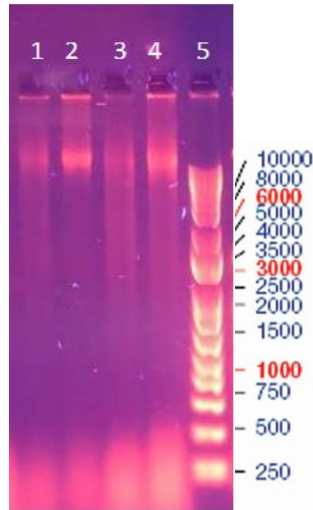


Figura 11. Extracción de ADN genómico en cepas de Salmonella spp y Shigella spp.
Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Carril 1.- *Salmonella spp* Cepa Sal 1, carril 2.-*Salmonella spp* Cepa Sal 2, carril 3.- *Shigella spp* cepa Sh 1, carril 4.- *Shigella spp* cepa Sh 2, carril 5.- Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder.

6.4. Identificación de las cepas de *Salmonella spp* y *Shigella spp* mediante Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).

Para la identificación por PCR de las cepas presuntivas del género *Salmonella spp* y *Shigella spp* se emplearon oligonucleótidos para la amplificación de genes de interés específicos en estos géneros bacterianos, en *Salmonella spp* se detectó la presencia del gen de invasividad Inv A en las cepas presuntivas del género *Salmonella spp*, para esto se emplearon los oligonucleótidos (Sal 1 y Sal 2) [88, 89]. El tamaño del amplificado del gen Inv A concordó con lo reportado 300 pb (Figura 11).

En el caso de las cepas de *Shigella spp* se realizó la detección por PCR del gen *ipaH* conocido como "invasión plásmid antígeno H", el cual ha sido reportado en el 99 % de aislados de *Shigella* (Fitzpatrick, 2010; Sáenz y

Sánchez, 2005), para su amplificación se emplearon los oligonucleótidos (Sh 1 y Sh 2) El tamaño del gen amplificado para el gen *ipaH* fue de 600 pb en las 2 cepas (Figura 12).

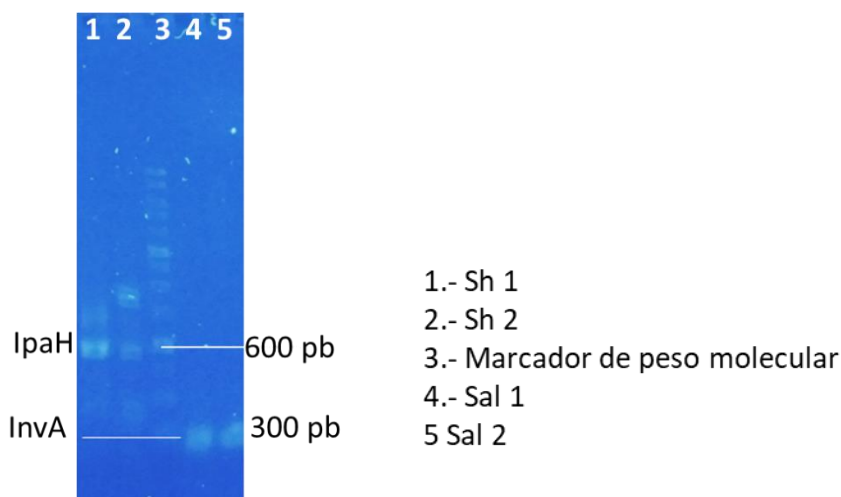


Figura 12. Detección mediante PCR del gen ipaH (Shigella spp) y del gen Inv A (Salmonella spp). Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Carril 1.- Shigella spp cepa Sh 1, carril 2.- Shigella spp cepa Sh 2, carril 3.- Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder, carril 4.- Salmonella spp Cepa Sal 1, carril 5.- Salmonella spp Cepa Sal 2.

6.5 Determinación de la sensibilidad o resistencia a antibiótico en cepas de *Salmonella spp* y *Shigella spp*.

Se realizó la determinación de la sensibilidad o resistencia a antibióticos comerciales en el medio de cultivo Agar SS de las cepas de *Salmonella spp*: Sal 1 y Sal 2 y de la cepa Sh1 de *Shigella spp*, este medio fue elegido para observar la pigmentación característica de las cepas empleadas, los resultados indicaron que la cepa Sal1 fue resistente a 7 de los 12 antibióticos probados y sensible a Amikacina, Cefotaxima, Netilmicina, Ciprofloxacino y Norfloxacino (Tabla 9 y Figura 12). La cepa Sal 2 resultó ser completamente

sensible a los antibióticos probados, ya que fue inhibida por los 12 antibióticos, por último, la cepa Sh1 solamente fue resistente a la ampicilina (Tabla 9 y Figura 13).

Tabla 9. Antibiógramas de las cepas empleadas en agar SS.

