



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA**



Facultad de Ciencias Químicas BUAP

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**Análisis del antagonismo producido por *Bacillus spp.* contra
aislados multidrogosresistentes de *Staphylococcus spp.***

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIATURA EN QUIMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

p.Q.F.B. Azuri Jacqueline Hernández Díaz

ASESORES DE TESIS

Directora: D.C Verónica Ramírez Falcón

Co – director: D.C. José Antonio Munive Hernández

PUEBLA, PUEBLA

Noviembre 2023

INDICE

1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN	5
2.1 <i>Staphylococcus spp.</i>	5
2.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	6
2.1.2 Patología.....	6
2.1.3 Importancia clínica de <i>S. aureus</i>	7
2.1.4 Multidrogorresistencia.....	10
2.2 Género <i>Bacillus</i>	10
2.2.1 Clasificación.....	11
2.2.2 Ecología	12
2.2.3 Características	12
2.2.5 Metabolitos con potencial antimicrobiano	16
2.3 <i>Bacillus velezensis</i>	18
2.3.2 Metabolitos producidos por <i>B. velezensis</i>	19
3. ANTECEDENTES	23
3.1 <i>Bacillus</i> MH778713 ayuda a la fitorremediación de metales pesados por árboles de mezquite (<i>Prosopis laevigata</i>)	23
3.2 <i>Bacillus cereus</i> MH778713 provoca protección de la planta de tomate contra <i>Fusarium oxysporum</i>	23
4. JUSTIFICACIÓN.....	25
5. OBJETIVOS	26
5.1 Objetivo general.....	26
5.2 objetivos específicos	26
6. MATERIALES Y METODOS	27
6.1 Materiales	27
6.2 Material biológico	27
6.3 Equipos.....	28
6.4 Métodos	29
7. DIAGRAMA DE TRABAJO	30
8. METODOLOGÍA	31
8.1 Cultivo de cepas	31
8.1.1 <i>Staphylococcus</i>	31

8.1.2 <i>Bacillus spp.</i>	31
8.2 Prueba de antibiograma.....	32
8.3 Método de estrías cruzadas	34
8.4 Método de estrías	36
8.5 Prueba de pozos.....	37
8.6 Cultivo en masivo de <i>Staphylococcus sp.</i> y <i>Bacillus</i> a un lado	39
8.7 Cultivo dual.....	40
8.8 Difusión de microgotas	41
9. RESULTADOS Y DISCUSION.....	43
9.1 Aislamiento e identificación de cepas.....	43
9.2 Antibiograma.....	47
9.4 Cultivo en masivo de <i>Staphylococcus</i> y <i>Bacillus</i> al lado	53
9.5 Cultivo dual de <i>Staphylococcus</i> y <i>Bacillus</i>	55
9.6 Difusión con microgotas.....	56
9.7 Método de estrías	63
9.8 Método de estrías cruzadas	66
9.9 Prueba en pozos.....	73
10. CONCLUSIONES	76
11. BIBLIOGRAFIA.....	77

1. RESUMEN

Los *Staphylococcus spp.* son bacterias grampositivas, no formadoras de esporas que hacen parte de la microbiota de los seres humanos encontrándose principalmente en la piel, en la zona nasofaríngea, pliegues inguinales y axilas. (Pasachova et al., 2019).

S. aureus es uno de los patógenos con mayor importancia en el ser humano ya que principalmente coloniza e infecta a pacientes hospitalizados con defensas disminuidas, provocando lo que se llama infecciones intrahospitalarias a lo que se refiere específicamente a aquellos padecimientos ocasionados por microorganismos o agentes virales que se adquieren dentro de las instalaciones nosocomiales (Garza et al., 2013).

Esta clase de enfermedades representa toda una problemática para las instituciones de salud, ya que su afectación abarca a una importante proporción de internos, e inclusive, llega a ocasionar la muerte de quienes resultan más vulnerables. Un aspecto importante de las infecciones por *S. aureus* que han reemergido, es debido a que la bacteria se ha tornado resistente a diversos antibióticos. (Cervantes et al., 2013). Debido a esto cada vez es un poco más complicado para los profesionales de salud emplear una adecuada terapia antibiótica para combatir estas infecciones.

Es por eso por lo que primero en este proyecto se realizó una prueba de resistencia a antibióticos con ayuda de antibiogramas por el método de Kirby – Bauer para así poder identificar a las cepas de *Staphylococcus spp.* con mayor drogorresistencia. Se ocuparon 28 diferentes cepas de *Staphylococcus* las cuales fueron donadas por los laboratorios de investigación; con esto se pudieron identificar a las cepas de *Staphylococcus spp.* con mayor resistencia a los antibióticos probados; las cuales se nombraron como: *Staphylococcus sp LEMST 12*, *Staphylococcus sp LEMST 13*, *Staphylococcus sp LEMST 28*, *Staphylococcus sp LEMST 11* y *Staphylococcus sp LEMST 10*.

Existe una gran variedad de bacterias, pero sólo el género *Bacillus* tiene la particularidad de presentar endosporas (Cohn et al., 1972). La presencia de endosporas le confiere la capacidad de diseminación y prevalencia en los ecosistemas.(Villarreal et al., 2018)

Gracias a varios estudios que se han realizado han demostrado que algunas de las cepas del género *Bacillus spp.* producen algunos compuestos denominados lipopéptidos cíclicos, los cuales tienen una potente actividad antimicrobiana contra las cepas resistentes a los antibióticos. (Lin et al., 2020).

Por lo anterior se evaluó el potencial antibacteriano que presentan distintas cepas de *Bacillus spp.* contra bacterias multidrogasresistentes como es *Staphylococcus aureus*. Las 28 cepas de *Bacillus* que se evaluaron fueron cepas donadas por Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana del instituto de Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, las cuales en anteriores estudios e investigaciones fueron aisladas de la planta *Prosopis laevigata*. Éstas fueron expuestas contra las diferentes cepas de *Staphylococcus spp.* realizando diferentes pruebas de inhibición para así poder evidenciar y seleccionar a las cepas que mostraran un mayor poder de inhibición.

Gracias a estas pruebas se pudieron identificar las siguientes cepas de *Bacillus*; *Bacillus velezensis* 1054, *Bacillus sp* 1078, *Bacillus sp* 1076 y *Bacillus sp* 1085. Como las cepas que demostraron tener una mayor capacidad de inhibición en las diferentes pruebas realizadas ante el crecimiento de *Staphylococcus sp.*

2. INTRODUCCIÓN

2.1 *Staphylococcus spp.*

En 1880 el cirujano escocés Alexander Ogston (1844-1929), quien descubrió que la principal causa de pus era causada por un microorganismo el cual llamó micrococci, al tomar una muestra de uno de sus pacientes; éste le hizo un frotis teñido y lo observó al microscopio. Posteriormente, en 1882, Ogston le dio el nombre de "Staphylococcus", del griego "Staphylo" que significa "racimo de uvas". Posteriormente, en 1884, el cirujano alemán Anton J. Rosenbach (1842-1923) identificó dos cepas de *Staphylococcus spp.* y las nombró de acuerdo con las pigmentaciones que producían: *Staphylococcus aureus*, del latín "aurum" para el pigmento color oro, y *Staphylococcus albus* (actualmente conocido como *Staphylococcus epidermidis*), del latín "albus" para el pigmento blanco. (Orenstein et al., 2019)

Los *Staphylococcus spp.* son bacterias grampositivas, no formadoras de esporas, anaerobias facultativas, inmóviles, catalasa positivas o negativas, coagulasa positiva, son pequeñas bacterias esféricas de pares a racimos similares a uvas y son β hemolíticos. Se describe que este microorganismo hace parte de la microbiota de los seres humanos encontrándose principalmente en la piel, en la zona nasofaríngea, pliegues inguinales y axilas. Sin embargo, este patógeno se caracteriza por generar infecciones en piel y tejidos blandos (músculos, tendones, tejidos grasos, vasos sanguíneos), invasión a dispositivos médicos y también ha sido relevante en las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) (Pasachova et al., 2019).

Los *Staphylococcus spp.* pueden crecer tanto en los alimentos como también están presentes en los animales, teniendo un amplio rango de temperatura de crecimiento que va desde los 7 °C a aproximadamente 48 °C, con un punto óptimo de desarrollo a 35 °C, y en un rango de pH preferido de 7,0 a 7,5, pero puede crecer tan bajo como el pH 4.5. Los *Staphylococcus spp.* pueden crecer a niveles bajos de actividad

de agua, por ejemplo, tan bajos como 0,8. Por lo tanto, son altamente tolerante a las sales y los azúcares (Todd et al., 2014).

2.1.1 Staphylococcus aureus

S. aureus es un patógeno humano importante que coloniza e infecta a pacientes hospitalizados con defensas disminuidas y a personas inmunocompetentes en la comunidad. Produce patologías diversas, desde un absceso de piel hasta septicemias mortales y choque tóxico estafilocócico (SSTS). Además, puede ser causante de intoxicación por alimentos, la cual ocurre en epidemias y es debida a la ingestión de la enterotoxina B termoestable preformada, producida por una cepa toxigénica de *S. aureus* que crece en el alimento (Hurtado et al., 2002).

S. aureus es un coco grampositivo que mide de 0.5 a 1.5 μm de diámetro, se agrupan en parejas y en tétradas, y una de sus formas característica es que se divide en más de un plano para formar racimos irregulares. Su pared celular contiene peptidoglucano y ácido teicoico. *S. aureus* es anaerobio facultativo y habitualmente catalasa y coagulasa positivos; no esporulados, resistentes, ya que pueden sobrevivir a muchas condiciones ambientales adversas; es productor de gran variedad de enzimas y toxinas, así como la fermentación del manitol y la prueba positiva para la desoxirribonucleasa. (Prescott ML et al., 1999).

2.1.2 Patología

La patología producida por *Staphylococcus aureus* se puede dividir en: localizada y generalizada; las patologías localizadas están favorecidas por cuestiones básicas y cotidianas como es una higiene personal deficiente, por traumatismos menores y procesos dermatológicos. Las infecciones de piel por *S. aureus* se pueden clasificar también en: aquellas con exantema y las que carecen de éste. Las enfermedades infecciosas estafilocócicas generalizadas incluyen la bacteriemia estafilocócica, la cual puede complicarse con endocarditis, infección metastásica o el síndrome séptico. La célula endotelial es básica en estos procesos patogénicos. No solamente es un blanco potencial para el daño, sino que también su activación contribuye con la progresión de la enfermedad endovascular. Los *Staphylococcus aureus* se

adhieren ávidamente a las células endoteliales y se unen a través de un mecanismo de interacción adhesina-receptor. Los estudios in vitro demuestran que después de la adherencia, los estafilococos son fagocitados por la célula endotelial (Hurtado et al., 2002).

2.1.3 Importancia clínica de *S. aureus*

El término "infecciones intrahospitalarias" se refiere específicamente a aquellos padecimientos ocasionados por microorganismos o agentes virales que se adquieren dentro de las instalaciones nosocomiales y cuya sintomatología aparece, por lo tanto, a partir de las 48 horas posteriores a la admisión del enfermo, en las unidades de cuidados intensivos u otras áreas de atención, e inclusive, independientemente de que la permanencia haya resultado prolongada o sólo se haya tratado de una consulta externa. Esta clase de enfermedades representa toda una problemática para las instituciones de salud, ya que su afectación abarca a una importante proporción de internos, e inclusive, llega a ocasionar la muerte de quienes resultan más vulnerables, implicando sobre todo a pacientes inmunodeficientes que padecen cáncer, SIDA, diabetes, quemaduras u otros trastornos debilitantes (alteraciones cardiovasculares o granulocíticas), así como a los enfermos sometidos a regímenes terapéuticos que abaten la inmunidad celular (tales como las basados en corticoesteroides) y a quienes se les han instalado sondas, catéteres venosos o urinarios, tubos endotraqueales, prótesis valvulares o articulares, etc. *Staphylococcus aureus* destaca como uno de los tres principales agentes causales de infecciones intrahospitalarias a nivel mundial: las cepas implicadas, conocidas ampliamente como HA-MRSA (del inglés *healthcare-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), agravan las condiciones de millones de internos cada año, afectando a todo el espectro de edades y en cualquier pabellón de los nosocomios (Garza et al., 2013).

Inicialmente, las cepas MRSA se encontraron en los hospitales, sin embargo, a finales de 1990, apareció la primera cepa de MRSA adquirida en la comunidad (CAMRSA), caracterizada por la presencia de la toxina PantonValentine (PVL). Estas cepas se diseminaron rápidamente a través del mundo, inicialmente sólo en

las comunidades y más tarde en los hospitales, desplazando en algunos países a las cepas típicas HA-MRSA. Por esta razón, hoy en día, la diferencia entre las cepas CA-MRSA y las HA-MRSA son un desafío para la medicina. Un aspecto importante en años recientes son las infecciones por *S. aureus*, que han reemergido debido a que la bacteria se ha tornado resistente a diversos antibióticos. Durante varias décadas se han reportado brotes por *S. aureus*, sobre todo en hospitales, centros de atención, clínicas y, recientemente, ha surgido este problema en la comunidad (Cervantes et al., 2013) .

La implementación de la terapia antimicrobiana en el comienzo de la década de 1930, con el uso de la sulfanilamida (descubierta por Gerard Domagk en 1932), aparentemente marcó el fin de las enfermedades infecciosas. Sin embargo, a finales de esa década, las primeras cepas de *S. aureus* resistentes a esa quimioterapia. Desde entonces, *S. aureus* ha ganado esta “batalla”, ya que han surgido nuevas cepas resistentes con cada nuevo antibiótico introducidos en el tratamiento de las patologías que se le atribuyen (Santos et al., 2007).

Se informó que algunas cepas de *S. aureus* muestran resistencia a la penicilina dentro de los 4 años posteriores a la introducción de la penicilina G en uso clínico en 1941. Otros antibióticos como la eritromicina, la tetraciclina y los aminoglucósidos que se usaron para el tratamiento de pacientes infectados por *S. aureus* productor de penicilinas lo que ocasionó que solo se diera lugar a la aparición de *S. aureus* resistente a múltiples fármacos en la década de 1950. La meticilina se desarrolló en 1960 para el tratamiento de tales *S. aureus* resistentes a múltiples fármacos. Sin embargo, en el mismo año, Jevons descubrió *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA), que en la década de 1970 se extendió por todo el mundo (Ito et al., 2003).

Las infecciones hospitalarias son un problema relevante de salud pública de gran trascendencia económica y social. Su importancia clínica y epidemiológica radica en la alta tasa de morbilidad y mortalidad. En México, hay 3,655 hospitales con aproximadamente 62,368 camas con 6.6 millones de admisiones al año. El impacto más importante de este problema es la mortalidad. En México, en 1996, de los 6,600,000 pacientes que recibieron atención médica hospitalaria, entre 600,000 y

750,000 presentaron infecciones intrahospitalarias y de éstos murieron entre 30,000 y 45,000. Se ha reconocido al estafilococo como un problema grave en los hospitales, donde se han establecido políticas de rutina sobre la vigilancia de enfermedades estafilocócicas. *S. aureus* es la principal causa de infecciones adquiridas después de una intervención quirúrgica y la segunda causa más frecuente de neumonía y bacteriemia intrahospitalaria. (Cervantes et al., 2013).

Las Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS) se consideran uno de los mayores problemas a nivel mundial, para la seguridad del paciente, afectando directamente la calidad en la prestación de servicios en las Unidades para la Atención Médica. En México, la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) reportó durante el periodo de 2015-2022, *S. aureus* como uno de los diez microorganismos aislados causantes de IAAS más frecuentes notificados en la plataforma de la RHOVE; mostrándose, así como en quinto lugar como causa de morbilidad y cuarto lugar en mortalidad (Secretaría de salud., 2022).

Las infecciones del tracto respiratorio (ITR) son la causa más común de muerte en niños menores de 1 año. En 2010, las infecciones de vías respiratorias inferiores representaron un total de 2,8 millones de muertes en todo el mundo en todos los grupos de edad, con una tasa de mortalidad estandarizada por edad de 41 por 1000000 muertes y 847000 muertes en todo el mundo en niños menores de 5 años (Lozano et al., 2012)

El desarrollo de mecanismos de resistencia a antibióticos demostrados *por S. aureus* es directamente relativa a los procedimientos empleados en su terapia antibiótica. Por otro lado, comprender el funcionamiento de la patogenicidad de este peligroso agente infeccioso puede guiar a los profesionales clínicos en la racionalización su terapia antibiótica, minimizando así las posibilidades de selección de cepas resistentes (y multirresistentes) a los antimicrobianos.

2.1.4 Multidrogorresistencia

Las bacterias del género *Staphylococcus* tienen una gran capacidad para adaptarse al medio intrahospitalario donde habitan, así como también tienen la gran capacidad de modificar sus mecanismos para crear resistencia ante los diferentes antibióticos que se emplean hacia estos. *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* han sido considerados como patógenos nosocomiales oportunistas que tienen un alto impacto dentro de la salud humana debido a su alto porcentaje de pacientes que se registran con este patógeno (Castro et al., 2007). En una revisión retrospectiva de 23 años, sobre las infecciones intrahospitalarias en un hospital en México, se reconoce que actualmente el género *Staphylococcus* tiene una prevalencia de 36% en esas infecciones (Chavez et al., 2004). En México, diversos estudios de vigilancia de las infecciones nosocomiales indicaron que de 8.3 a 36% de esas infecciones fueron atribuibles a *S. aureus* (Camacho et al., 2004).

La resistencia a la meticilina en estas dos especies de *Staphylococcus* se considera un problema creciente en el mundo. Los *Staphylococcus*. resistentes a meticilina son también resistentes a β -lactámicos y a otros grupos de antibióticos; recientemente se ha reportado resistencia a glicopéptidos. In vitro la susceptibilidad a clindamicina, trimetoprim sulfametoxazol, eritromicina, quinolonas y tetraciclinas ha sido frecuentemente reportada (Castro et al., 2007). Sin embargo, se han presentado cepas resistentes al grupo de antibióticos MLSB —macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B— comúnmente usados para tratar infecciones por *Staphylococcus* spp.; razón por la cual monitorear el perfil de susceptibilidad antimicrobiana es determinante para la evaluación de la terapia empírica en pro de generar alertas sobre la presencia de mecanismos de resistencia emergentes o inusuales (Castro et al., 2007).

2.2 Género *Bacillus*.

Existe una gran variedad de bacterias presentes en los distintos suelos, pero sólo el género *Bacillus*. tiene la particularidad de presentar endosporas, estas son formadas cuando la especie no se encuentra cómoda en ambientes determinados,

lo cual les permite estar presentes en los distintos hábitats, hasta darse las condiciones óptimas para su desarrollo. Las bacterias del género *Bacillus* fueron una de las primeras en ser descritas, y han jugado un rol principal en el desarrollo de la Microbiología. Este género fue descubierto en 1872 por Cohn, quien renombró la inadecuada descripción de Ehrenberg; de *Vibrio subtilis* a *Bacillus subtilis* y lo describió como bacterias productoras de endosporas resistentes al calor (Cohn et al., 1972).

2.2.1 Clasificación

Las especies de *Bacillus* pertenecen a:

- Reino: Bacteria
- Filo: Firmicutes
- Clase: Bacilli
- Orden: Bacillales
- Familia: Bacillaceae (Maghan ., 2011)

Actualmente, el género incluye más de 336 especies, las cuales por su similitud genética pueden clasificarse en distintos grupos, siendo los más destacados:

- a) El grupo de *B. cereus*, asociado a patogenicidad, que incluye *B. cereus-anthraxis-thuringiensis*.
- b) Los *Bacillus* ambientales que son caracterizados por su presencia en distintos hábitats, como el grupo de *Bacillus subtilis*, comprendido por *B. subtilis-licheniformis-pumilus*
- c) El grupo de *B. clausii-halodurans*
- d) El grupo que incluye a *Bacillus* sp. NRRLB-14911-*coahuilensis* (Alcaraz et al., 2010) (LPSN et al., 2016)

2.2.2 Ecología

Las especies de *Bacillus* se encuentran ampliamente distribuidas a nivel mundial debido a su habilidad para formar endosporas, característica que les confiere resistencia y potencia su aislamiento en diversos hábitats, tanto ecosistemas acuáticos como terrestres, e incluso en ambientes bajo condiciones extremas (Tejera et al., 2011).

Sin embargo, el suelo es considerado el principal reservorio de este género bacteriano, debido a que la mayoría de las especies de *Bacillus* son saprófitas pudiendo utilizar la gran diversidad de sustratos orgánicos presentes en el suelo, siendo ésta una matriz compleja para el establecimiento de una gran diversidad genética y funcional de especies microbianas. Por lo cual, múltiples especies de *Bacillus* pueden desarrollarse en los suelos, especialmente se pueden encontrar especies similares genéticamente al grupo de *B. subtilis* y *B. cereus* (Tejera et al., 2011).

2.2.3 Características

Entre las características más importantes de las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* están: forma bacilar, movilidad flagelar por flagelos insertados en forma peritica, pueden llegar a medir de 0,5-2,5 a 1,2-10 μm , además son aerobias estrictas o facultativas, saprófitas, Gram positivas, catalasa positiva, quimiorganotrofos de metabolismo fermentativo o realizan una respiración aerobia. Su crecimiento óptimo ocurre a pH neutro, presentando un amplio intervalo de temperaturas de crecimiento, aunque la mayoría de las especies son mesófilas (temperatura entre 30 y 45 °C), su diversidad metabólica asociada a la promoción del crecimiento vegetal y control de patógenos (Hurtado et al., 2002).

También cumplen importantes roles en los ciclos biogeoquímicos del carbono y nitrógeno. Una cualidad adicional por la cual son muy estudiadas estas bacterias es que presentan una potencial capacidad para producir diferentes compuestos

pudiendo servir como antifúngico, para proteger a plantas de enfermedades producidas por hongos (Castillo et al., 2004).

Como se dijo anteriormente, la mayoría de los *Bacillus* aerobios formadores de endosporas se encuentran en el suelo, generalmente en la zona de la rizosfera donde hay una gran cantidad de aminoácidos, vitaminas y carbohidratos, siendo la más fácil de encontrar en grandes cantidades, la especie *Bacillus cereus* (Castillo et al., 2004).

La endospora de los *Bacillus* generalmente está formada por proteínas deshidratadas utilizando el ácido poli- β -hidroxibutírico en aerobios y polisacáridos en los anaerobios. Estas endosporas tienen un largo tiempo de duración, observándose que algunas han llegado a soportar de 200 a 400 años, hasta 1000 años, pero el grado de resistencia de la endospora depende ampliamente de las condiciones del entorno bajo las cuales fueron formadas (Holt et al., 1984).

La familia *Bacillaceae*, que consta de bacterias en forma de bastoncillos que forman endosporas, tiene dos subdivisiones principales: las bacterias anaerobias formadoras de esporas del género *Clostridium* y las bacterias aeróbicas o facultativamente anaeróbicas formadoras de esporas del género *Bacillus*, frecuentemente conocidas como ASB (aeróbicas) portadores de esporas. (Barón et al., 1996).

La mayoría de las especies de *Bacillus* son saprófitas. Las endosporas de *Bacillus* no solo son resistentes a condiciones físicas y químicas hostiles, sino que también varias especies tienen propiedades fisiológicas inusuales que les permiten sobrevivir o prosperar en entornos hostiles, que van desde arenas del desierto y aguas termales hasta suelos árticos y desde aguas dulces hasta sedimentos marinos. El género incluye representantes termófilos, psicrófilos, acidófilos, alcalófilos, halotolerantes y halófilos, que son capaces de crecer a temperaturas, valores de pH y concentraciones de sal a las que pocos otros organismos podrían sobrevivir (Barón et al., 1996).

La presencia de endosporas le confiere al género de *Bacillus* su capacidad de diseminación y prevalencia en los ecosistemas, éstas se forman durante su segunda fase del ciclo de vida, el cual se encuentra conformado por una fase de crecimiento vegetativo y una fase de esporulación (Figura 1). Durante la primera etapa, la bacteria crece de forma exponencial mediante fisión binaria, ya que se encuentra en un medio con las condiciones favorables para su desarrollo. La segunda fase comienza como una estrategia de supervivencia en presencia de algún tipo de estrés (alta densidad de población, escasez de nutrientes, factores externos como salinidad, temperatura, pH, entre otros), así la célula vegetativa inicia la formación de la endospora, lo cual implica la división celular asimétrica, dando lugar a la formación de dos compartimentos, célula madre y la inmersión de una pre-espora. Posteriormente, la pre-espora es engullida, formando una célula dentro de la célula madre. Durante las etapas posteriores, la pre-espora es recubierta de capas protectoras (componentes proteicos, peptidoglicano y una pared que reside debajo de ésta, formada por células germinales), seguido de la deshidratación, y la maduración final de la pre-espora. Finalmente, la célula madre se lisa mediante muerte celular programada, liberando la endospora. La endospora puede permanecer viable en el ambiente hasta que las condiciones son favorables para iniciar sus procesos metabólicos y generar una célula vegetativa. Por lo anterior, la formación de endosporas resistentes al calor y desecación es una característica de importancia para la formulación de productos biotecnológicos a base de cepas de este género bacteriano. (Villarreal et al., 2018)

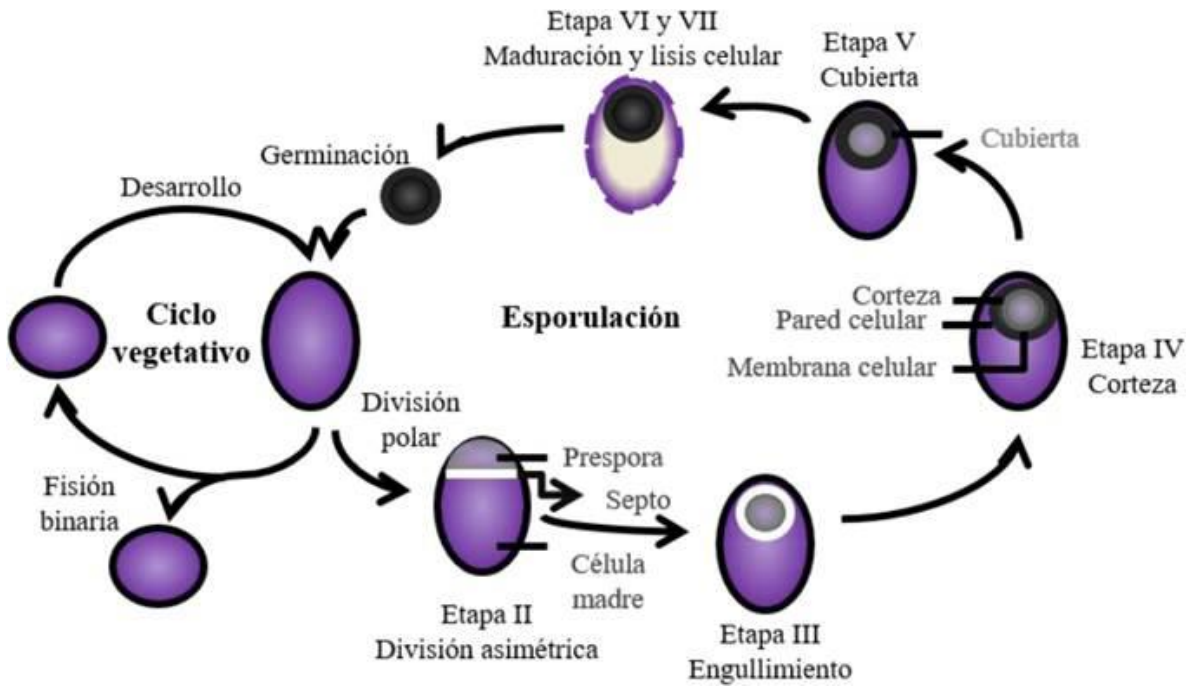


Figura 1 Ciclo de reproducción del género de *Bacillus* ((Villarreal et al., 2018)

La figura 2 muestra la estructura de una endospora de *Bacillus* generalizada (los detalles de la estructura difieren de una especie a otra). Se produce una espora por célula vegetativa. El protoplasma central, o célula germinal, lleva los constituyentes de la futura célula vegetativa, acompañados de ácido dipicolínico, que es esencial para la resistencia al calor de la espora. Alrededor del protoplasma hay una corteza que consiste principalmente en peptidoglicano (mureína), que también es importante en la resistencia al calor y la radiación de la espora. La capa interna, la membrana cortical o pared del protoplasma, se convierte en la pared celular de la nueva célula vegetativa cuando germina la espora. Las cubiertas de esporas, que constituyen hasta el 50% del volumen de la espora, la protegen de productos químicos, enzimas, etc (Villarreal et al., 2018)

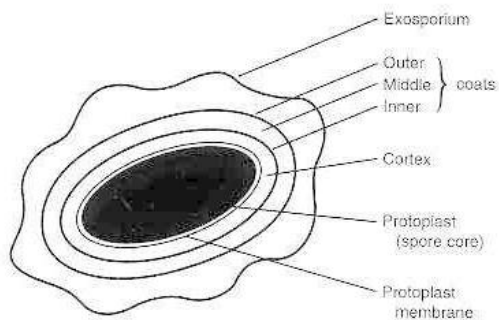


Figura 2 Corte transversal de una espora de la especie de *Bacillus* (Villarreal et al., 2018)

Los eventos involucrados en la esporulación de células vegetativas y en la germinación de esporas son complejos y están influenciados por factores como la temperatura, el pH y la disponibilidad de ciertos cationes divalentes y compuestos que contienen carbono y nitrógeno. Las esporas formadas bajo diferentes condiciones tienen diferentes estabilidades y grados de resistencia al calor, radiación, químicos, desecación y otras condiciones hostiles (Villarreal et al., 2018)

2.2.5 Metabolitos con potencial antimicrobiano

Algunas de las bacterias asociadas a la rizosfera, es decir, las PGPR, son reconocidas por su capacidad para promover el peso de las plantas y el rendimiento de los cultivos al (1) producir metabolitos secundarios antimicrobianos, (2) compitiendo por nichos y nutrientes, y (3) estimulando la resistencia sistémica inducida (ISR). Las especies de *Bacillus* se consideran importantes PGPR, ya que producen una amplia gama de metabolitos secundarios biológicamente activos que potencialmente pueden inhibir el crecimiento de patógenos de plantas y microorganismos rizosféricos nocivos (Ongena et al., 2008).

Además de su acción indirecta contra patógenos a través de la activación de ISR, se conocen dos familias de metabolitos secundarios sintetizados de forma no ribosomal por enzimas multimodulares, las policétido sintasas (PKS) y las péptidos

sintetasas (NRPS), que actúan en matrices de líneas de ensamblaje. Los componentes básicos monoméricos son ácidos orgánicos (policétidos) o aminoácidos (lipopéptidos), respectivamente, su síntesis depende de una enzima (Sfp) que transfiere la 4' - fosfopanteína de la coenzima A a las proteínas transportadoras de cadenas peptídicas o poliquétidas nacientes (Fan et al., 2019).

En los últimos años, numerosos estudios han demostrado que los lipopéptidos cíclicos (CLP) producidos por *Bacillus* spp. tienen una potente actividad antimicrobiana contra las cepas resistentes a los antibióticos y generalmente se pueden dividir en tres familias principales: surfactina, fengicina e iturina. Debido a su estructura anfifílica específica, los CLP destruyen principalmente los organismos objetivo al alterar directamente la integridad de la membrana plasmática o la pared celular de una manera similar a un detergente y, por lo tanto, muestran una menor propensión a desarrollar resistencia que los antibióticos convencionales (Lin et al., 2020).

Además, los CLP son biodegradables, biocompatibles, ecológicos, relativamente no tóxicos y resistentes a condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad (Pradhan et., al). Debido a muchas de estas características particulares que presentan los CLP antimicrobianos, los cuales son producidos de forma natural han recibido una mayor atención para ser tomados como opciones a nuevos candidatos antibióticos prometedores para su uso en aplicaciones alimentarias, farmacéuticas y biomédicas (Lin et al., 2020).

La actividad antibacteriana de los lipopéptidos cíclicos (CLP) contra varios patógenos como *Corynebacterium variabilis*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus aureus*, *B. subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* y *Xanthomonas campestris*, entre otros, ha sido atribuida a iturinas y surfactinas (Chen et al 2009).

La cepa de *Bacillus* alberga una serie de nueve grupos de genes gigantes que funcionan para producir un espectro de metabolitos secundarios bioactivos por megaenzimas organizadas modularmente, conocidas como péptido sintetasas no

ribosomales y policétido sintasas. Cinco de estos nueve grupos de genes (srf , bmy , fen , nrs y dhb) están involucrados en la síntesis de moléculas de lipopéptidos cíclicos, como la surfactina, la bacilomicina-D, la fengicina, un péptido desconocido y el sideróforo de hierro. bacillibactina. Mientras tanto, se informó que otros tres grupos de genes (*mln* , *bae* y *dfn*) dirigen la síntesis de policétidos antibacterianos, como macrolactina, bacillaeno y difficidina, y el último grupo de genes (*bac*) fue se informó que dirige la síntesis y exportación del dipéptido antibacteriano bacilisina (Chen et al., 2009).

De acuerdo con numerosos estudios *in vitro*, se asume ampliamente que la actividad antifúngica del género *Bacillus* se debe a la síntesis no ribosomal del LP cíclico bacilomicina D y fengycin, mientras que su actividad antibacteriana se debe principalmente a la síntesis ribosomal, policétidos, y bacilisina, y bacteriocinas sintetizadas ribosomalmente (Chowdhury et al., 2015).

2.3 *Bacillus velezensis*

Bacillus velezensis (velezen´sis. N.L. adj. masc. velezensis perteneciente a Vélez) llamado así por ser el primero en aislarse del río Vélez en Málaga, sur de España. La cepa se encontró en una muestra tomada en la boca del río Vélez en Torre del mar en la provincia de Málaga (sur de España) en abril de 1999 (Nakamura et., al).

Se realizaron pruebas fenotípicas y análisis filogenéticos a las diferentes cepas; estas indicaron que las cepas eran miembros del género *Bacillus* y estaban estrechamente relacionadas con *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*. Otros experimentos de hibridación ADN – ADN revelaron que las nuevas cepas poseían menos del 20% de similitud con otras especies de *Bacillus* y, por lo tanto, representaban una especie distinta de *Bacillus* (Rabbee et al., 2019).

En consecuencia, sobre la base de las diferencias en las características fenotípicas y quimiotaxonómicas y el carácter distintivo genético, deben reconocerse como una especie nueva del género *Bacillus*, para la que se propone el nombre *Bacillus velezensis*. Aprovechando la disponibilidad de un gran número de secuencias

genómicas reportadas, se puede distinguir de forma más detallada las subespecies de las bacterias; en este caso para la especie de *B. amyloliquefaciens* fueron reportadas dos subespecies: *B. amyloliquefaciens subsp. amyloliquefaciens* (cepa tipo DSM7 T) y *B. amyloliquefaciens subsp. plantarum* (cepa tipo FZB42 T) (Borriss et al., 2011).

Según el análisis filogenómico ampliado, *B. amyloliquefaciens subsp. plantarum* se mostró como un sinónimo heterotípico posterior de *B. velezensis*. Recientemente, diferentes cepas de *B. velezensis*, que es un PGPR típico, han recibido una atención considerable. Por ejemplo, las esporas vivas de *B. amyloliquefaciens* FZB42, ahora reclasificadas como una cepa de *B. velezensis* (Rabbee et al., 2019).

En el pasado los bacilos fitoestimuladores relacionados fueron objeto de intensos esfuerzos para aclarar su posición taxonómica. El grupo de rizobacterias formadoras de endosporas asociadas a plantas se conoce como miembro del complejo de especies *B. subtilis* (Fritze et al., 2004), que incluía originalmente *B. subtilis*, *B. licheniformis* y *B. pumilus* (Gondon et al., 1973). En 1987, se agregó la especie *B. amyloliquefaciens* (Priest et al., al).

Aprovechando la disponibilidad de un gran número de secuencias genómicas reportadas, se puede distinguir de forma más detallada las subespecies de las bacterias; en este caso para la especie de *B. amyloliquefaciens* fueron reportadas dos subespecies: *B. amyloliquefaciens subsp. amyloliquefaciens* (cepa tipo DSM7 T) y *B. amyloliquefaciens subsp. plantarum* (cepa tipo FZB42 T) (Borris et al., 2011).

2.3.2 Metabolitos producidos por *B. velezensis*

En *Bacillus velezensis*, se detectó una clase especial de PKS que carece del dominio AT afín y requiere una enzima AT discreta que actúa iterativamente en trans (trans-AT) (Shen et al., 2003). La proteína antiterminador ampliamente conservada LoaP (familia Nus G) se identificó como regulador de los grupos de genes de macrolactina y difficidina en *B. velezensis* FZB42 en el nivel de elongación de la

transcripción (Goodson et al., 2017). Desafortunadamente, la inestabilidad estructural de estos policétidos excluyó su uso como agentes antibacterianos, pero son potentes antifúngicos.

Los lipopéptidos son otra clase importante de metabolitos secundarios, también sintetizados de forma no ribosomal por enzimas multifuncionales gigantes (péptido sintetasa, NRPS). Similar a PKS, tres dominios catalíticos están involucrados en cada ciclo de elongación:

1. El dominio A (dominio de adenilación) selecciona su aminoácido afín.
2. El dominio PCP (dominio portador de péptidos) está equipado con un grupo prostético PPan al que se transfiere el sustrato de aminoácidos adenilados y se une como tioéster.
3. El dominio de condensación (dominio C) cataliza la formación de un nuevo enlace peptídico (Duitman et al., 1999). Es un compuesto antifúngico eficaz producido por FZB42

Casi el 10 % del genoma de FZB42 está implicado en la síntesis de compuestos antimicrobianos, como los policétidos bacillaeno, macrolactina y difficidina y los lipopéptidos surfactina, bacilomicina D y fengicina. En total, el genoma de FZB42 alberga 13 grupos de genes dedicados a la síntesis ribosómica y no ribosomal de metabolitos secundarios con supuesta acción antimicrobiana (Nakamura et al., 1999).