Antibiótico	Concentración del antibiótico	Cepa Sal 1	Cepa Sal 2	Cepa Sh
Ampicilina AM	30 µg	R	S	R
Amikacina AK	10 µg	21 mm	S	6 mm
Carbenicilina CB	100 µg	R	S	1 mm
Gentamicina GE	10 µg	R	S	1 mm
Cefalotina CF	30 µg	R	S	S
Cefotaxima CFX	30 µg	12 mm	S	S
Netilmicina NET	30 µg	8 mm	S	S
Ciprofloxacino CPF	5 µg	14 mm	S	S
Norfloxacino NOF	10 µg	12 mm	S	S
Cloranfenicol CL	30 µg	R	S	S
Sulfametoxazol SXT	25 µg	R	S	S
Nitrofurantoína NF	300 µg	R	S	S

R= Resistente

S= Sensible

Halo de inhibición en mm

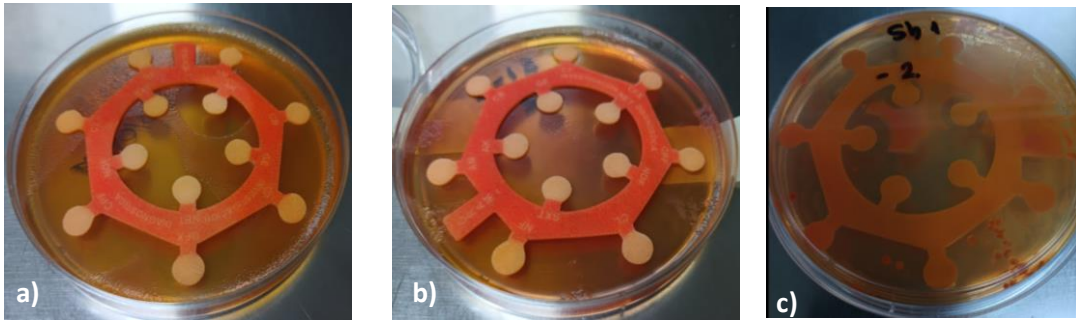


Figura 13. Antibiograma de las cepas probadas. a) Cepa de *Salmonella* Sal 1, b) cepa de *Salmonella* Sal2, c) Cepa de *Shigella* Sh1.

6.6 Tinción de Gram de la Cepas de *Bacillus* spp.

Las cepas de *Bacillus* spp fueron cultivadas en medio Tris G, se observó su morfología colonial característica de aspecto ceroso (Figura 14).

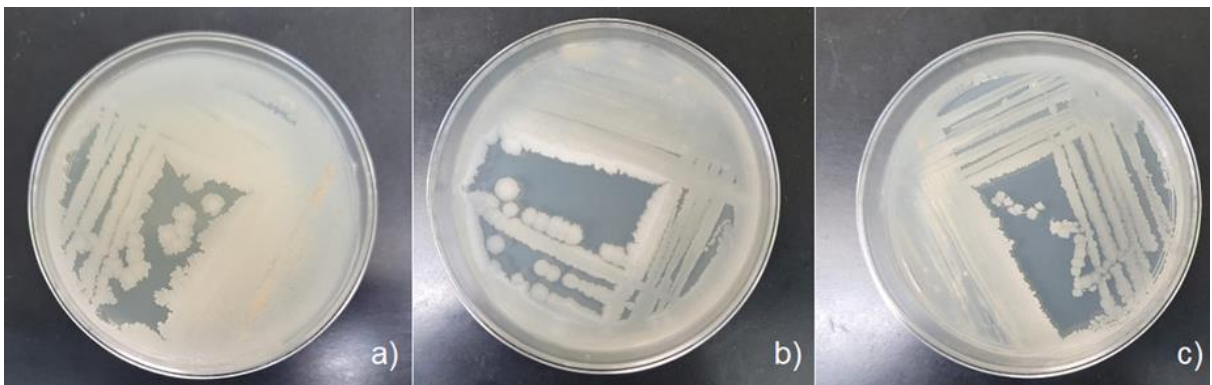


Figura 14. Cultivo de cepas de *Bacillus* spp en medio TrisG. a) cepa 49-1. b) cepa 49-2. c) cepa 49-3.

Al realizar la tinción de Gram de las cepas del género *Bacillus* spp (49.1, 49.2 y 49.3), se observó al microscopio el patrón de tinción de las bacterias Gram Positivas, ya que mostraron un color violeta (Figura 15).



Figura 15. Tinción de Gram de Bacillus spp cepa 49.1, se observa una coloración Gram positiva. La observación fue hecha empleando el objetivo de 40X.

6.7 Observación de esporas en cepas de *Bacillus spp* mediante tinción con verde de malaquita.

El empleo de la técnica de tinción con verde de malaquita permitió la observación al microscopio de las esporas en las cepas del género *Bacillus* (Figura 16) se observa que la célula vegetativa se tiñe de color rojizo, mientras que la espora retiene el color verde, al progresar el proceso de esporulación ocurre la lisis de la célula.



Figura 16. Tinción con verde de Malaquita para la observación de esporas en Bacillus spp cepa 49.1.