Cinco de un total de 13 grupos de genes están ubicados dentro de regiones variables del cromosoma FZB42, lo que sugiere que podrían adquirirse mediante transferencia horizontal de genes. (Chowdhury et al., 2015).

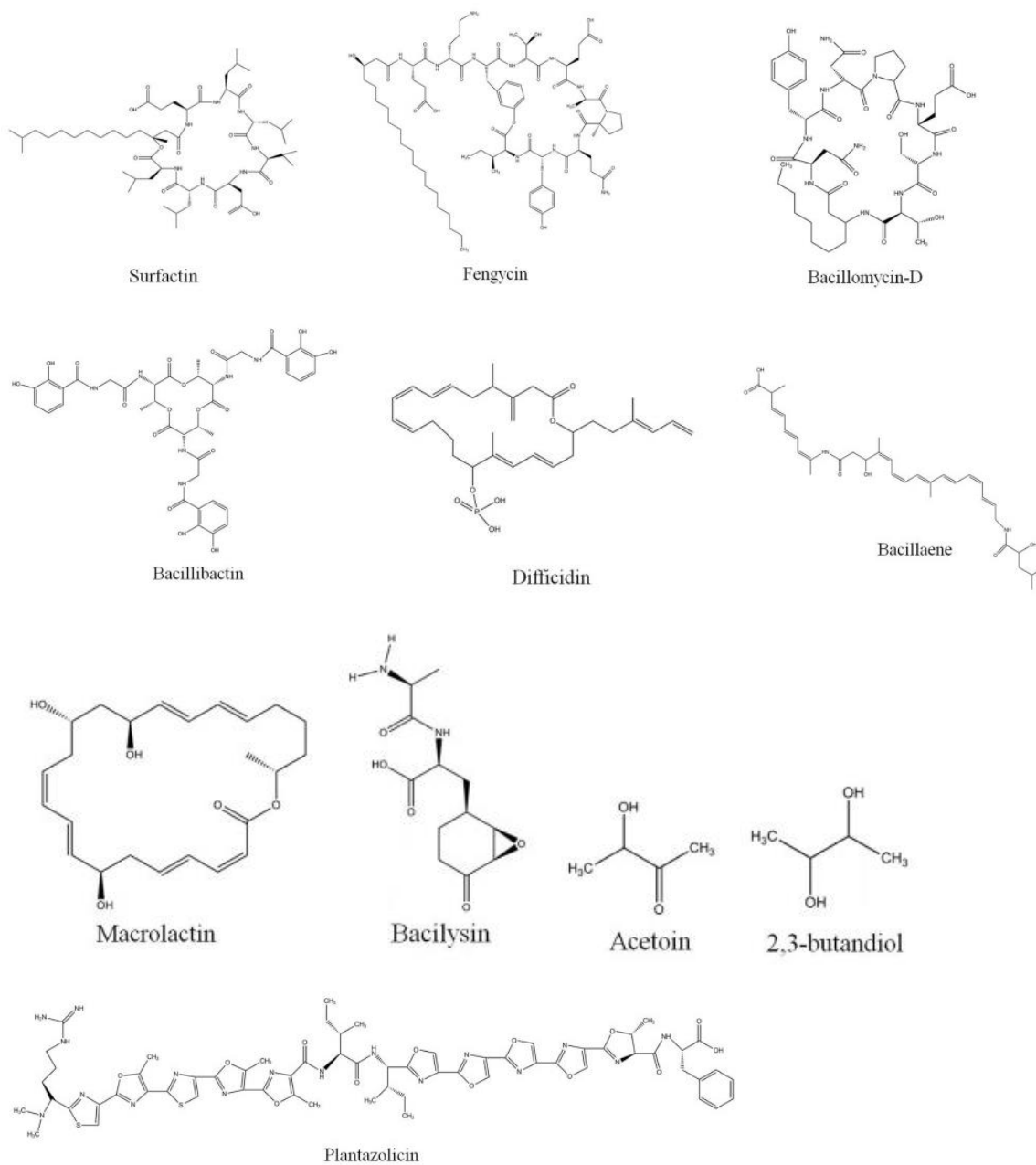


Figura 3 Estructuras moleculares de los compuestos bioactivos ribosómicos y no ribosómicos sintetizados por *B. velezensis* (Rabbee et al., 2019).

Metabolite	Genes and gene clusters	Enzyme	Size (kb)	Functions	Controlling Effects
		Nonribosomal synthesis of lipopeptides (LP)			
Surfactin	<i>urfABCD</i>	NRPS	32.0	Biofilm, Induction of ISR	Fungi
Fengycin	<i>fenABCDE</i>	NRPS	38.2	Induction of ISR	Fungi
Bacillomycin-D	<i>bmyCBAD</i>	NRPS/PKS	39.7	Induction of ISR	Fungi
Bacillibactin	<i>dhbABCDEF</i>	NRPS	12.8	Siderophore production	Microbial competitors
		Nonribosomal synthesis of polyketides (PK)			
Difficidin	<i>dfnAYXBCDEFGHIJKLM</i>	NRPS	71.1	Direct suppression	Bacteria
Bacillaene	<i>baeBCDE, acpK, baeGHIJLMNRS</i>	PKS/NRPS	74.3	Direct suppression	Bacteria
Macroactin	<i>mlnABCDEFGHI</i>	NRPS	53.9	Direct suppression	Bacteria
		Nonribosomal synthesis of dipeptide antibiotics			
Bacilysin	<i>bacABCDE, ywfg</i>	NRPS	6.9	Direct suppression	Bacteria, Cyanobacteria
		Ribosomal synthesis of bacteriocins			
Plantazolicin	<i>pznFKGHIJAC DBEL</i>	-	9.96	Direct suppression	Bacteria, Nematodes
Amylocyclin	<i>ac n BACDEF</i>	-	4.49	Direct suppression	Bacteria
		Synthesis of VOCs			
Acetoin and 2,3-butanediol	<i>alsD; bdhA</i>	Acetolactate synthase/decarboxylase and 2,3-butanediol dehydrogenase	3.6	Induction of ISR	Bacteria, Fungi

NRPS = nonribosomal peptide synthetases; PKS = polyketide synthases; ISR = induced systemic resistance; VOCs: volatile organic compounds.

Figura 4 Genes y grupo de genes identificados que codifican los metabolitos secundarios en B. Velezensis con potencial antimicrobiano (Rabbee et al., 2019)

La difcidina y la bacilisina son los compuestos antibacterianos más efectivos producidos por *Bacillus velezensis*; se informa que la bacilina, ejerce un efecto inhibidor contra *E. amylovora*, también posee actividad anticiano – bacteriana contra el alga nociva *Microcystis aeruginosa*, con una tasa de mortalidad del 98,78 % y, por lo tanto, puede utilizarse como agente de biocontrol dirigido. Mientras tanto, la bacilomicina-D y la fengycina de *B. velezensis* podrían desempeñar funciones redundantes en los mecanismos de defensa contra *Ralstonia solanacearum* (Cao et al., 2018).

3. ANTECEDENTES

3.1 *Bacillus* MH778713 ayuda a la fitorremediación de metales pesados por árboles de mezquite (*Prosopis laevigata*)

Se investigó la acumulación de metales pesados en árboles de mezquite (*Prosopis laevigata*) que crecen en suelos contaminados con aluminio, titanio, cromo y circonio de una región semiárida de México mediante análisis de fluorescencia de rayos X dispersivos de longitud de onda. Varios microorganismos tienen la capacidad excepcional de adaptarse a ambientes contaminados por metales, donde los organismos superiores no pueden ocurrir. Entre estos microorganismos se encuentra *Bacillus*. Se obtuvieron ochenta y ocho cepas bacterianas aisladas de nódulos de *P. laevigata* en agar manitol de levadura (YMA). Las secuencias de ARNr 16S obtenidas se compararon con las de cepas pertenecientes al género *Bacillus* recuperadas de las bases de datos Genbank/EMBL/DDBJ; de las 88 cepas aisladas de nódulos, seis de ellas dieron como resultado una alta tolerancia a Cr. Las cepas de *Bacillus* no lograron inducir la formación de nódulos, la coexistencia del género *Bacillus* con bacterias rizobiales en el nódulo de leguminosas y la capacidad de *Bacillus* para influir en el crecimiento y la aptitud de las plantas ha sido bien establecida. La cepa *Bacillus* MH778713 aislada de nódulos de *Prosopis* mostró una alta tolerancia al cromo (VI), más que cualquier otro microorganismo reportado hasta ahora. En comparación con otras especies de *Bacillus*, la cepa MH778713 de *Bacillus* mostró una mayor capacidad para eliminar el cromo (VI) de los medios acuosos, lo que podría ser beneficioso para las plantas que crecen en suelos con alto contenido de cromo (Ramírez et al., 2019).

3.2 *Bacillus cereus* MH778713 provoca protección de la planta de tomate contra *Fusarium oxysporum*

Las especies de *Bacillus* exhiben un arsenal de capacidades fisiológicas que les permiten vivir en numerosos entornos naturales. Varias especies de *Bacillus* han sido identificadas como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) y/o agentes de biocontrol que pueden estimular el crecimiento de las plantas y

conferirles tolerancia a los estreses bióticos y abióticos. Los PGPB estimulan el crecimiento de las plantas mediante la producción de fitohormonas, la adquisición de nutrientes como fósforo y nitrógeno y el control de patógenos mediante la producción de compuestos antimicrobianos y lipopéptidos. Varios *B. cereus* promueven el crecimiento de las plantas y provocan ISR contra patógenos de plantas, además promovió el crecimiento de la planta de tomate a través de los volátiles o mediante la inoculación directa en el sistema radicular. Los volátiles de *Bacillus cereus* MH778713 redujeron el crecimiento radial micelial de *F. oxysporum* en un 38%. Aunque *B. cereus* y otras especies de *Bacillus* producen volátiles antifúngicos, sus metabolitos difusibles son más antagonistas que estos compuestos volátiles (Ramírez et al., 2019).

4. JUSTIFICACIÓN

La multirresistencia de las bacterias a los diferentes tipos de antibióticos ha sido uno de los mayores problemas que se ha presentado en los últimos años en hospitales a nivel mundial. La emergencia y propagación rápida de estas bacterias altamente patógenas multirresistentes a los antibióticos en el ser humano, se ha convertido en uno de los problemas de mayor importancia de salud pública.

Staphylococcus aureus ha sido considerado uno de los principales patógenos intrahospitalarios de importancia clínica, debido a su gran capacidad de crear resistencia que ha presentado en los últimos años hacia los diferentes antibióticos. En México se han reportado múltiples casos de pacientes con infecciones causadas por *Staphylococcus spp.* multirresistente, las cuales fueron adquiridas intrahospitalariamente tanto en pacientes adultos como en pediátricos, lo que se ha ido convirtiendo en un problema que conlleva a un mayor riesgo de mortalidad, incremento de la estancia hospitalaria y costos en comparación con las infecciones causadas por bacterias susceptibles.

La aparición de la resistencia es inevitable después del uso de un antimicrobiano por tiempo prolongado los microorganismos más aptos sobreviven gracias a la adquisición de los mecanismos que les permiten evadir la acción del medicamento, es por eso por lo que en el presente trabajo se busca la selección de cepas de *Bacillus spp.* que sean capaces de inhibir el desarrollo de las cepas de *Staphylococcus*, para posteriormente poder desarrollar algún antimicrobiano con base en metabolitos producidos por *Bacillus* y poder contribuir para la solución de este problema hospitalario.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Analizar del antagonismo producido por *Bacillus spp.* contra aislados multidrogosresistentes de *Staphylococcus spp.*

5.2 objetivos específicos

- Analizar la multidrogosresistencia de una colección de cepas de *Staphylococcus aureus* provenientes de pacientes hospitalarios.
- Determinar la capacidad de inhibición que tiene una colección de cepas de *Bacillus spp* ante *Staphylococcus spp.* multidrogosresistentes.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 Materiales

- Cajas Petri de plástico
- Cajas Petri de vidrio
- Asa bacteriológica
- Varilla de vidrio
- Mechero
- Reactivos para preparar medio de cultivo
- Tubos de plástico
- Eppendorf
- Microviales
- Sensidiscos
 - Antibióticos: AM, CF, CFX, DC, CPF, CLM, GE, E, STX, PE, Va y TE
- Micropipetas

6.2 Material biológico

- Cepas bacterianas pertenecientes al Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana del instituto de Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, aisladas de la planta *Prosopis laevigata*.
 - *Bacillus velezensis* LEM1054
 - *Bacillus* LEM1061
- Cepas de *Staphylococcus* pertenecientes al Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana del instituto de Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
 - *Staphylococcus aureus* Sac 1
 - *Staphylococcus aureus* Sac 2
 - *Staphylococcus aureus* Sac 5
 - *Staphylococcus aureus* ATCC

- Cepas de *Staphylococcus spp.* pertenecientes al Laboratorio de microbiología hospitalaria y de la comunidad del Instituto de Ciencias Microbiológicas, aisladas de distintas muestras, donadas por la Dra. Rosa Rocha

Sac 4	ECoNRM S. xilosus Queso fresco Q211	Queso Q230 SRM	ROIH 020813 sta	ROIH 00071gsr sta
Sac 5	09 – TV SAMR	218 sta. sp. man (+)	ROIH 000719RB sta	ROIH030228 sta
Sac 6	299 sta. sp. man (+)	334 – C SAMR	ROIH 021005 staphy	ROIH 000719RO sta
Sac 9	ECoNRM control + MecA LMHyC 122	520 bj sta. sp man (+)	ROIH 001118 sta	ROIH 210 sta
S. aureus ATCC	ECoNRM S. epidermidis leche cruda vaca Tecamachalco L192	ROIH 0104705 sta	ROIH 207rbsB staphy	ROIH MH sta

- Cepas bacterianas de *Bacillus* pertenecientes y donadas por el Laboratorio del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, perteneciente al instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

1085-A	1084	1012	1051
1085-B	1010	1013	1082
1088	1071	1014	1033
1087	1075	1074	1015
1056	1080-A	1078	1069
1058	1076	1047	
1062	1081	1083	

6.3 Equipos

Equipo	Marca	Modelo
Pipeta automática	Scilogex	Levo plus
Balanza analítica	SHIMADZU	UW240H
Incubadora	Lab-Line	Imperial III
Incubadora con agitación	Labnet	Orbit 1900
Centrifuga	eppendorf	Centrifugue 5804 R
Vortex	VORTEX-GENIE-2 (Scientific Industries)	G-560
Campana de extracción	SEV	CFLV-102

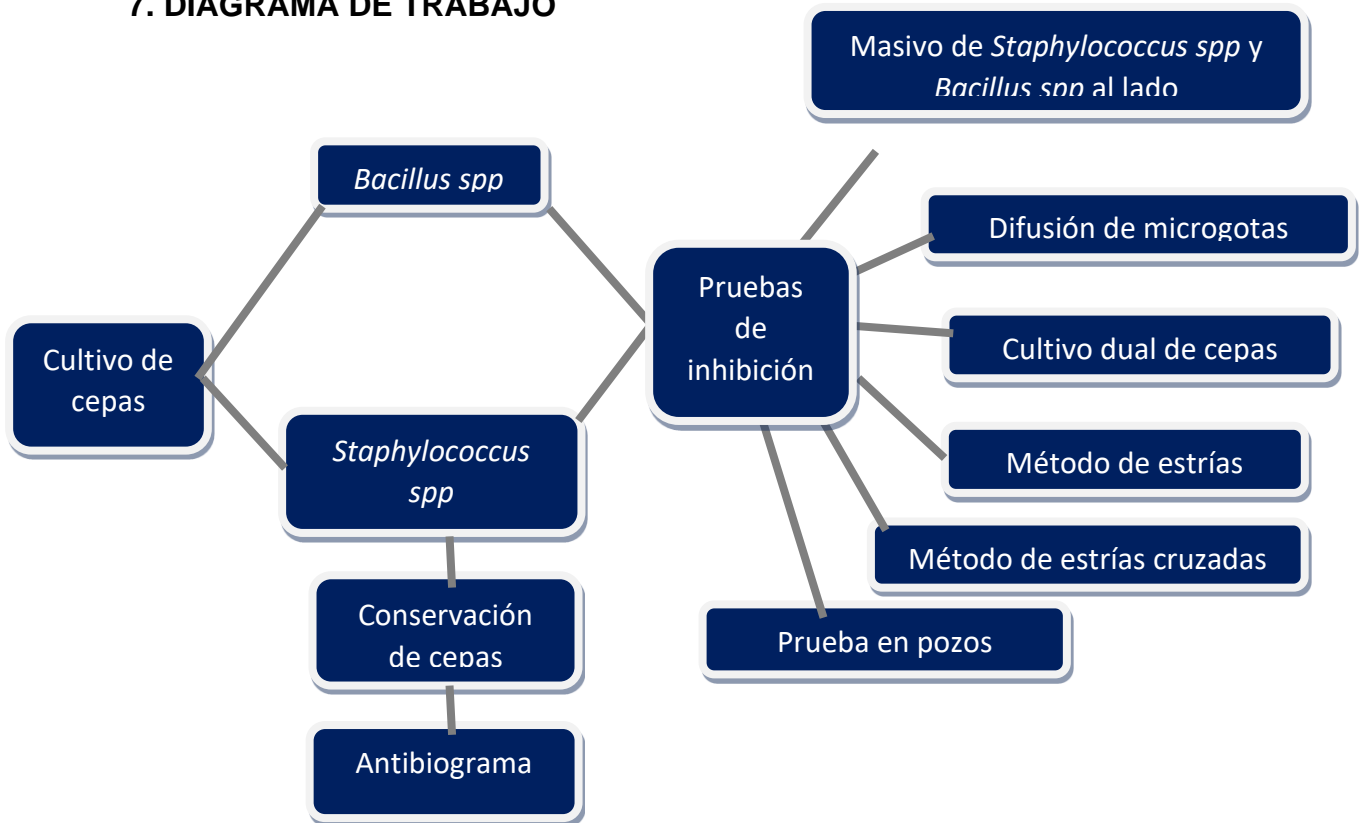
Tabla 1 Equipos de laboratorio ocupados junto con la marca y modelo de cada uno de estos.

6.4 Métodos

Determinación	Método	Referencia
Prueba de antibiograma	Método de Kirby Bauer	Recalde M et al,2018
Prueba de inhibición	Cultivo en masivo de Staphylococcus y bacillus al lado	
Prueba de inhibición	Difusión con microgotas	Souza, N. C
Prueba de antagonismo	Cultivo dual de Staphylococcus y Bacillus	
Prueba de antagonismo	Método de estrías	
Prueba de antagonismo	Método de estrías cruzadas	Lertcanawanichakul, et al., (2011)
Prueba en pozos	Método de difusión en pozos	Lertcanawanichakul, et al., (2011)

Tabla 2 Determinaciones que se realizaron y el método ocupado para realizar cada una de estas

7. DIAGRAMA DE TRABAJO



8. METODOLOGÍA

8.1 Cultivo de cepas

8.1.1 Staphylococcus

Se preparó el medio de cultivo en el que se va a sembrar, en este caso el medio de cultivo elegido fue en medio sólido agar Luria-Bertani (LB); este se preparó bajo las siguientes especificaciones: 5 gr de extracto de levadura, 10 gr de NaCl, 10 gr de Peptona, 18 gr de agar bacteriológico, 1 L de agua destilada y se mide un pH de 6.8. Este medio se esterilizará y se verterá en placas estériles de 90 mm de diámetro, posteriormente se realiza la prueba de esterilidad dejándolo en la incubadora por 24 horas a 28°C.

En este medio se sembraron las cepas de *Staphylococcus* spp. donadas por los diferentes laboratorios; estas fueron inoculadas por el método de estría cruzada para así obtener un mejor aislamiento de las distintas cepas, estas se incubaron de 24 a 48 horas dependiendo de su crecimiento, con una temperatura de 28°C y posteriormente serán refrigeradas a -5°C para su conservación.

8.1.2 Bacillus spp.

Se preparó el medio de cultivo Levadura Manitol (YMA) bajo las siguientes condiciones; 10 gr de manitol, 1 gr de extracto de levadura, 0.66 gr de K₂HPO₄, 0.5 gr de glutamato de sodio, 0.05 gr de NaCl, 10 mL de Solución T (MgSO₄ * 7H₂O 10g/L), 1 mL de solución U (CaCl₂ 40 g/L), 1 mL de solución V (FeCl₃ * 6H₂O 4g/L), 18 gr de agar bacteriológico, 1 L de agua destilada y ajustar el pH a 6.8. Éste se esterilizará y verterá en cajas Petri y se le realizará prueba de esterilidad.

Una vez ya teniendo las placas listas se sembraron las cepas de *Bacillus* obtenidas del laboratorio en las placas de medio YMA por medio de la técnica de estría cruzada, estas se dejaron incubando por 24 horas a 28°C para su posterior refrigeración a -5 °C.

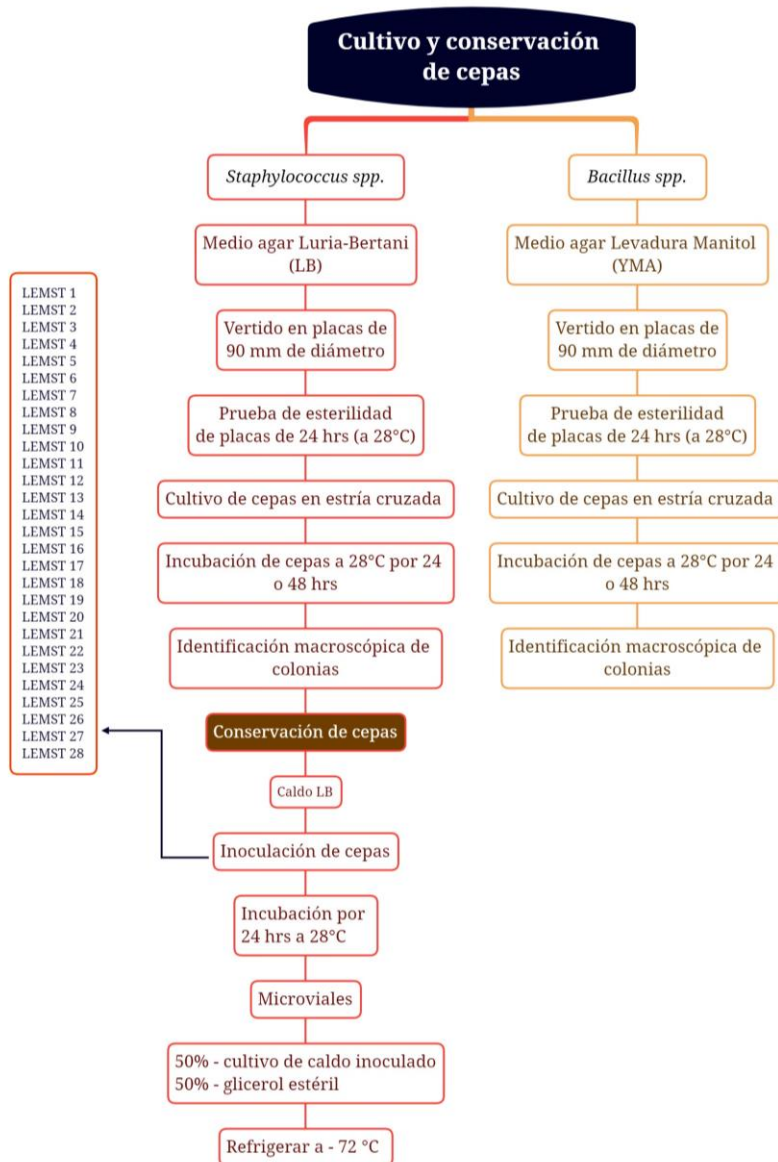


Figura 5 Procedimiento del cultivo y conservación de las cepas trabajadas

8.2 Prueba de antibiograma

Para esta prueba primero se inocularon las cepas de *Staphylococcus spp.* en medio líquido LB, luego se incubaron por 24 horas a 29°C en agitación constante. Para posteriormente medir la densidad óptica del cultivo realizado para así tener una estandarización de crecimiento del cultivo; esto se realizó tomando una muestra de 800 µL y colocarla en una celda de cuarzo, para luego medir la densidad a una

longitud de onda igual de 600 nm y absorbancia en el espectrofotómetro. Obteniendo así una absorbancia igual a 0.09, lo que correspondería a una escala de 0.5 de Mcfarlad, teniendo así una densidad óptica de 1.5×10^8 UFC/mL.

Esta prueba se realizó mediante la metodología de Kirby-Bauer por lo que se ocuparon placas con agar Müller Hilton ya que este es un medio de cultivo nutritivo y no selectivo por lo que deja crecer a la gran parte de microorganismos, se tomó con la micropipeta un inóculo de 200 μ L del cultivo en caldo de *Staphylococcus spp*; luego este se sembró en masivo sobre la placa con la ayuda de una varilla de vidrio, una vez sembrada la cepa se dejaron secar, posteriormente con unas pinzas estériles se tomaron los sensidiscos con antibióticos el cual se colocaron la placa ya inoculada con la bacteria. Estas se dejaron incubar por 18 horas a una temperatura de 29°C; por último, se realizaron la lectura y medición con ayuda de un vernier de los halos de inhibición que se presenten en cada uno de los Sensidiscos.

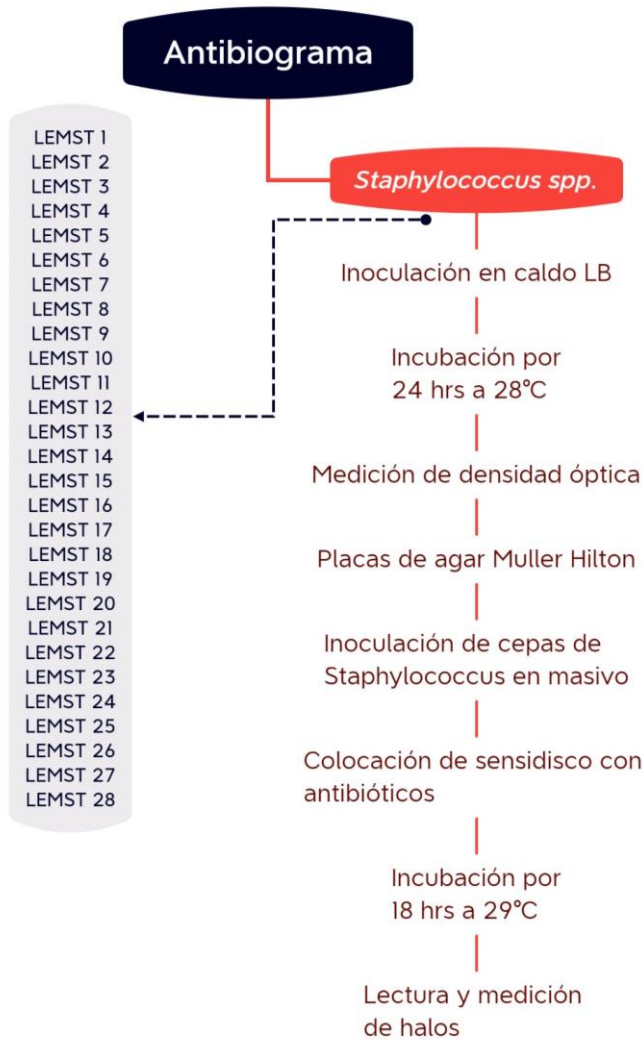


Figura 6 Procedimiento de la realización de antibiogramas a las cepas de *Staphylococcus*

8.3 Método de estrías cruzadas

Para esta prueba primero se ocuparon cultivos en caldos, se vertieron 5 mL de caldo LB en tubos y se tomó una asada del cultivo de *Staphylococcus spp.* y se inocularon en los tubos con el caldo; igualmente se vertieron 5 mL de caldo YM en tubos y se inocularon tomando una asada de la cepa de *Bacillus* seleccionado. Estos tubos se llevaron a incubación por 24 horas a 28°C en agitación constante.

Posterior a esto se ocuparon placas con medio solido LB en donde se sembró primero el *Bacillus* en la parte de en medio de la placa, para esto primero las cepas ya inoculadas en caldo se llevaron a agitación en el Vortex y posteriormente con el asa se tomó una pequeña gota del caldo ya inoculado con la cepa y se colocó en línea recta en la parte media de la placa. Esto se realizó con cada una de las cepas de *Bacilos* por duplicado y se dejaron en incubación por 24 horas a 28°C. Posterior a la incubación del *Bacilo spp.*, se inocularon en la misma placa los tres *Staphylococcus* seleccionados; esto se realizó tomando con el asa una pequeña gota del caldo inoculado con el *Staphylococcus* y colocándolo en línea horizontal al cultivo de *Bacillus* tratando de no tocar con este; la siembra de *Staphylococcus spp.* debe hacerse tomando en cuenta que entre estos queden distanciados para una buena observación, como controles negativos se sembraron las cepas de *Bacillus* y *Staphylococcus* en placas separadas. Por ultimo las placas se llevaron a incubación por 24 horas a 28°C, pasado esto se observaron los resultados obtenidos.

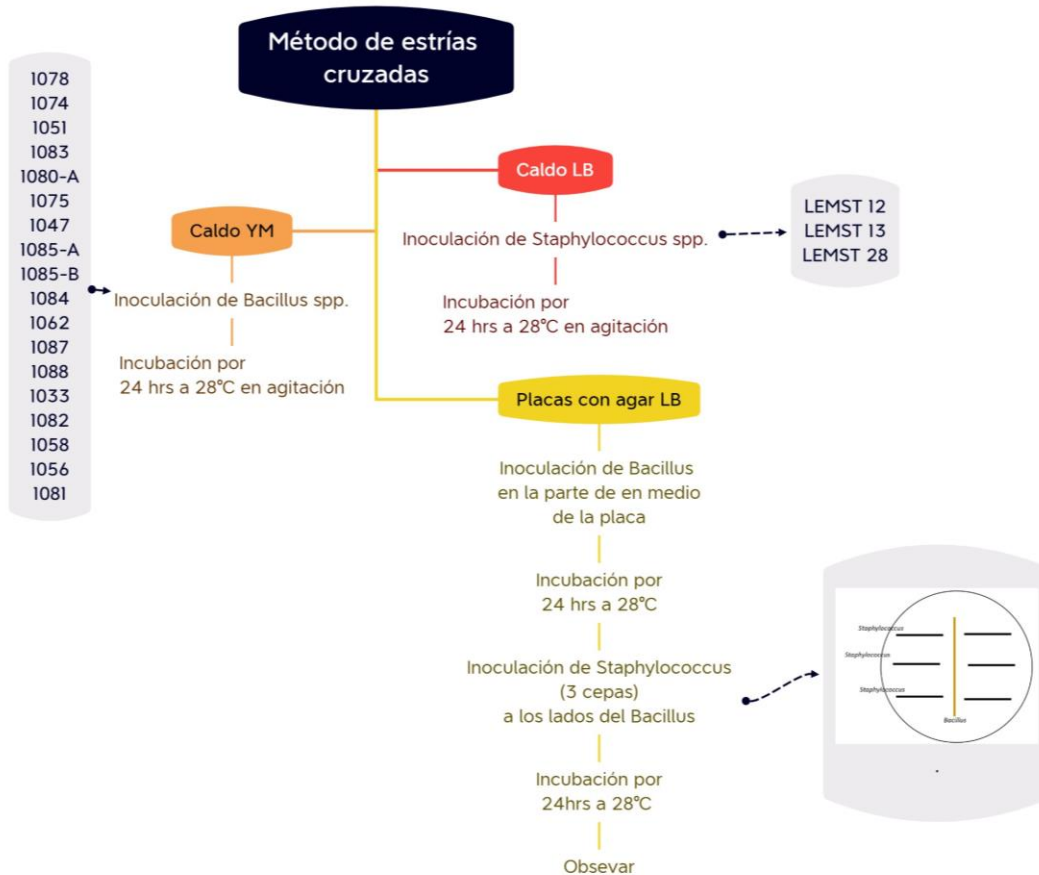


Figura 7 Procedimiento del método de estrías cruzadas

8.4 Método de estrías

Para esta prueba se ocuparon placas con medio de cultivo LB; se tomó una asada de cultivo de *Staphylococcus* y este se colocó en la parte de en medio de la placa formando una línea lo más recta posible, posteriormente se tomó una asada de la cepa de *Bacillus* y se realizaron dos líneas a los lados del inoculo de *Staphylococcus* procurando no tocar la cepa y hacer las líneas lo más rectas posible. Esto mismo se realizó con cada una de las cepas de *Staphylococcus* colocándola con cada cepa *Bacillus* y cada una de estas pruebas se realizó por duplicado.

Por último, se tomaron como controles negativos las placas donde solo se inoculó la cepa de *Staphylococcus* y otra donde solo está inoculada la cepa de *Bacillus*.

Todas las placas se llevaron a incubación por 24 horas a 28°C; pasado el tiempo se realizó la observación de resultados de las placas.

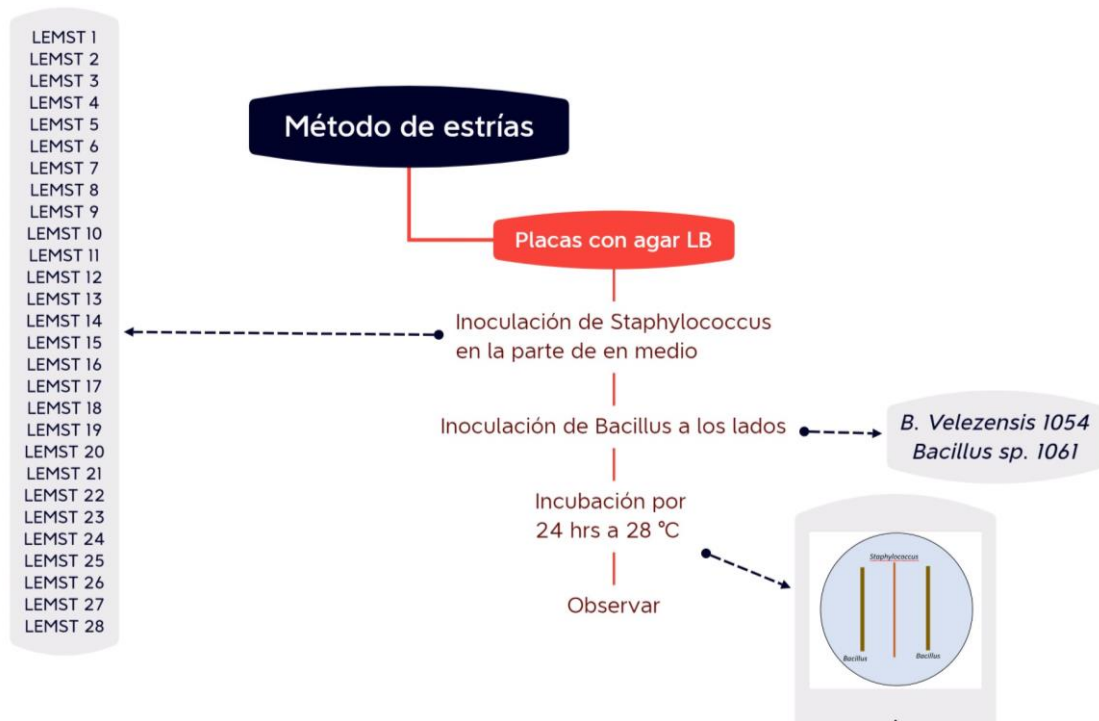


Figura 8 Procedimiento del método de estrías

8.5 Prueba de pozos

En esta prueba se ocuparon cultivos en caldos, se vertieron 5 mL de caldo LB en tubos y se tomó una asada del cultivo de *Staphylococcus* y se inoculó en los tubos con el caldo; igualmente se vertieron 15 mL de caldo YM en tubos y se inocularon tomando una asada de la cepa de *Bacillus* seleccionado. Estos tubos se llevaron a incubación por 24 horas a 28°C en agitación constante, una vez pasado el tiempo se llevaron a la centrifuga los tubos donde se inocularon las cepas de *Bacillus*, estos se centrifugaron por 30 minutos a 5,000 rpm, ya terminado el tiempo de la centrifuga se retiró inmediatamente el sobrenadante obtenido pasándolo a otros tubos estériles.

Posteriormente se ocuparon placas de agar LB donde se sembraron por la técnica de extendido en placa las cepas de *Staphylococcus* tomando 120 μ L del inóculo del caldo antes realizado y estas se dejaron secar para luego con mucho cuidado y sin que se rompa el agar se realizaron los pozos en este alrededor de toda la placa dejando un espacio considerable entre uno y otro, en cada uno de estos pozos se depositó 10 μ L del sobre nadante obtenido de las cepas de *Bacillus*.

En cada uno de los pozos se inocularon cada una de las cepas de *Bacillus* y en el del medio se designó como el control negativo colocando únicamente caldo YM sin inocular. Esta prueba se realizó por triplicado para cada cepa de *Staphylococcus* spp. Posterior a esto se dejó incubar por 24 horas a 28°C para después observar los resultados obtenidos.