La observación fue hecha empleando el objetivo de 100X.

6.8. Ensayos de antagonismo de los metabolitos producidos por *Bacillus spp* contra cepas de *Salmonella spp* y *Shigella spp*.

Para analizar el efecto antimicrobiano de los metabolitos producidos por las cepas de *Bacillus spp* (49.1, 49.2 y 49.3) sobre el desarrollo de las cepas de *Salmonella* Sal1 y Sal2, se realizaron ensayos en el medio de cultivo Agar SS, los resultados indicaron que en las zonas de aplicación de los metabolitos de las cepas 49.1 y 49.2 sobre el cultivo de la cepa Sal1, se observó una disminución del crecimiento en comparación del área control donde no se aplicaron los metabolitos, en el caso de la cepa Sal2 y de la cepa de *Shigella spp* no se observó efecto de los metabolitos (Figura 17).

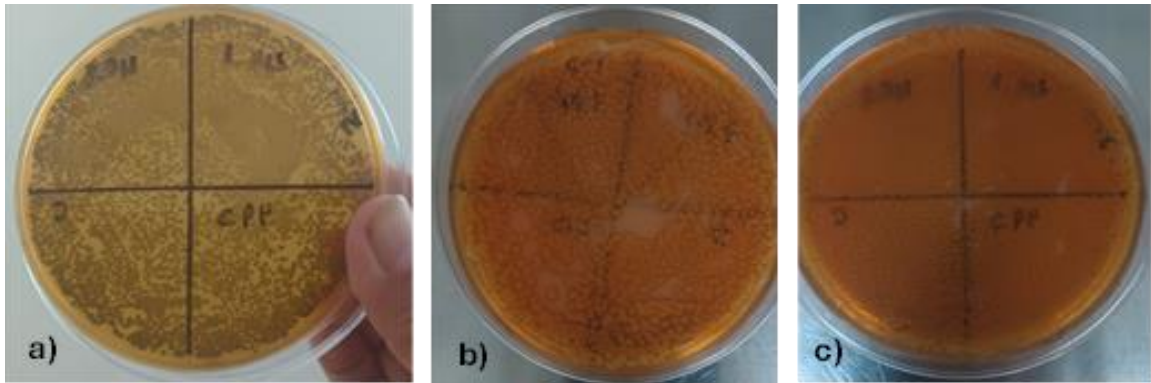


Figura 17. Análisis del efecto antimicrobiano de los metabolitos de las cepas de Bacillus spp (49.1, 49.2 y 49.3) contra cepas de Salmonella spp.

- a) Cepa Sal1 a 24 h de incubación, b) Cepa Sal a las 72 h de incubación,*
- c) Cepa Sal 2 a las 72 h de incubación.*

7. Discusión.

El empleo de técnicas microbiológicas y moleculares como el PCR en punto final permitió la identificación de bacterias pertenecientes a *Salmonella spp* y *Shigella spp*, las cuales fueron aisladas de muestras de agua residual del Río Atoyac en la Ciudad de Puebla, los resultados de la amplificación concuerdan con el tamaño de fragmento esperado. Se ha reportado en la literatura la detección por PCR del gen invasividad Inv A en *Salmonella spp* como una herramienta útil para la identificación de este microorganismo en muestras de alimentos contaminados (Amin et al., 2012; Mateos, 2017).

En el caso de las cepas de *Shigella spp* en el presente estudio se eligió realizar la detección por PCR del gen *ipaH* conocido como “invasión plásmid antígeno H”, esto debido a que ha sido ampliamente reportado como un marcador presente en el 99 % de aislados de *Shigella spp* en otros estudios (Fitzpatrick, 2010; Sáenz y Sánchez, 2005).

Los estudios reportados se enfocan principalmente en el aislamiento y detección de microorganismos patógenos como los pertenecientes a *Salmonella spp* y *Shigella spp* en alimentos contaminados, en esta investigación se realizó la detección de estos microorganismos en muestras ambientales de agua contaminada, lo cual representa un foco de alerta, ya que el agua podría ser empleada para el riego de hortalizas y por lo tanto servir para la transmisión de microorganismos patógenos.

Al realizar los análisis de resistencia o susceptibilidad a antibióticos de las cepas probadas se encontró que la cepa Sal 1 de *Salmonella spp* mostró resistencia a 7 antibióticos comerciales, esto es de suma relevancia dado que la Organización Mundial de la Salud ha señalado el incremento de la resistencia a antibióticos en *Salmonella spp* incluyéndola en la lista de bacterias de alta prioridad junto *Shigella spp*. En este sentido las

enfermedades infecciosas son la segunda causa de muerte más común en el mundo. Muchos patógenos infecciosos, especialmente bacterias Gram negativas han desarrollado resistencia a la mayoría de los antibióticos convencionales. Por lo que es indispensable encontrar antibióticos eficaces contra estas bacterias, en la literatura se ha reportado que una alternativa para enfrentar a estas super bacterias es el empleo de los péptidos antimicrobianos (AMP's) que se tratan de antibióticos naturales que se encuentran codificados en el genoma de algunas especies del género *Bacillus* (Sumi et al., 2015).