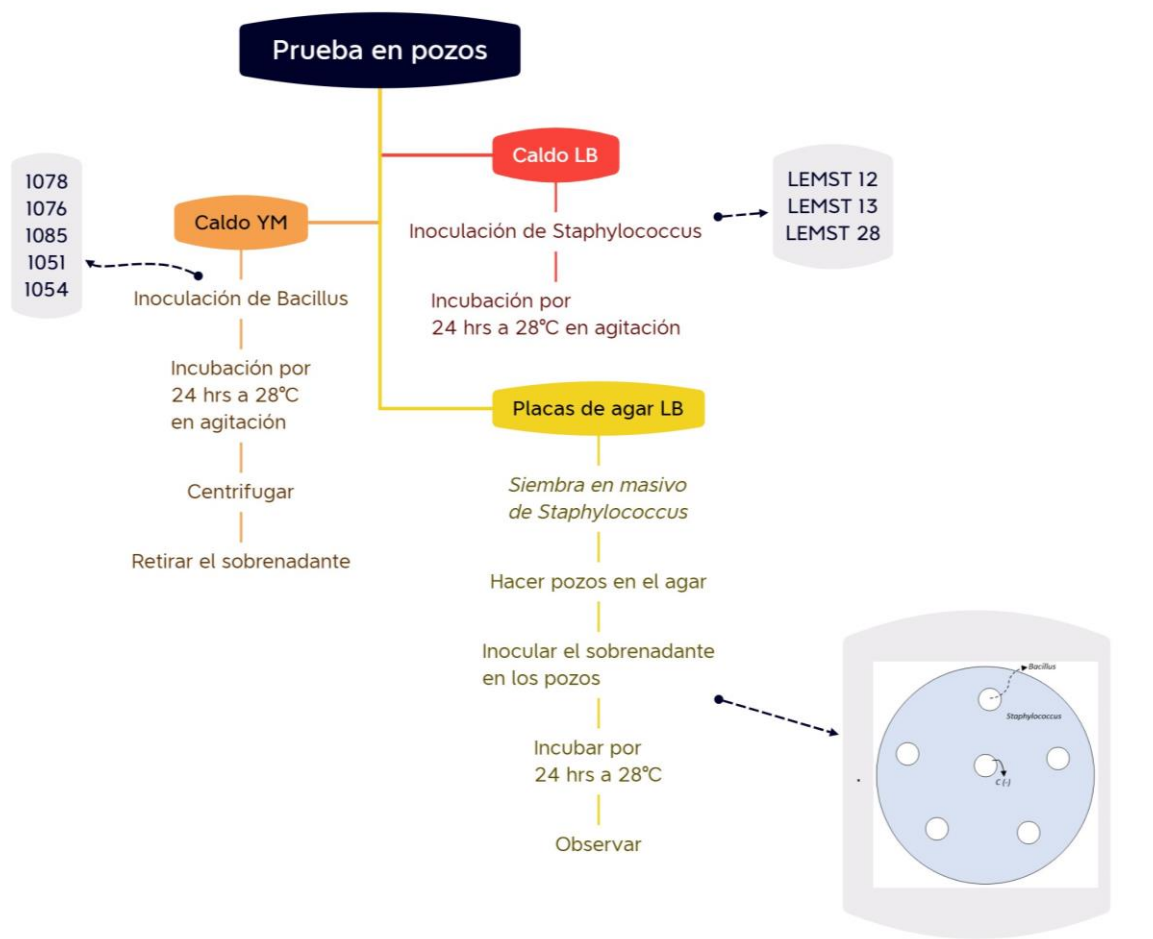


Figura 9 Procedimiento de la prueba en pozos

8.6 Cultivo en masivo de *Staphylococcus* sp. y *Bacillus* a un lado

Primero para esta prueba se vertieron 5 mL de caldo LB en tubos de tapa azul de 15 mL, posteriormente se inocularon tomando una asada del cultivo de *Staphylococcus* y colocándola en el caldo LB; todos los tubos inoculados se incubaron por 24 horas a 28°C.

Luego de esto se inocularon placas de medio LB las cuales se inocularon con las cepas de *Staphylococcus spp.* previamente cultivadas en caldo, para esto se tomaron 120 µL del cultivo en caldo del *Staphylococcus* y se colocó en la placa, sembrando por la técnica de masivo con la ayuda de una varilla de vidrio, esto se realizó por triplicado para cada una de las cepas de *Staphylococcus spp.* Después se inocularon de forma horizontal a cada lado de la placa una asada de la cepa de *Bacillus* colocando cada cepa a cada lado de la placa; estas se incubaron por 24 horas a 28°C para su posterior observación de resultados

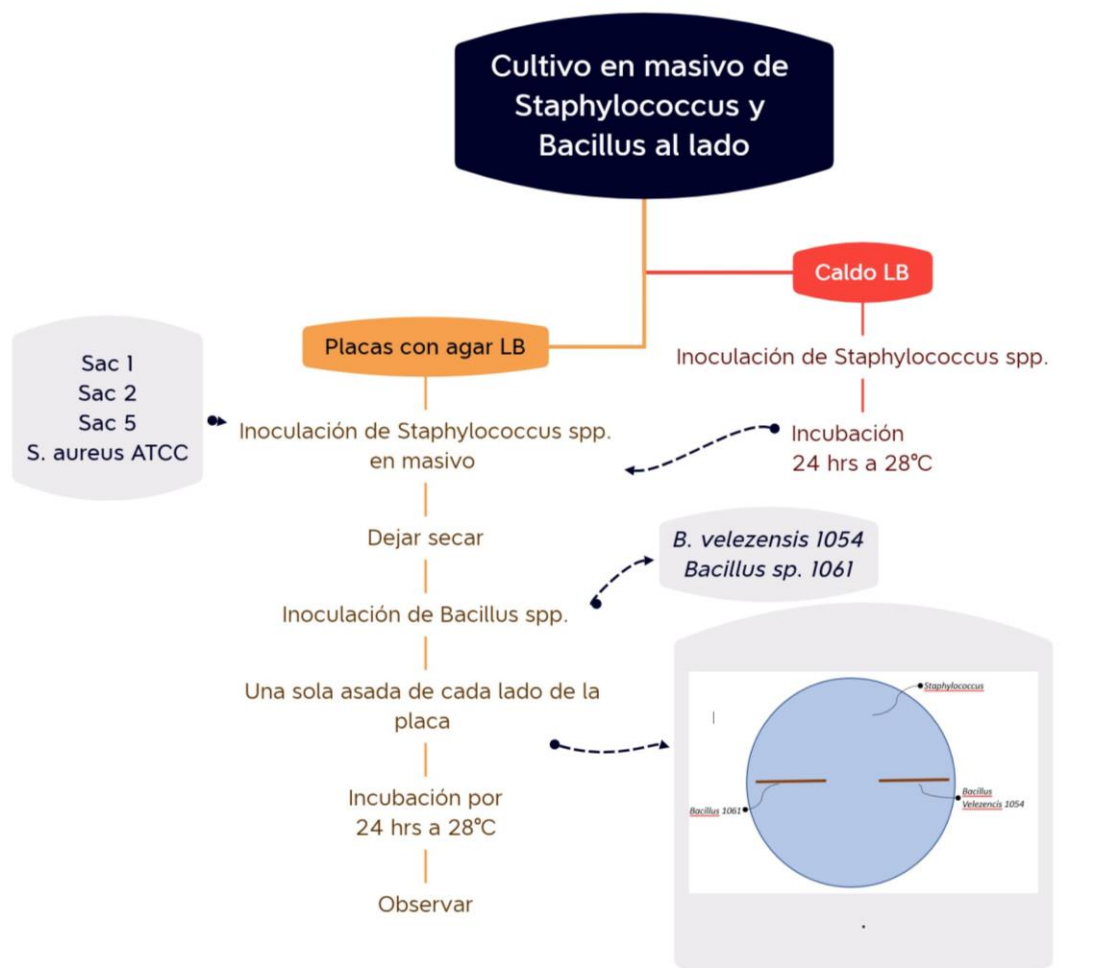


Figura 10 Procedimiento de la prueba del cultivo en masivo de *Staphylococcus* y *Bacillus* al lado

8.7 Cultivo dual

En esta prueba se ocuparon placas con agar LB, en estas se realizó una siembra doble, donde la placa se dividió imaginariamente por la mitad; de un lado se inoculó con una cepa de *Staphylococcus* por la técnica de masivo y del otro lado sin tocar la cepa ya inoculada se va a sembrar la cepa de *Bacillus* igualmente por el método de masivo. Este proceso se realizó con cada una de las cepas de *Staphylococcus* seleccionada, colocándola junto con cada una de las cepas de *Bacillus*.

También se realizaron controles negativos donde se sembraron por separado cada una de las cepas de *Staphylococcus* y de *Bacillus*. Todas las placas se llevaron a

incubación por 24 horas a una temperatura de 28°C y pasado este tiempo se observaron los resultados.

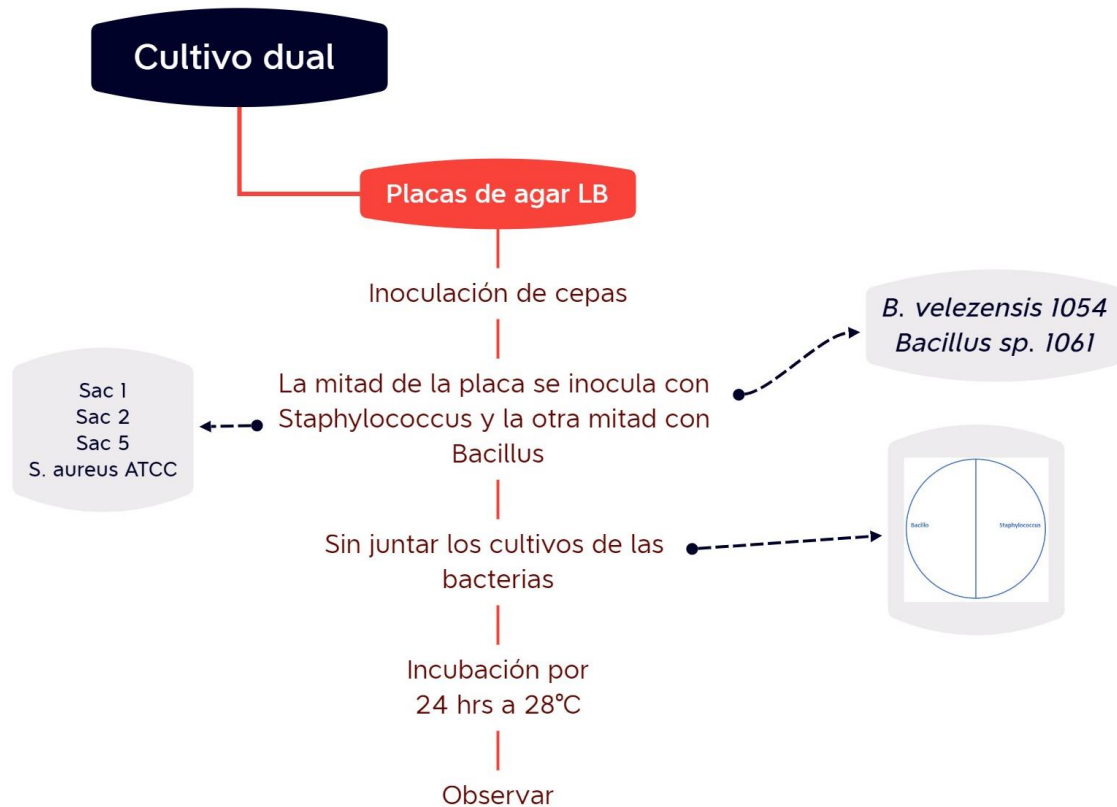


Figura 11 Procedimiento de la prueba de cultivo dual

8.8 Difusión de microgotas

En esta prueba se ocuparon cultivos en caldo, en donde se vertieron 5 mL de caldo LB en tubos y se inocularon tomando una asada del cultivo de *Staphylococcus*, igualmente se vertieron 5 mL de caldo YM en tubos y se inocularon tomando una asada de la cepa de *Bacillus* seleccionado. Estos tubos se llevaron a incubación por 24 horas a 28°C en agitación constante.

Luego se ocuparon placas con agar LB donde se inocularon con 120µL de cultivo de *Staphylococcus* para realizar una siembra en masivo con ayuda de una varilla de vidrio, esto se realizó con cada una de las cepas de *Staphylococcus* y se dejaron

secar por completo. Una vez secas se tomaron 10 μ L de cada una de las cepas de *Bacillus* y se colocó una gota a cada lado de la placa, quedando así cada cepa de *Bacilo* una al contrario de la otra y se esperó a que esta también se seque. Se incubaron por 24 horas a una temperatura de 28 °C. Posteriormente se realizó la observación y anotaciones de los resultados.

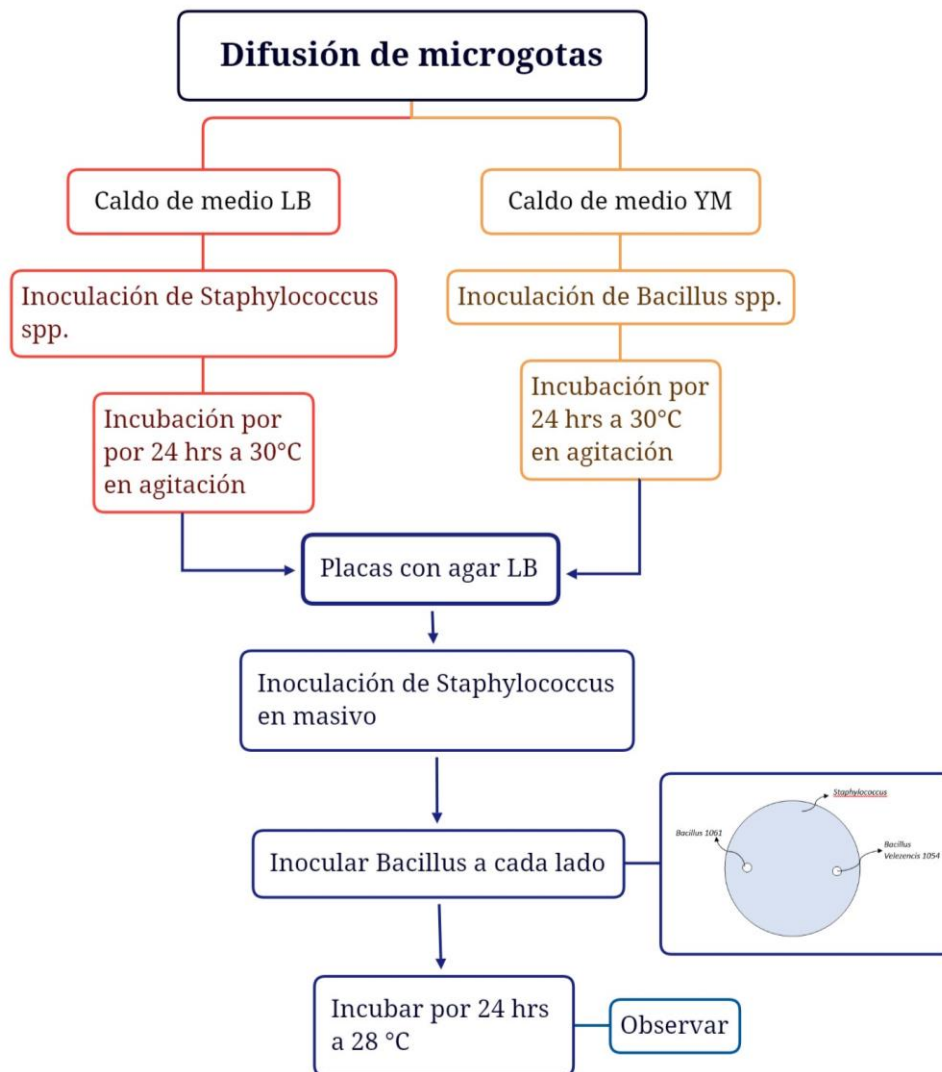


Figura 12 Procedimiento de la prueba de difusión de microgotas

9. RESULTADOS Y DISCUSION

9.1 Aislamiento e identificación de cepas

El objetivo de este procedimiento es el aislar, purificar e identificar de forma adecuada a las diferentes cepas bacterianas que fueron donadas por los diferentes laboratorios, para así poder tener cepas puras de *Staphylococcus spp.* y de *Bacillus spp.* con las que se van a trabajar y quitar sesgos de contaminación.

La mayoría de las cepas bacterias sembradas lograron aislarse con gran efectividad y sin problemas de contaminación.

Las cepas de *Staphylococcus* fueron aisladas correctamente en medios de cultivo LB, se eligió este medio para estas cepas debido a que es un medio de cultivo altamente nutritivo, de fácil elaboración y permite el crecimiento de una gran variedad de cepas; dentro de sus compuestos está el cloruro de sodio el cual también ayuda a mantener un equilibrio osmótico en el medio. Las cepas de *Staphylococcus* fueron renombradas para su fácil identificación y control de cepas.

Nombre Laboratorio de Ecología Molecular – Staphylococcus (LEM – ST)	Cepa
LEM – ST 1	Sac 1
LEM – ST 2	Sac 2
LEM – ST 3	Sac 3
LEM – ST 4	Sac 4
LEM – ST 5	Sac 5
LEM – ST 6	Sac 6
LEM – ST 7	Sac 9
LEM – ST 8	S. aureus ATCC
LEM – ST 9	ECoNRM S. xilosus Queso fresco Q211

LEM – ST 10	09 – TV SAMR
LEM – ST 11	299 sta. sp. man (+)
LEM – ST 12	ECoNRM control + MecA LMHyC 122
LEM – ST 13	ECoNRM S. epidermidis leche cruda vaca Tecamachalco L192
LEM – ST 14	Queso Q230 SRM
LEM – ST 15	218 sta. sp. man (+)
LEM – ST 16	334 – C SAMR
LEM – ST 17	520 bj sta. sp man (+)
LEM – ST 18	ROIH 0104705 sta
LEM – ST 19	ROIH 020813 sta
LEM – ST 20	ROIH 000719RB sta
LEM – ST 21	ROIH 021005 staphy
LEM – ST 22	ROIH 001118 sta
LEM – ST 23	ROIH 207rbsB staphy
LEM – ST 24	ROIH 00071gsr sta
LEM – ST 25	ROIH030228 sta
LEM – ST 26	ROIH 000719RO sta
LEM – ST 27	ROIH 210 sta
LEM – ST 28	ROIH MH sta

Tabla 3 Reasignación de nombres a las diferentes cepas de Staphylococcus pertenecientes al Laboratorio de microbiología hospitalaria y de la comunidad del Instituto de Ciencias Microbiológicas, aisladas de distintas muestras, donadas por la Dra. Rosa Rocha

Cada una de estas cepas fue incubada por 24 horas a una temperatura de 28 °C; sin embargo, algunas de las cepas no tuvieron un buen crecimiento por lo que se decidió que se dejaran en la incubadora por 48 horas en total a la misma temperatura. En general todas las cepas de *Staphylococcus* crecieron bien dentro de las primeras 24 horas de incubación, a excepción de las cepas de

Staphylococcus LEMST 6, LEMST 9, LEMST 12 y LEMST 13 que se tuvieron que incubar por 48 horas.

Cada una de las cepas fue identificada adecuadamente debido a su característica morfología colonial que presenta en este medio.

Para las cepas de *Bacillus* se inocularon en medio YMA, este medio es de los mayormente ocupados para *Bacillus* ya que muestra la capacidad de *Bacillus* de utilizar el manitol por lo que lo hace un medio selectivo y diferencial. Cada una de las cepas fue aislada e identificada adecuadamente; estas se sembraron por el método de estría cruzada y se incubaron por 24 horas a una temperatura de 28 °C, todas las cepas crecieron adecuadamente por lo que no fue necesario dejarlas más tiempo en incubación.

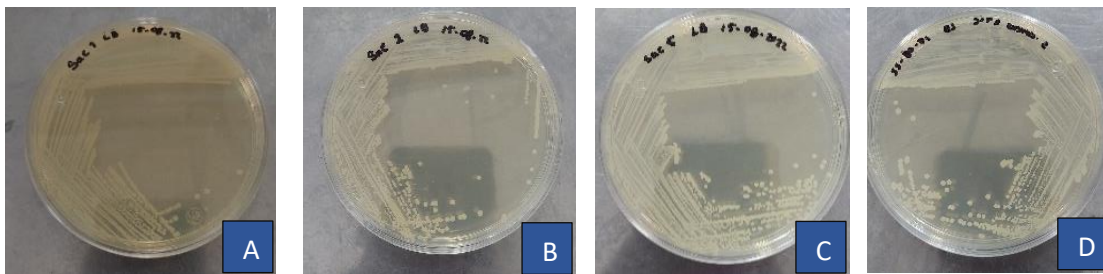


Figura 13 Primeros cultivos de las cepas de *Staphylococcus* que fueron donadas por al Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana del instituto de Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, cultivadas en medio de cultivo agar LB. A) S.LEM ST 1. B) S. LEMST 2. C) S. LEMST 5. D) S. LEM 5Laboratorio del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas

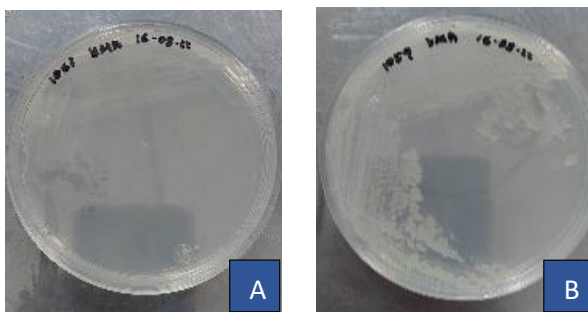
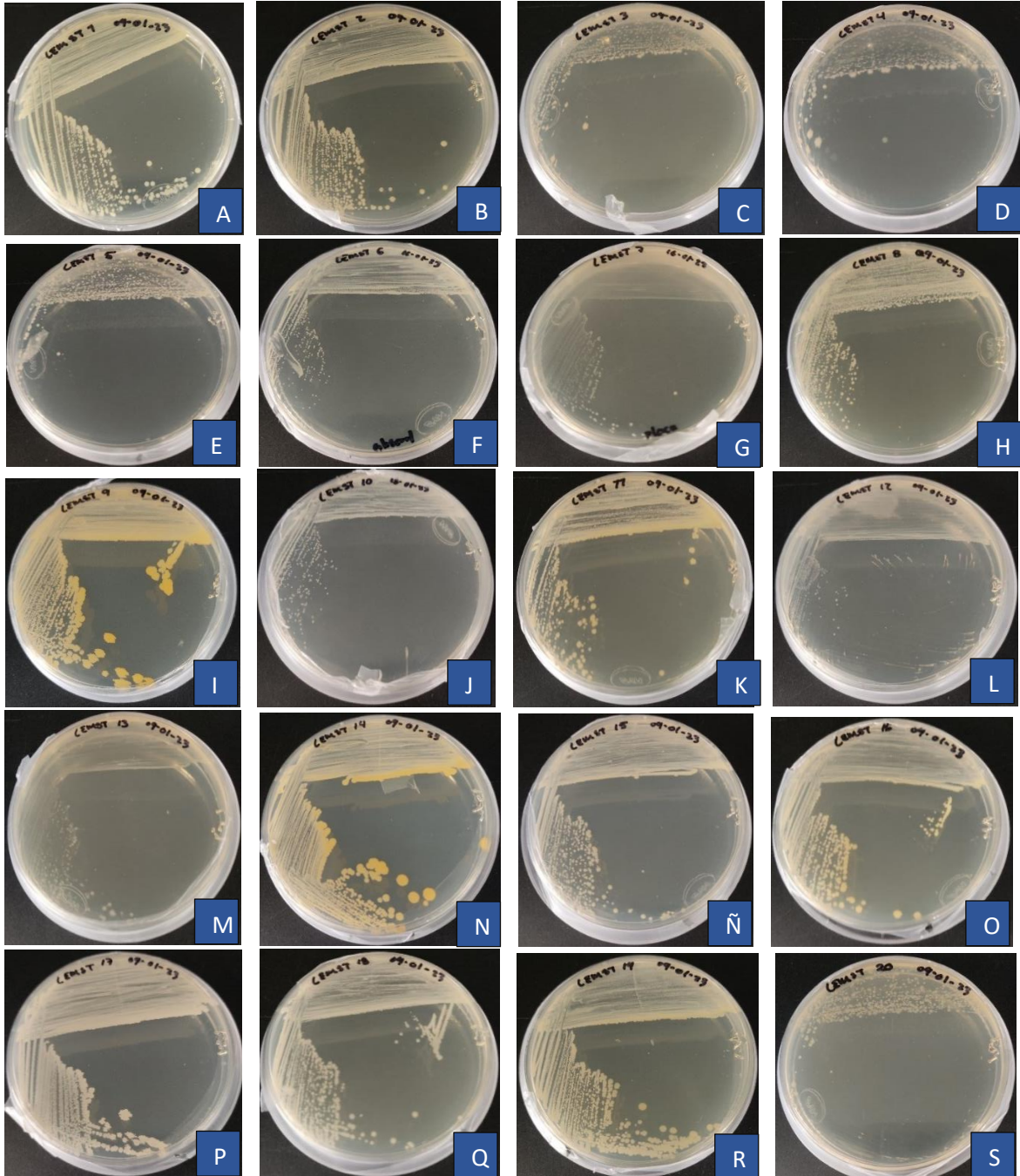


Figura 14 Cultivo de las cepas de *Bacillus* pertenecientes al Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana del instituto de Ciencias Microbiológicas de la Benemérita

Universidad Autónoma de Puebla, aisladas de la planta *Prosopis laevigata*. En medio de cultivo agar YM. A) *Bacillus* sp 1061. B) *Bacillus velezensis* 1054.



T

U

V

W¹⁶

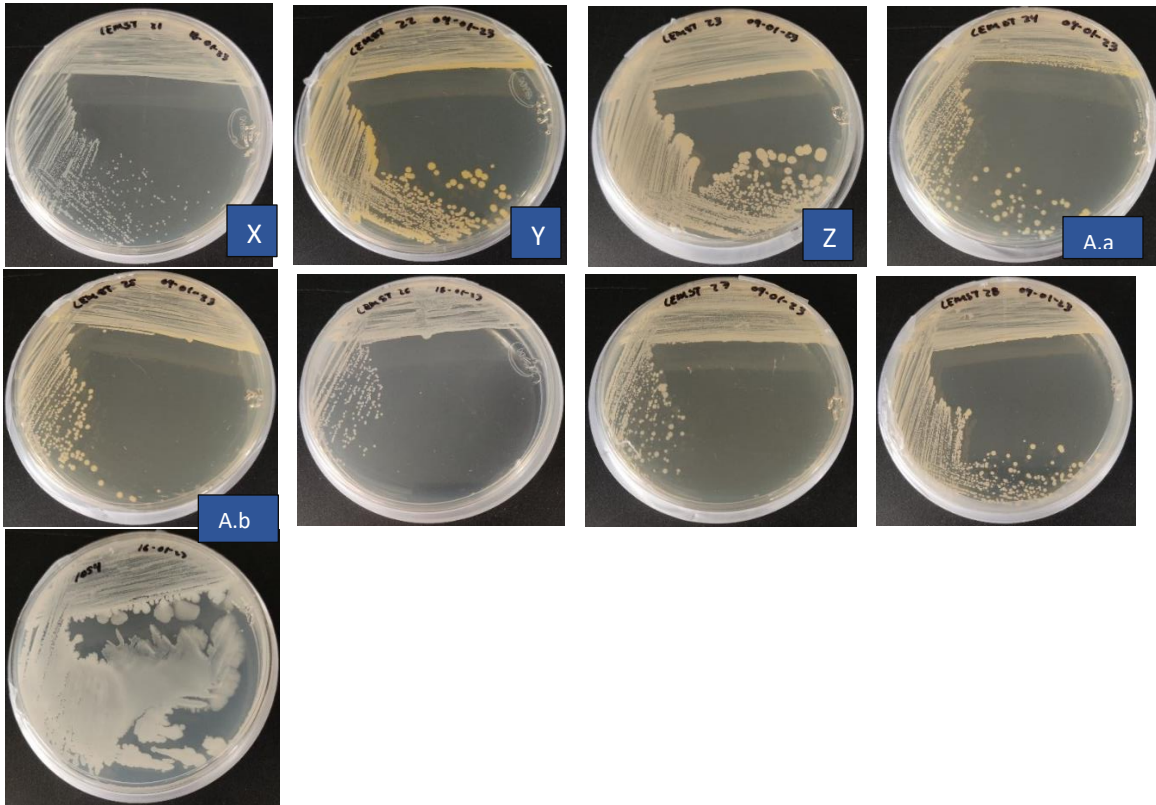


Figura 15 Siembra de todas las cepas incluyendo las cepas son pertenecientes al Laboratorio de microbiología hospitalaria y de la comunidad del Instituto de Ciencias Microbiológicas, aisladas de distintas muestras, donadas por la Dra. Rosa Rocha. Estas fueron sembradas en medio de cultivo agar LB por estria cruzada. A) *S. LEMST 1*. B) *S. LEMST 2*. C) *S. LEMST 3*. D) *S. LEMST 4*. E) *S. LEMST 5*. F) *S. LEMST 6*. G) *S. LEMST 7*. H) *S. LEMST 8*. I) *S. LEMST 9*. J) *S. LEMST 10*. K) *S. LEMST 11*. L) *S. LEMST 12*. M) *S. LEMST 13*. N) *S. LEMST 14*. Ñ) *S. LEMST 15*. O) *S. LEMST 16*. P) *S. LEMST 17*. Q) *S. LEMST 18*. R) *S. LEMST 19*. S) *S. LEMST 20*. T) *S. LEMST 21*. U) *S. LEMST 22*. V) *S. LEMST 23*. W) *S. LEMST 24*. X) *S. LEMST 25*. Y) *S. LEMST 26*. Z) *S. LEMST 27*. A.a) *S. LEMST 28*. A.b) *B. velezensis 1054*.

9.2 Antibiograma

Esta prueba se realizó con el propósito de identificar, caracterizar y demostrar la multirresistencia de todas las diferentes cepas de *Staphylococcus* antes aisladas;

esta prueba es de las más importantes dentro del laboratorio para identificar la sensibilidad que tiene cada cepa ante los diferentes antibióticos

Para los antibiogramas se ocuparon medios de cultivo Mueller – Hilton preparados siguiendo las indicaciones adecuadas, este medio de cultivo es principalmente ocupado para este tipo de pruebas ya que este es un medio diseñado para las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos utilizando el método de difusión en disco (Kirby y Bauer). Se ocupa el agar Mueller Hilton ya que este es un medio de cultivo nutritivo que promueve el desarrollo de las bacterias, los discos ocupados fueron Sensidiscos MULTIBAC I.D. de investigación diagnóstica; con este procedimiento no se tuvieron ningún tipo de problemas, cada una de las cepas fueron inoculadas adecuadamente y se realizó la lectura de los halos a las 18 horas como lo marcaba en el inserto de los discos de antibióticos; esta se realizó con ayuda de un vernier.

La medida de cada halo presentado por cada cepa se presenta en la Tabla 1, donde la interpretación de la medida de los halos se realizó de acuerdo con los parámetros y criterios establecidos por el inserto de los sensidiscos ocupados, donde se marcó como sensible (S), intermedio (I) y resistente (R) a cada antibiótico de acuerdo con la medida del halo.

Cepa	AM	CF	CFX	DC	CPF	CLM	GE	E	STX	PE	VA	TE
LEM ST 1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
LEM ST 2	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	R	I
LEM ST 3	R	S	I	S	R	R	S	I	S	R	S	I
LEM ST 4	I	S	S	S	I	R	S	S	S	R	S	I
LEM ST 5	S	S	S	S	R	R	R	I	S	S	R	S
LEM ST 6	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
LEM ST 7	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
LEM ST 8	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	R	S
LEM ST 9	R	R	I	R	S	R	S	I	I	R	R	I

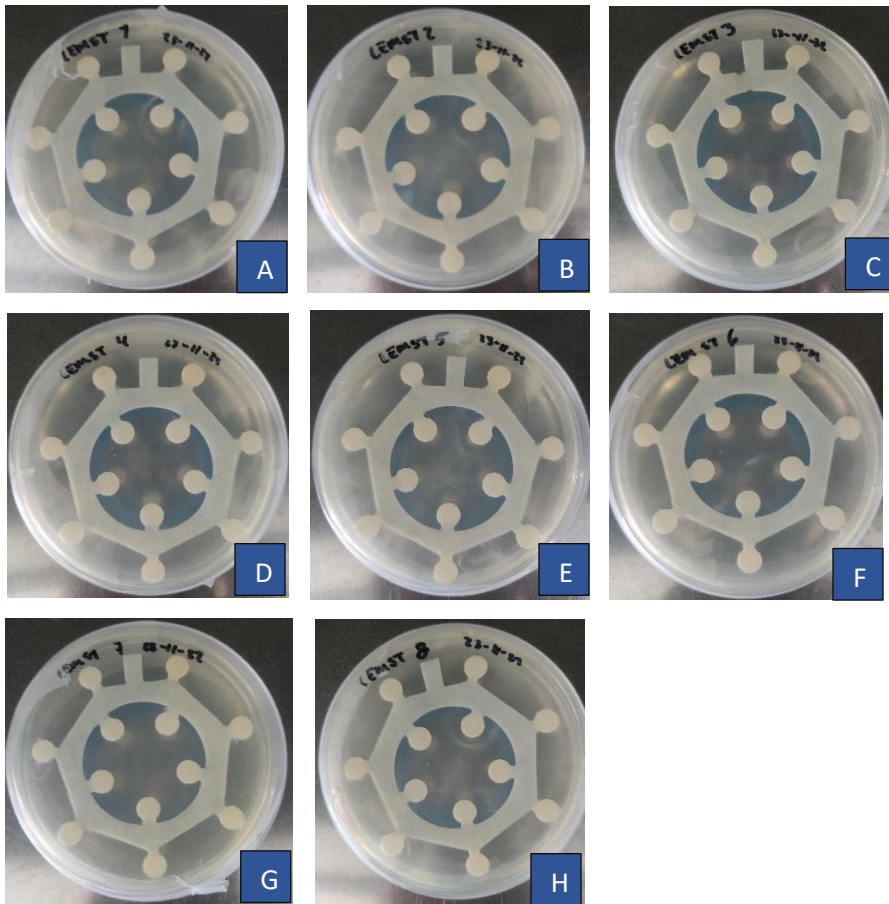
LEM ST 10	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I
LEM ST 11	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R
LEM ST 12	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
LEM ST 13	R	R	I	R	I	R	R	R	R	R	R	R
LEM ST 14	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	I
LEM ST 15	R	R	I	R	S	R	R	R	I	R	R	I
LEM ST 16	R	R	I	R	I	R	R	R	I	R	R	R
LEM ST 17	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	I
LEM ST 18	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I
LEM ST 19	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
LEM ST 20	R	R	S	R	S	R	R	R	I	R	R	I
LEM ST 21	R	R	I	R	S	R	R	R	S	R	R	I
LEM ST 22	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
LEM ST 23	R	R	I	R	R	R	R	S	R	R	R	R
LEM ST 24	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R
LEM ST 25	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S
LEM ST 26	R	R	I	R	I	R	R	S	I	R	R	R
LEM ST 27	R	R	S	R	S	R	R	R	I	R	R	I
LEM ST 28	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

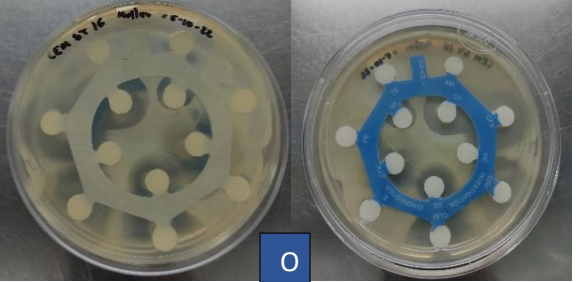
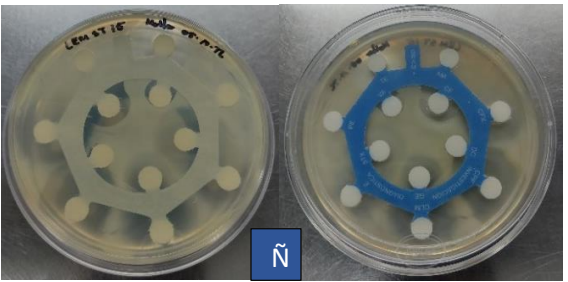
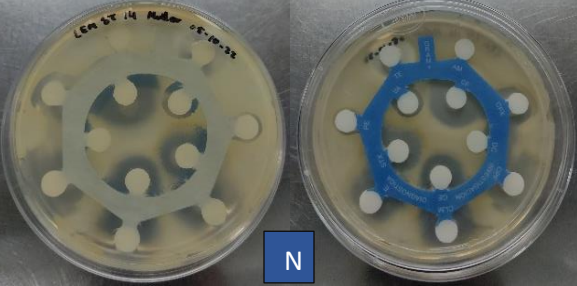
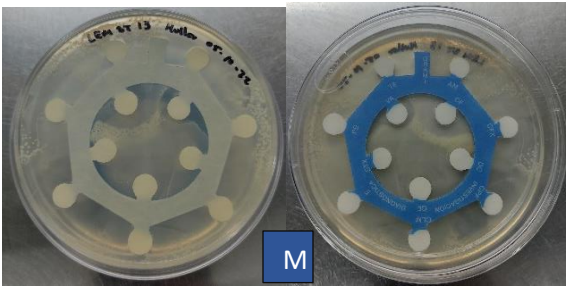
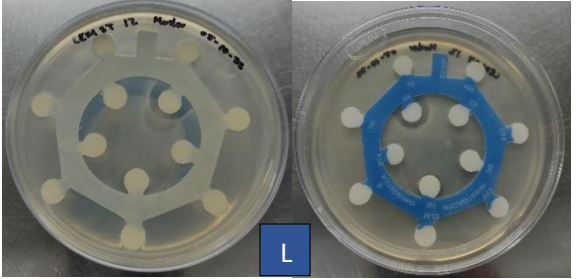
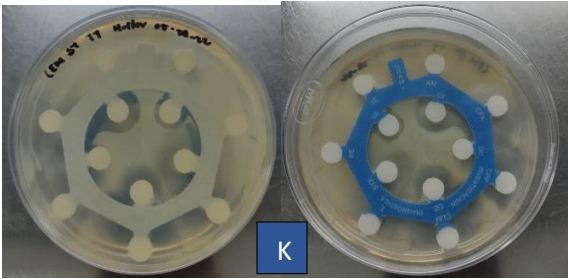
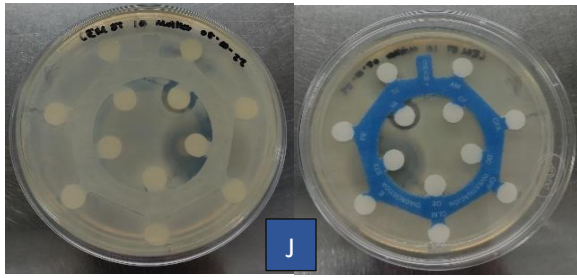
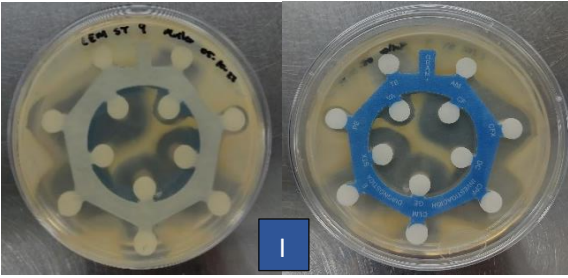
Tabla 4 Tabla de resultados de los halos de inhibición; donde S: sensible, I: intermedio, R: resistente, AM: ampicilina, CF: cefalotina, CFX: cefotaxima, DC: dicloxacilina, CPF: ciprofloxacino, CLM: clindamicina, GE: gentamicina, E: eritromicina, STX: ceftriaxona, PE: penicilina, VA: vancomicina, TE: tetraciclina