En este estudio se realizaron análisis de inhibición de los metabolitos secundarios producidos por cepas del género *Bacillus* contra las bacterias Gram negativas *Salmonella* spp y *Shigella* spp, se observó una disminución en el crecimiento de la cepa Sal1 de *Salmonella* spp.

En la literatura se han reportado estudios para evaluar la inhibición de bacterias patógenas de metabolitos del género *Bacillus* spp contra bacterias Gram positivas, un aislado de suelo salino cepa GU 057, presentó una amplia zona de inhibición del crecimiento de la bacteria *Staphylococcus aureus* (18mm) y contra *Micrococcus luteus* (13mm). Se reportó que el máximo rendimiento de los antibióticos producidos por la cepa fue cuando se cultivó a la bacteria en una concentración de glucosa fue del 4%. Este estudio confirmó que la cepa GU 057, era productora del péptido antibiótico (bacitracina) (Amin et al., 2012).

Se ha reportado que el mecanismo de acción de la bacitracina depende de la concentración del medicamento, por lo que puede ser bacteriostático o bactericida. Este antibiótico inhibe la incorporación de aminoácidos y nucleótidos en la pared celular, bloquea la síntesis de esta inhibiendo la regeneración de receptores fosfolípidos comprometidos en la síntesis de peptidoglucanos, pero también daña las membranas formadas

produciendo la lisis y muerte de las bacterias (Sáenz-Anduaga & Sánchez-Saldaña, 2005).

Un estudio reportó que para optimizar la producción de este antibiótico en cepas de *Bacillus spp* y su eficacia como antibiótico contra la bacteria Gram negativa *K. pneumoniae*, el mejor sustrato para la producción de bacitracina fueron los granos de soya, esto debido a las altas concentraciones de nitrógeno que posee (Hassan et al., 2020).

El género *Bacillus spp* sintetiza diversos péptidos de naturaleza antibiótica, existen dos grupos de estos péptidos, uno que es sintetizado por complejos sistemas enzimáticos sin la intervención de ribosomas y el otro se trata de péptidos sintetizados a través de ribosomas, se ha reportado que *Bacillus subtilis* produce tres antibióticos ribosomales (TasA, subtilosina y sublancina), cuatro antibióticos no ribosomales, (bacitracina, bacilisina, plipastatina y surfactina, el novedoso antibiótico fosfolipídico bacilisocina y neotrehalosadiamina (Sumi et al., 2015).

Las bacteriocinas de esta especie afectan a otras bacterias Gram positivas y Gram negativas que son transmitidas al humano por alimentos contaminados (Sauka, 2017).

En este estudio se encontró que los metabolitos producidos por las cepas 49.1, 49.2 y 49.3 tuvieron un efecto bacteriostático sobre la bacteria Gram Negativas de *Salmonella* cepa Sal 1, es necesario realizar más investigación para determinar si los metabolitos responsables son de naturaleza bacteriocina.

De acuerdo con Cochrane y Vederas la especie *Bacillus subtilis* son una excelente opción para la producción de lipopéptidos que tengan la característica de funcionar como antibióticos con actividad de amplio espectro contra bacterias Gram negativas y Gram positivas, así como

contra bacterias anaeróbicas (Stephen A. Cochrane and John C. Vederas, 2016).

8. Conclusiones.

Es de suma importancia la continua investigación con respecto a la búsqueda de nuevos fármacos que nos ayuden a enfrentar el problema de la multiresistencia bacteriana a los antibióticos.

En el presente se identificaron a través de PCR microorganismos pertenecientes a los géneros bacterianos: *Salmonella* spp y *Shigella* spp, los cuales son agentes causales de enfermedades gastrointestinales que siguen representando un problema de salud. Estos microorganismos fueron aislados de muestras de agua del río Atoyac y presentan un perfil de resistencia a antibiótico

Los análisis de antagonismo contra los metabolitos de *Bacillus* spp indicaron que existió una disminución en el desarrollo de la cepa Sal1 de *Salmonella* spp cuando fue expuesta a los metabolitos de las cepas 49.1, 49.2 de *Bacillus* spp, en el caso de la cepa de *Shigella* spp no hubo efecto inhibitor en las áreas de aplicación.

Esta investigación pone de manifiesto el potencial antimicrobiano de los metabolitos producidos por el género *Bacillus* contra algunas bacterias Gram negativas.

Es necesario la identificación de los metabolitos producidos por las cepas 49.1, 49.2 de *Bacillus* spp, para entender el mecanismo de acción sobre las bacterias probadas.