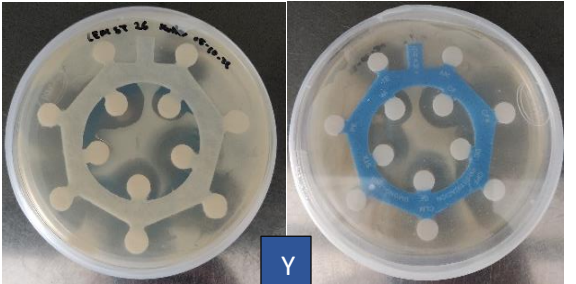
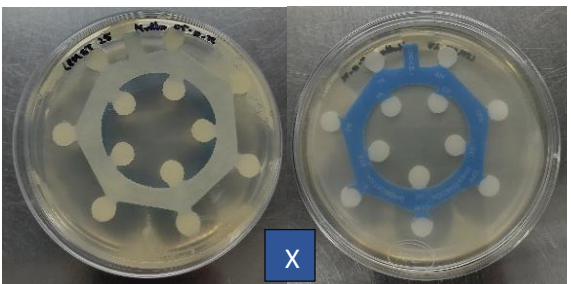
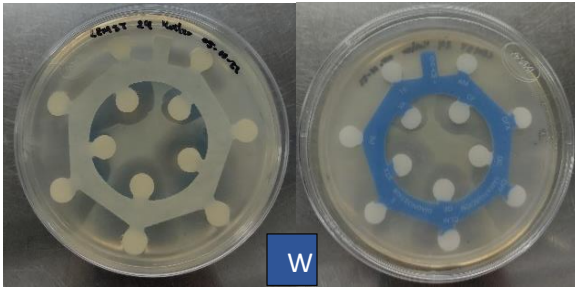
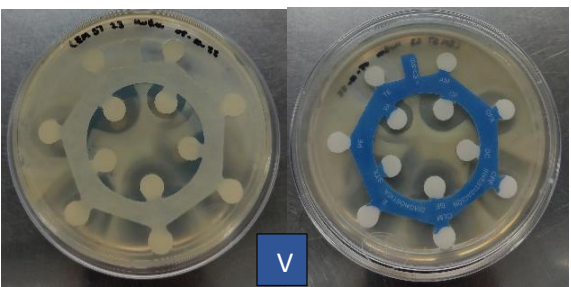
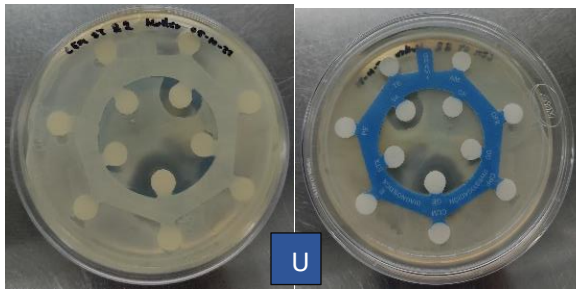
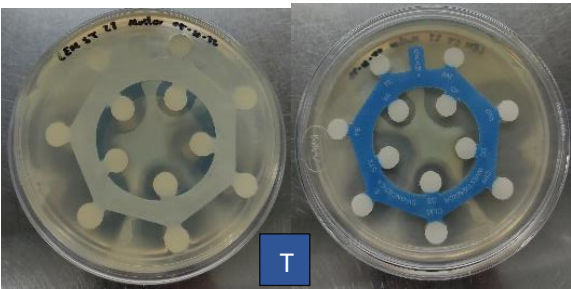
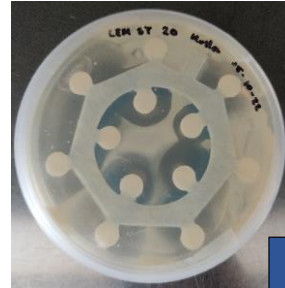
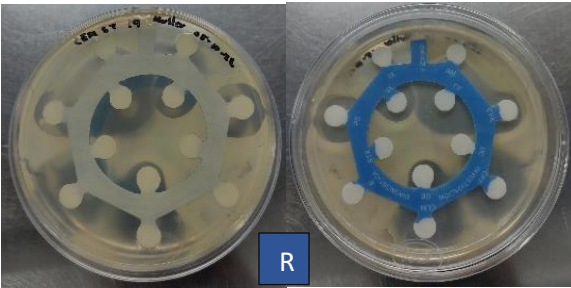
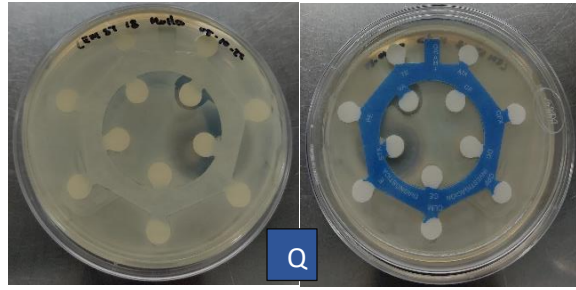
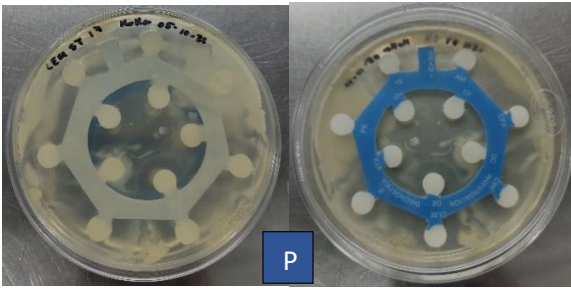
Todas las cepas mostraron resistencia a:

- Ampicilina (excepto LEM ST 1, 5, 6, 7, 25)
- Cefalotina (excepto LEM ST 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 25)
- Didoxacilina (excepto LEM ST 1, 2 3, 4, 5, 6, 7, 8, 25)

- Clindamicina (excepto LEM ST 1, 2, 7)
- Gentamicina (excepto LEM ST 1, 3, 4, 6, 7, 9, 25)
- Entromicina (excepto LEM ST 1, 4, 6, 7, 16, 23, 25)
- Penicilina (excepto LEM ST 1, 2, 5, 6)







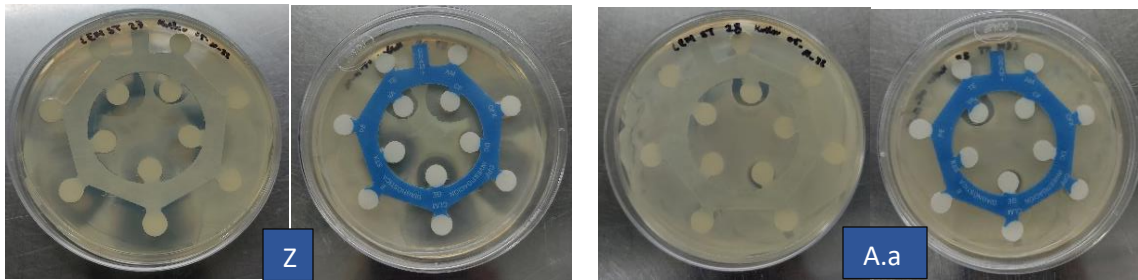


Figura 16 Resultados de los antibiogramas realizados a las cepas de *Staphylococcus spp*; A) *S. LEMST 1*, B) *S. LEMST 2*, C) *S. LEMST 3*, D) *S. LEMST 4*, E) *S. LEMST 5*. F) *S. LEMST 6*. G) *S. LEMST 7*. H) *S. LEMST 8*. I) *S. LEMST 9*. J) *S. LEMST 10*. K) *S. LEMST 11*. L) *S. LEMST 12*. M) *S. LEMST 13*. N) *S. LEMST 14*. Ñ) *S. LEMST 15*. O) *S. LEMST 16*. P) *S. LEMST 17*. Q) *S. LEMST 18*. R) *S. LEMST 19*. S) *S. LEMST 20*. T) *S. LEMST 21*. U) *S. LEMST 22*. V) *S. LEMST 23*. W) *S. LEMST 24*. X) *S. LEMST 25*. Y) *S. LEMST 26* Z) *S. LEMST 27*. A.a) *S. LEMST 28*.

9.4 Cultivo en masivo de *Staphylococcus* y *Bacillus* al lado

Para evidenciar el potencial antimicrobiano que presentan las cepas de *Bacillus*, unas de las primeras pruebas que se realizó; consistió en primero preparar medio de cultivo adecuados que ambas cepas (*Bacillus* y *Staphylococcus*) crecieran adecuadamente bajo las mismas condiciones, es por eso por lo que el medio de cultivo utilizado fue el medio LB.

Las cepas de *Bacillus* ocupadas fueron *Bacillus Velezensis 1054* y *Bacillus 1061*, las cepas de *Staphylococcus* ocupadas fueron *S. LEMST 1*, *S. LEMST 2*, *S. LEMST 5*, *S. LEMST 8*

Las 4 cepas que se cultivaron mostraron un pequeño halo de inhibición por parte de la cepa de *Bacillus velezensis 1054* donde se nota que esta inhibe el crecimiento de *Staphylococcus*, sin embargo, se puede observar que algunas de las cepas de *Staphylococcus* son más susceptibles que otras; donde fue más notorio fue hacia las cepas *S. LEMST 2* y *S. LEMST 5*, donde se observar de manera clara como es que se forma el halo de inhibición de crecimiento alrededor de la cepa de *B*

velezensis 105; en cambio con la cepa de *Bacillus* sp 1061 no muestra ningún tipo de inhibición ante *Staphylococcus*, por lo que se decidió solo ocupar como un control negativo para posteriores pruebas

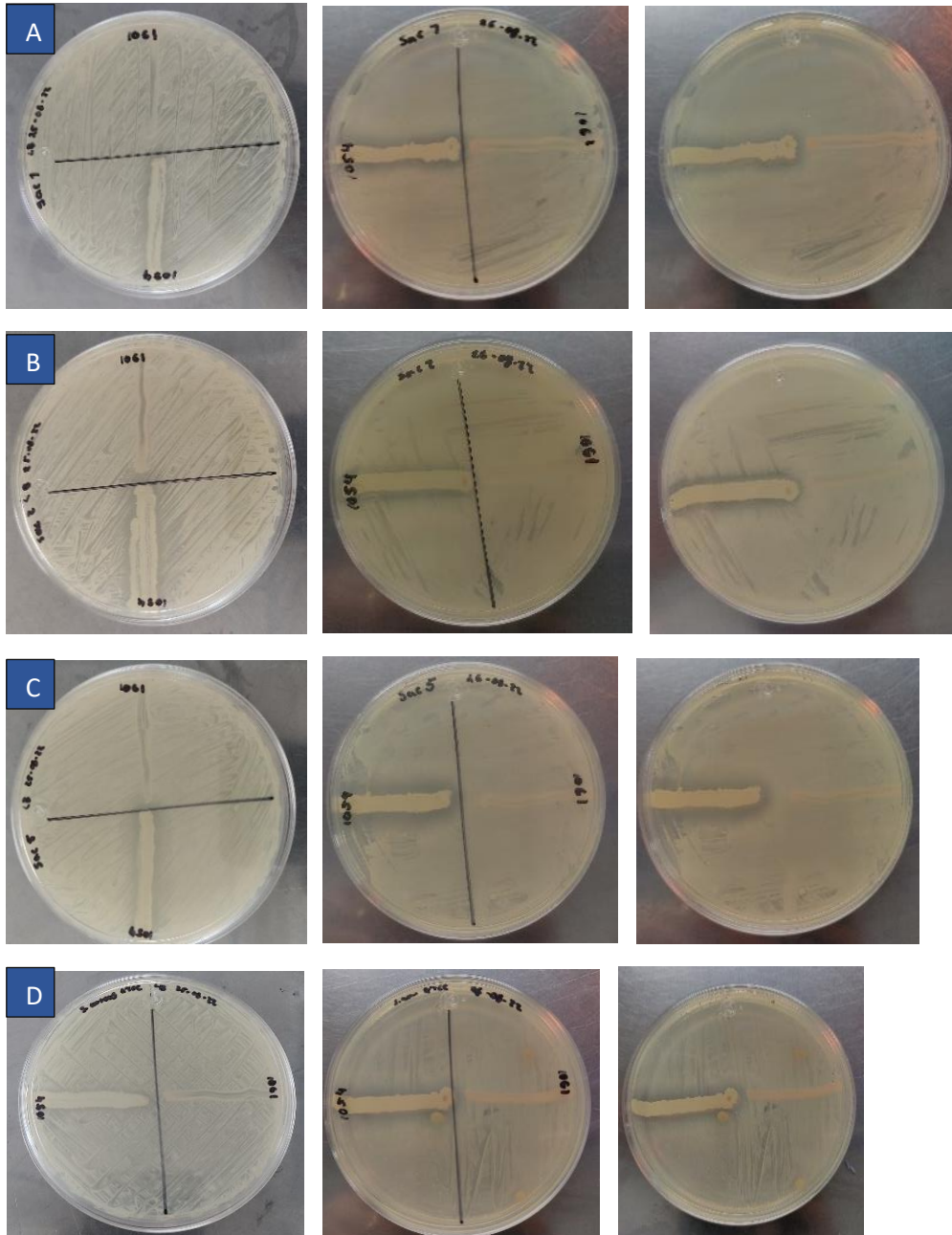


Figura 17 Placas de agar con medio LB donde fue sembrada la cepa de *Staphylococcus* en masivo y colocando a las cepas de *Bacillus* (*B. velezensis* 1054

y *B. sp 1061*) en perpendicular a la línea media de la placa. A) *S. LEMST 1*, B) *S. LEMST 2*, C) *S. LEMST 5*, D) *S. LEMST 8*

9.5 Cultivo dual de *Staphylococcus* y *Bacillus*

Una de las pruebas que se realizó fue una prueba dual con las cepas de *Staphylococcus spp.* y las cepas de *Bacillus spp.* Esta prueba se realizó con el propósito de poder evaluar si *Bacillus* era capaz de inhibir el crecimiento de las cepas de *Staphylococcus spp.* sin que estas estuvieran en contacto.

Para esta prueba se ocuparon placas de agar LB, en donde de un lado se sembró a la cepa de *Staphylococcus spp.* seleccionada y del otro lado se colocó a la cepa de *Bacillus sp.*

Lo que se observó en esta prueba fue que ambas bacterias crecieron de manera favorable en cada uno de sus lados donde fue inoculada, sin embargo, se puede ver que en las placas donde se sembró a *Bacillus velezensis 1054* y a la cepa de *Staphylococcus sp.* presentan su crecimiento de forma un poco más alejada que de donde fue sembrada, ya que el espacio que se dejó entre estas es más amplio.

Sin embargo, en comparación con la anterior prueba pudimos observar que es más efectivo y notorio el poder de inhibición que tiene la cepa de *Bacillus* ante el crecimiento de las cepas de *Staphylococcus* cuando estas están más cerca y que en su crecimiento puedan tener un contacto entre sí.

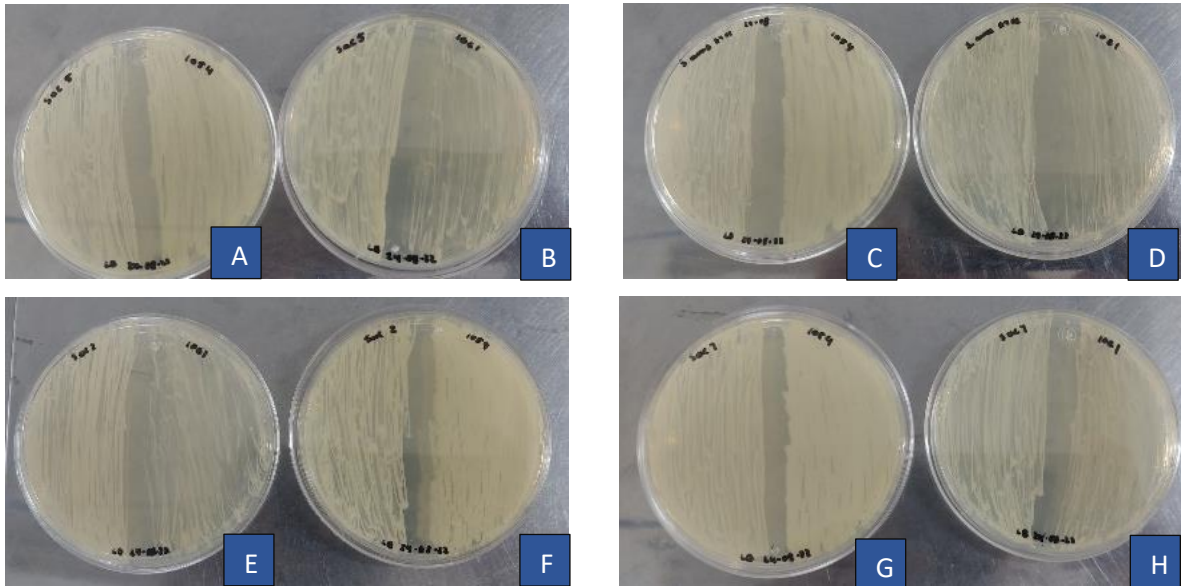


Figura 18 Placas con medio de cultivo LB donde fueron sembradas las cepas de *Staphylococcus* de un lado de la mitad de la placa y en el lado contrario de la placa la cepa de *Bacillus* correspondiente. A) *S. sac 5* y *B. velezensis 1054*, B) *S. sac 5* y *B. sp 1061*, C) *S. aureus ATCC* y *B. velezensis 1054* D) *S. aureus ATCC* y *B. sp 1061*, E) *S. sac 2* y *B. velezensis 1054*, F) *S. sac 2* y *B. velezensis 1054*, G) *S. sac 1* y *B. velezensis 1054* H) *S. sac 1* y *B. velezensis 1054*.

9.6 Difusión con microgotas

El objetivo de esta prueba fue el poder evidenciar de una mejor el poder de inhibición de *Bacillus* hacia *Staphylococcus spp.* ya que estos se colocaron de forma directa una sobre la otra cepa sembrada sobre las placas; para este método primero se realizaron cultivos de caldos LB y YM para las cepas correspondientes que se van a ocupar.