9. Perspectivas.

- Identificar los metabolitos producidos por las cepas de *Bacillus spp* mediante cromatografía líquida HPLC (High-Performance Liquid Chromatography), con el objetivo de separar los componentes que se encuentran presentes en el microfiltrado del cultivo de *Bacillus spp*.
- Realizar ensayos de inhibición con los metabolitos identificados en cepas de *Salmonella spp* y *Shigella spp*.
- Realizar ensayos de inhibición con los metabolitos identificados en otras bacterias patógenas.
- Comparar el antibiograma de las cepas de *Salmonella spp* y *Shigella spp*, en otra condición nutricional como es medio Muller Hinton.

10. Referencias.

1. Rukmini M, Sahoo D, Dalei J, R. R. (2015). Production, purification and characterization of bacitracin from *Bacillus subtilis*. In *Pharma Innov J TPI*. (pp. 77–82).
6. Johnson ET, Bowman MJ, D. C. (2020). *Brevibacillus fortis* NRS-1210 produces edeines that inhibit the in vitro growth of conidia and chlamydospores of the onion pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. *Antonie Van Leeuwenhoek.*, 113(7), 973–987.
- Abebe, E., Tegegne, B., & Tibebe, S. (2016). A Review on Molecular Mechanisms of Bacterial Resistance to Antibiotics. *European Journal of Applied Sciences*, 8(5), 301–310.
<https://doi.org/10.5829/idosi.ejas.2016.8.5.1143>
- Amin, A., Ayaz Khan, M., Ehsanullah, M., Haroon, U., Muhammad Farooq Azam, S., & Hameed, A. (2012). Production of peptide antibiotics by *Bacillus* SP. GU 057 indigenously isolated from saline soil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1340–1346.
<https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000400015>
- Antibiotics, R. T. O. (2018). *RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y CONJUGACIÓN*.
- Arenas, N. E., & Melo, V. M. (2018). *Producción pecuaria y emergencia de antibiótico resistencia en Colombia : Revisión sistemática*. 22(2), 110–119.
- Arnesen, L. P. S., Fagerlund, A., & Granum, P. E. (2008). *From soil to gut : Bacillus cereus and its food poisoning toxins*. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00112.x>
- Ash, C., Priest, F. G., & Collins, M. D. (1993). *Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash , Farrow , Wallbanks and Collins) using a PCR probe test*. 253–260.
- Ashy, C., Farrow, J. A. E., Dorsch, M., & Stackebrandt, E. (1991). *Related Species on the Basis of Reverse Transcriptase Sequencing of 16s rRNA*. 343–346.
- Bergen, P. J., Landersdorfer, C. B., Ji, H., & Li, J. (2012). ‘ Old ’ antibiotics for emerging multidrug-resistant bacteria. 25(6), 626–633. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e328358afe5>
- Bernatová, S., Samek, O., Pilát, Z., Serý, M., Ježek, J., Ják, P., Siler, M., Krzyžánek, V., Zemánek, P., Holá, V., Dvořáčková, M., & Růžička, F. (2013). Following the mechanisms of bacteriostatic versus bactericidal action using Raman spectroscopy. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 18(11), 13188–13199. <https://doi.org/10.3390/molecules181113188>

- Boeckel, T. P. Van, Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., & Levin, S. A. (2015). *Global trends in antimicrobial use in food animals*. *16*, 1–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
- Bravo, A., Likitvivanavong, S., Gill, S. S., & Soberón, M. (2011). Bacillus thuringiensis : A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *41*(7), 423–431. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.02.006>
- Bravo, M. S. y A. (2001). Bacillus thuringiensis y sus toxinas insecticidas. In *Microbios*.
- Burmeister, A. R. (2015). *Horizontal Gene Transfer*. 193–194. <https://doi.org/10.1093/emph/eov018>
- Candela, T., & Fouet, A. (2006). Poly-gamma-glutamate in bacteria. *Molecular Microbiology*, *60*(5), 1091–1098. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05179.x>
- Davies, J. (1996). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiología (Madrid, Spain)*, *12*(1), 9–16. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00016-10>
- Denamur, E., & Matic, I. (2006). *MicroReview Evolution of mutation rates in bacteria*. *60*(March), 820–827. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05150.x>
- Du, J., Zhang, C., Long, Q., & Zhang, L. (2022). *Characterization of a pathway – specific activator of edeine biosynthesis and improved edeine production by its overexpression in Brevibacillus brevis*. *October*, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1022476>
- Elliott, K. (2015). *Antibiotics on the Farm : Agriculture ' s Role in Drug Resistance CGD Policy Paper 059 March 2015*. *March*.
- Fleming, A. (1945). Penicillin. *Nobel Lecture*.
- Forward, W. (2023). *Landscape of Push Funding in Antibiotic Research : Current Status and Way Forward*. 1–20.
- Ganewatta, M. S., Rahman, M. A., & Tang, C. (2017). Emerging Antimicrobial Research against Superbugs: Perspectives from a Polymer Laboratory. *Journal of the South Carolina Academy of Science*, *15*(1), 3–5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29276457> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/ar>

ticlerender.fcgi?artid=PMC5739084

Giedraitiene, Agne, et al. (2011). *Antibiotic Resistance Mechanisms of Clinically Important Bacteria*. 47(3).

Goossens, P. L., & Tournier, J. N. (2015). Crossing of the epithelial barriers by *Bacillus anthracis*: The Known and the Unknown. *Frontiers in Microbiology*, 6(OCT), 1–15.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01122>

Granum, P. E. (1994). *Bacillus cereus and its toxins*. 61–66.

Guemouri-athmani, S., Berge, O., Bourrain, M., & Mavingui, P. (2000). *Diversity of Paenibacillus polymyxa populations in the rhizosphere of wheat (Triticum durum) in Algerian soils*. 36, 149–159.

Halami, P. M. (2019). Microbial Pathogenesis Sublichenin , a new subtilin-like lantibiotics of probiotic bacterium *Bacillus licheniformis* MCC 2512 T with antibacterial activity. *Microbial Pathogenesis*, 128(December 2018), 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.12.044>

Hassan, A., Ali, S., Farooq, M. A., Tahir, H. M., Awan, M. U., & Mughal, T. A. (2020). Optimization of enhanced microbial production of zinc bacitracin by submerged fermentation technology. *Journal of Basic Microbiology*, 60(7), 585–599. <https://doi.org/10.1002/jobm.201900694>

He, Z., Kisla, D., Zhang, L., Yuan, C., Green-church, K. B., & Yousef, A. E. (2007). *Isolation and Identification of a Paenibacillus polymyxa Strain That Coproduces a Novel Lantibiotic and Polymyxin B*. 73(1), 168–178. <https://doi.org/10.1128/AEM.02023-06>

Heifetz, C. L., Fisher, M. W., Chodubski, J. A., & Decarlo, M. O. (1972). *Butirosin , a New Aminoglycosidic Antibiotic Complex : Antibacterial Activity In Vitro and in Mice*. 2(2), 89–94.

Henriques Normark, B., & Normark, S. (2002). Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine*, 252(2), 91–106. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.2002.01026.x>

Herrell, W. E., & Heilman, D. (1941). *EXPERIMENTAL AND CLINICAL STUDIES ON GRAMICIDIN Find the latest version* : 20(5), 583–591.

Hershberg, R., & Petrov, D. A. (2010). *Evidence That Mutation Is Universally Biased towards AT in Bacteria*. 6(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001115>

- Hicks, C. W., Sweeney, D. A., Cui, X., Li, Y., & Eichacker, P. Q. (2012). An overview of anthrax infection including the recently identified form of disease in injection drug users. *Intensive Care Medicine*, 38(7), 1092–1104. <https://doi.org/10.1007/s00134-012-2541-0>
- Hogan, D., & Kolter, R. (2002). *Why are bacteria refractory to antimicrobials ?* 472–477.
- Izurieta, I. L., & Andrade, A. A. (2015). *Aislamiento y caracterización de cepas de Bacillus spp . con actividad contra Tetranychus urticae Koch en cultivos comerciales de rosas Isolation and characterization of strains of Bacillus spp . With activity against Tetranychus urticae Koch in commercia. XVII(2)*. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54291>
- Jackson, S. G., Goodbrand, R. B., Ahmedl, R., & Kasatlya, S. (1995). *Bacillus cereus and Bacillus thuringiensis isolated in a gastroenteritis outbreak investigation. Jackson 1993*, 103–105.
- Jensen, G. B., Hansen, B. M., Eilenberg, J., & Mahillon, J. (2003). *Minireview The hidden lifestyles of Bacillus cereus and relatives. 5*, 631–640.
- Jiménez, M. V., Shakti, M., & Benítez, M. (2010). Identificación y caracterización de una bacteria degradadora de parafinas. *Usb.Edu.Mx2, 05*, 51–60.
- Kaman WE, Nazmi K, Voskamp-Visser AI, B. F. (2022). Gramicidin A is hydrolyzed by a stereospecific peptidase produced by Bacillus anthracis. *Environ Microbiol Rep.*, 14(4), 570–576.
- Knoll, A. H., Bergmann, K. D., & Strauss, J. V. (2016). Life: The first two billion years. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1707). <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0493>
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., & Collins, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: From targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, 8(6), 423–435. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2333>
- Konzl, D., Klensl, A., & Schbrgendorfer, K. (1997). *The bacitracin biosynthesis operon of Bacillus licheniformis ATCC 10716 : molecular characterization of three multi-modular peptide synthetases.*
- Kovács, Á. T. (2019). Bacillus subtilis. *Trends in Microbiology*, xxx(xxx), 10–11. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.03.008>

- Lagadic, L., Caquet, T., Écologie, U. M. R., & Écotoxicologie, É. (2014). *Bacillus thuringiensis*. In *Encyclopedia of Toxicology* (Third Edit, Vol. 1). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00471-1>
- Lal, S., & Tabacchioni, S. (2009). *Ecology and biotechnological potential of Paenibacillus polymyxa : a minireview*. *March*, 2–10. <https://doi.org/10.1007/s12088-009-0008-y>
- Lanz, N. D., & Booker, S. J. (2012). Biochimica et Biophysica Acta Identification and function of auxiliary iron – sulfur clusters in radical SAM enzymes ☆ SH OH OH OH. *BBA - Proteins and Proteomics*, 1824(11), 1196–1212. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.07.009>
- Lechner, S., Mayr, I. R., Francis, K. P., Pruo, B. M., Kaplan, T., Wieoner-gunkel, E., Stewart, G. S. A. B., & Scherer, S. (1998). *Bacillus weihenstephanensis sp . nov . is a new psychrotolerant species of the Bacillus cereus group*. 1 998.
- Lenhard, J. R., Bulman, Z. P., Tsuji, B. T., & Kaye, K. S. (2019). *Shifting Gears : The Future of Polymyxin Antibiotics*. 1–13. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8020042>
- Liu, Q., Zhang, C., Liu, T., Duan, C., Bian, X., Guo, Z., Long, Q., Du, J., Liu, A., & Dai, L. (2022). *Enhancement of edeine production in Brevibacillus brevis X23 via in situ promoter engineering*. 15, 577–589. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13825>
- Liu, S., Moayeri, M., & Leppla, S. H. (2014). Anthrax lethal and edema toxins in anthrax pathogenesis. *Trends in Microbiology*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.02.012>
- Loll, P. J., Upton, E. C., Nahoum, V., Economou, N. J., & Cocklin, S. (2014). The high resolution structure of tyrocidine A reveals an amphipathic dimer. *BBA - Biomembranes*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.01.033>
- Lowe, D. E., Ernst, S. M. C., Zito, C., Ya, J., & Glomski, I. J. (2013). *Bacillus anthracis Has Two Independent Bottlenecks That Are Dependent on the Portal of Entry in an Intranasal Model of Inhalational Infection*. 81(12), 4408–4420. <https://doi.org/10.1128/IAI.00484-13>
- Mikoley, K. (2019). *Las Bacterias (What Are Bacteria?)*.
- Mock, M.; Fouet, A. (2001). Annurev.Micro.55.1.647 Mock E Fouet 2001 Anthracis. *Annu. Rev. Microbiol.*, 55(647–671).
- Mukherjee, S. (2022). *The song of the cell*.

- Mukherjee, S., & Chamorro Mielke, J. (2017). *El gen : una historia personal*.
http://almena.uva.es/record=b1755934~S1*spl
- Olguín Michel. (2021). *Resistencia antimicrobiana: estiman 10 millones de muertes por año para 2050*. Unam Global.
- Organización Mundial de la Salud: OMS. (2017). Un informe de la OMS confirma que el mundo se está quedando sin antibióticos. Disponible en <https://www.who.int/es/news/item/20-09-2017-the-world-is-running-out-of-antibiotics-who-report-confirms>
- Paray, A. A., Singh, M., Mir, M. A., & Kaur, A. (2023). *Gram Staining : A Brief Review. September*.
<https://doi.org/10.52403/ijrr.20230934>
- Parisot, J., Carey, S., Breukink, E., Chan, W. C., Narbad, A., & Bonev, B. (2008). *Molecular Mechanism of Target Recognition by Subtilin , a Class I Lanthionine Antibiotic* *Antimicrob Agents Chemother*. 52(2), 612–618. <https://doi.org/10.1128/AAC.00836-07>
- Philipp Dettmer. (2021). *Immune*.
- Pournejati R, Gust R, K.-H. H. (2019). An Aminoglycoside Antibacterial Substance, S-137-R, Produced by Newly Isolated *Bacillus velezensis* Strain RP137 from the Persian Gulf. *Current Issues in Molecular Biology*, 76(9), 1028–1037.
- Properties of the Bacillus Cereus strain used in probiotic CenBiot*. (2016). January 1999.
<https://doi.org/10.1590/S0001-37141999000100002>
- Randhawa, S., & Sengar, S. (2021). The evolution and history of gene editing technologies. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (1st ed., Vol. 178). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2021.01.002>
- Richard, V., Daneau, D., Meunier, F., & Tumeurs, C. (1988). *Nosocomial Bacteremia Caused by Bacillus Species*. 783–785.
- Ross, J. M. (1957). The pathogenesis of anthrax following the administration of spores by the respiratory route. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 73(2), 485–494.
<https://doi.org/10.1002/path.1700730219>
- Rozwandowicz, M., Brouwer, M. S. M., Fischer, J., Wagenaar, J. A., Guerra, B., & Mevius, D. J. (2018). *Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae*. January,

1121–1137. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx488>

Sáenz-Anduaga, E., & Sánchez-Saldaña, L. (2005). Antibióticos tópicos. *Dermatol. Peru*, 15, 7–20.

Salazar-marroqui, E. L., Moreno-medina, R., Miguel, A., & Pereyra-alfé, B. (2016). *Bacteriocins synthesized by Bacillus thuringiensis : generalities and potential applications*. October 2015. <https://doi.org/10.1097/MRM.0000000000000076>

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual+ Cold Spring Harbor*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

San Millan, A., & Maclean, R. C. (2019). Fitness costs of plasmids: A limit to plasmid transmission. *Microbial Transmission*, 19, 65–79. <https://doi.org/10.1128/9781555819743.ch4>

Sapkota, A. (2022). *Bacillus subtilis- An Overview and Applications*. Microbie Notes.

Sarah Cumberland. (2017). *The world is running out of antibiotics, WHO report confirms*. Available from: <https://www.who.int/news/item/20-09-2017-the-world-is-running-out-of-antibiotics-who-report-confirms>.

Sauka, D. H. (2017). Bacillus thuringiensis: New applications for an old acquaintance? *Revista Argentina de Microbiología*, 49(2), 123–124. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.05.001>

Sauka, D. H., & Benintende, G. B. (2008). *Bacillus thuringiensis : generalidades . Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas*. 124–140.

Schünemann, R., Knaak, N., & Fiuza, L. M. (2020). *Mode of Action and Specificity of Bacillus thuringiensis Toxins in the Control of Caterpillars and Stink Bugs in Soybean Culture*. 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/135675>

Setlow, P. (2014). *Spore Resistance Properties*. v. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec>

Stein, T., Borchert, S., Conrad, B., Feesche, J., Hofemeister, B., Hofemeister, J., Entian, K., & Plasmids, T. (2002). *Two Different Lantibiotic-Like Peptides Originate from the Ericin Gene Cluster of Bacillus subtilis A1 / 3*. 184(6), 1703–1711. <https://doi.org/10.1128/JB.184.6.1703>

Stephen A. Cochrane and John C. Vederas. (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>

- Stoica, R.-M., Moscovici, M., & Tomulescu, C. (2019). *Review Antimicrobial compounds of the genus A review Bacillus : 24(6)*, 1111–1119. <https://doi.org/10.25083/rbl/24.6/1111.1119>
- Su, Y., Liu, C., Fang, H., & Zhang, D. (2020). *Bacillus subtilis : a universal cell factory for industry , agriculture , biomaterials and medicine. Microbial Cell Factories*, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01436-8>
- Sumi, C. D., Yang, B. W., Yeo, I. C., & Hahm, Y. T. (2015). Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: A new era for antibiotics. *Canadian Journal of Microbiology*, 61(2), 93–103. <https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0613>
- Techniques, S. (2015). *Techniques for Oral Microbiology 2.1*. 15–40. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802234-4.00002-1>
- Vargas, P. (2012). Angiospermas BT - El árbol de la vida: sistemática y evolución de los seres vivos. In *El árbol de la vida: sistemática y evolución de los seres vivos* (Issue 12). [file:///Users/user/Dropbox/Papers3/Library.papers3/Books/2012/Vargas/2012 Vargas.pdf%0Apapers3://publication/uuid/CFC651AD-1E91-4658-A571-652C7FD4FCBB](file:///Users/user/Dropbox/Papers3/Library.papers3/Books/2012/Vargas/2012%20Vargas.pdf%0Apapers3://publication/uuid/CFC651AD-1E91-4658-A571-652C7FD4FCBB)
- Westers, L., Westers, H., & Quax, W. J. (2004). *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: A biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1694(1-3 SPEC.ISS.), 299–310. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.02.011>
- William, A., & Daniel, R. (1982). *BACITRACIN*. 16, 199–210.
- Zaitseva, E., Laubscher, W. E., Rensburg, W. Van, Behrends, J. C., & Bechinger, B. (2018). *crossm The Multifaceted Antibacterial Mechanisms of the Pioneering Peptide Antibiotics Tyrocidine and Gramicidin S*. 9(5), 1–20.
- Zaman, S. Bin, Hussain, M. A., Nye, R., Mehta, V., Mamun, K. T., & Hossain, N. (2017). A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. *Cureus*, 9(6). <https://doi.org/10.7759/cureus.1403>
- Zasloff, M. (2002). *Antimicrobial peptides of multicellular organisms*. 415(January), 389–395.
- Zeigler Daniel, P. J. (2008). The genus *Bacillus*. In *The genus Bacillus*.
- Zhu, Jiang, Wang, S., Wang, C., Wang, Z., Luo, G., Li, J., Zhan, Y., Cai, D., & Chen, S. (2023).

Microbial synthesis of bacitracin : Recent progress , challenges , and prospects. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 8(2), 314–322. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2023.03.009>

Zhu, Jibao, Hu, C., Zeng, Z., Deng, X., Zeng, L., & Xie, S. (2021). *European Journal of Medicinal Chemistry Polymyxin B-inspired non-hemolytic tyrocidine A analogues with significantly enhanced activity against gram-negative bacteria : How cationicity impacts cell specificity and antibacterial mechanism*. 221. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113488>