Se realizaron tres placas de cada cepa donde dos serán ocupadas para realizar la prueba y una se tomó como control negativo de la prueba.

Lo que se observó con cada placa fue:

LEMST 3, 14, 19 – No se observó con claridad que haya crecimiento de las cepas de *Bacillus*

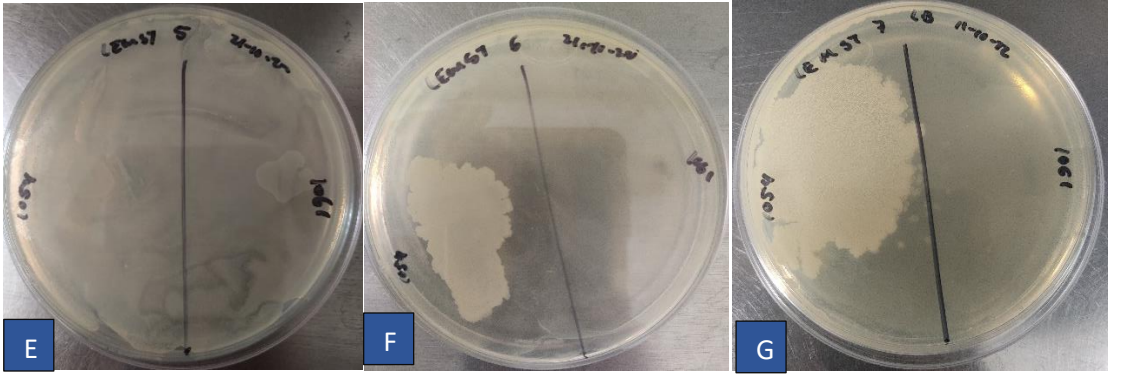
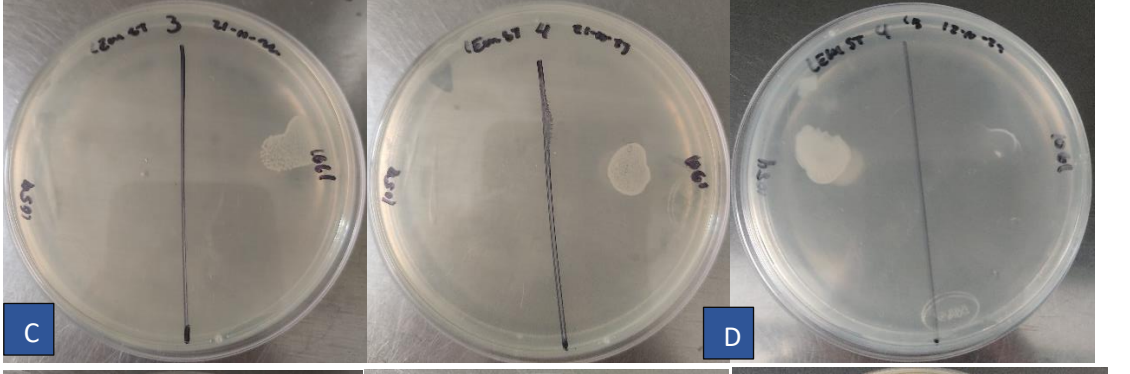
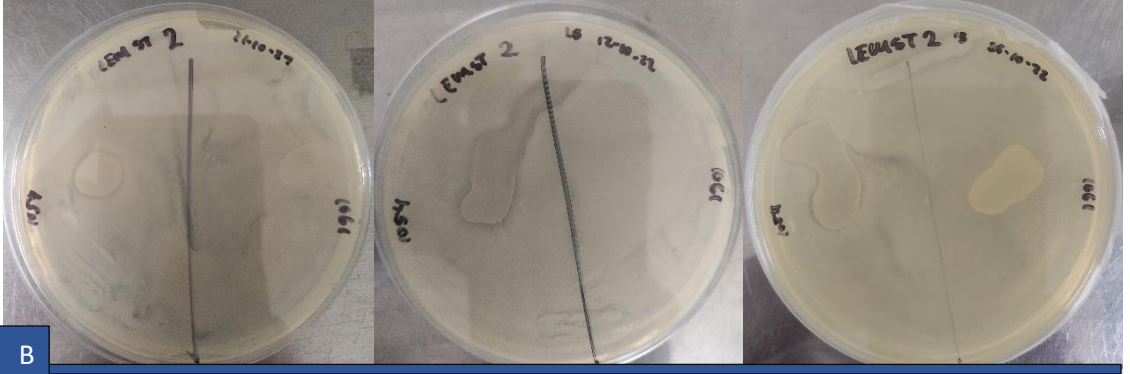
LEMST 4, 5, 8, 10, 11, 16, 21, 22, 23 – Se observó en las placas de estas de cepas de *Staphylococcus spp.* como es que las cepas de *Bacillus* pueden crecer favorablemente sin embargo no se nota que haya ningún halo de inhibición alrededor de esta.

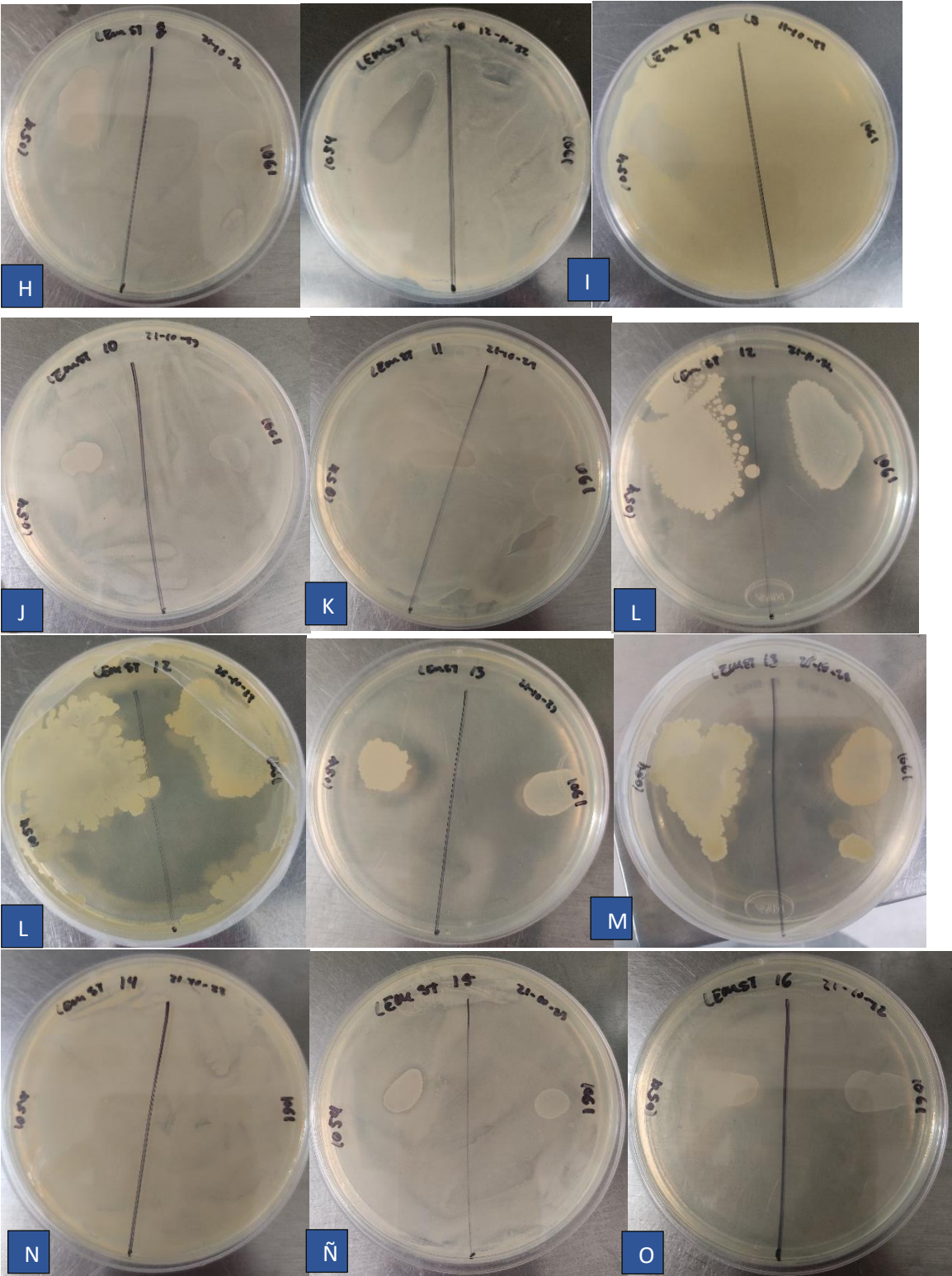
LEMST 1, 2, 15, 20, 25, 26, 27. 28– En las placas crecieron favorablemente las cepas de *Bacillus sp.*, se puede observar como las cepas de *Bacillus* crecen por encima e inhibiendo al crecimiento de *Staphylococcus* para crecer adecuadamente, aunque se nota claramente el crecimiento de ambas cepas, como ya se sabía *Bacillus sp. 1061* no tiene ningún efecto sobre el crecimiento de *Staphylococcus* en cambio la cepa de *Bacillus velezensis 1054* mostro un pequeño halo de inhibición alrededor de su crecimiento

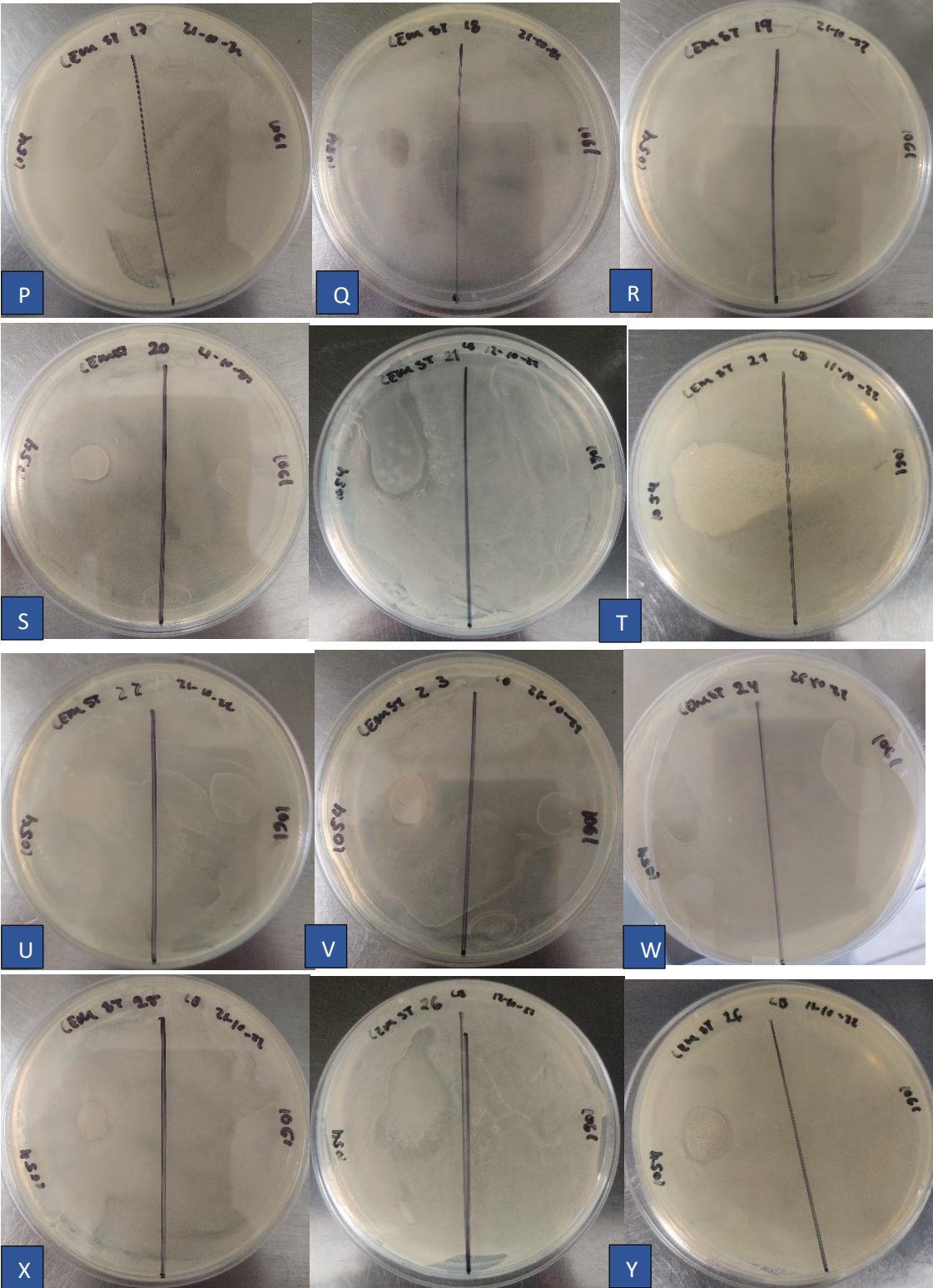
LEMST 6, 7 – Lo que muestran las placas es que ambas cepas de *Bacillus* crecieron muy favorablemente, expandiéndose por la placa y mostrando un pequeño halo de inhibición alrededor de estas

LEMST 12, 13 – Al observar estas placas se nota como las cepas de *Staphylococcus* están casi completamente inhibidas en su crecimiento ya que las cepas de *Bacillus* muestran un amplio crecimiento en la placa y se observa claramente un muy amplio halo de inhibición del crecimiento de *Staphylococcus*

LEMST 9, 17, 18, 24 – Lo que sucedió en estas cepas de *Staphylococcus* fue que al observarla no se presentó crecimiento de las cepas de *Bacillus*, sin embargo, en donde fue inoculada se notaba un gran hueco sin crecimiento de la cepa *Staphylococcus* por lo que también se concluyo que estas eran susceptibles ante la cepa de *Bacillus* ya que inhibía su crecimiento







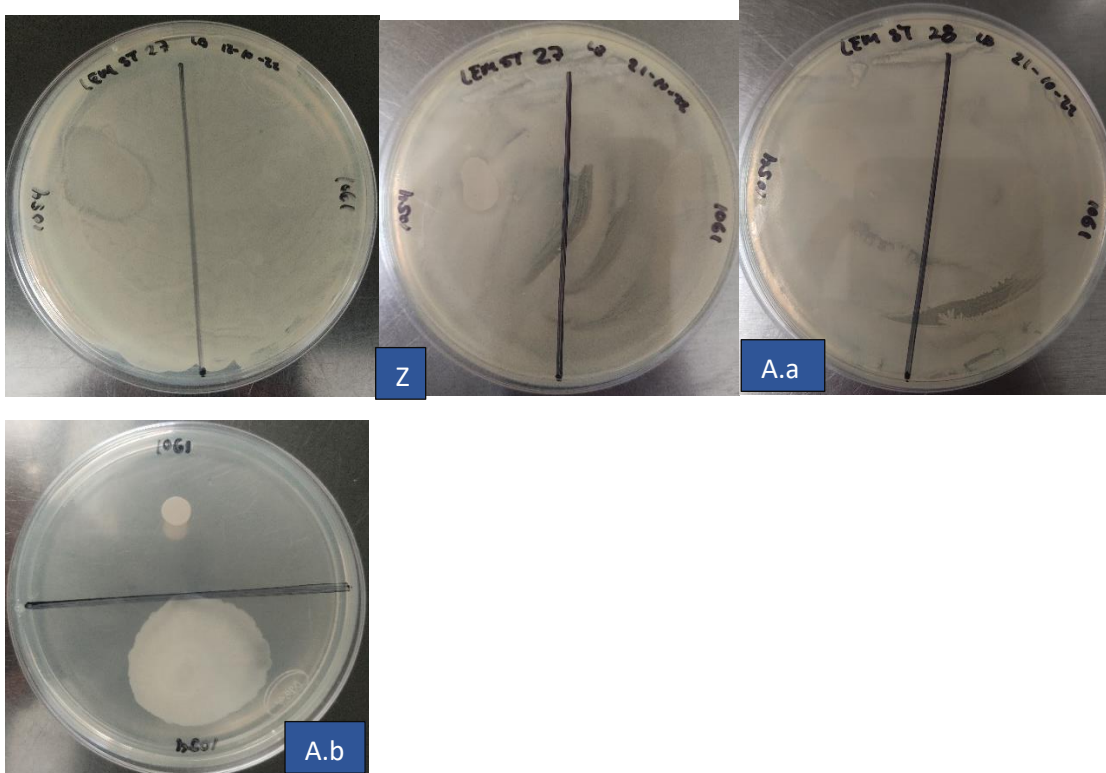


Figura 19 Placas con medio de cultivo agar LB, donde fueron inoculadas cada una con diferentes cepas de *Staphylococcus* spp por la técnica de masivo y posteriormente a cada una de las placas se les inocularon las cepas de *Bacillus* (*B. velezensis* 1054 y *B. sp* 1061) por la técnica de microgotas. A) *S. LEMST* 1, B) *S. LEMST* 2, C) *S. LEMST* 3, D) *S. LEMST* 4, E) *S. LEMST* 5. F) *S. LEMST* 6. G) *S. LEMST* 7. H) *S. LEMST* 8. I) *S. LEMST* 9. J) *S. LEMST* 10. K) *S. LEMST* 11. L) *S. LEMST* 12. M) *S. LEMST* 13. N) *S. LEMST* 14. Ñ) *S. LEMST* 15. O) *S. LEMST* 16. P) *S. LEMST* 17. Q) *S. LEMST* 18. R) *S. LEMST* 19. S) *S. LEMST* 20. T) *S. LEMST* 21. U) *S. LEMST* 22. V) *S. LEMST* 23. W) *S. LEMST* 24. X) *S. LEMST* 25. Y) *S. LEMST* 26 Z) *S. LEMST* 27. A.a) *S. LEMST* 28. A.b) *B. velezensis* 1054 y *Bacillus* sp 1061

A diferencia de la primera prueba realizada, en este caso se evaluaron todas las cepas de *Staphylococcus* ante el poder de inhibición de la cepa de *Bacillus velezensis* 1054, y en comparación con la primera prueba se puede observar como la cepa de *Bacillus* tiene un mejor crecimiento sobre la placa y con algunas cepas muestra un mayor halo de inhibición del crecimiento de la cepa de *Staphylococcus*.

En la tabla 5 se muestra de una forma resumida a las cepas de *Staphylococcus* las cuales mostraron tener una mayor susceptibilidad ante el poder de inhibición que tiene la cepa de *Bacillus velezensis* 1054

Cepa de <i>Staphylococcus</i> sp.	Susceptibilidad ante el efecto inhibitorio de <i>Bacillus velezensis</i> 1054	
	Susceptible	No susceptible
LEMST 1	X	
LEMST 2	X	
LEMST 3		X
LEMST 4		X
LEMST 5		X
LEMST 6	X	
LEMST 7	X	
LEMST 8		X
LEMST 9	X	
LEMST 10		X
LEMST 11		X
LEMST 12	X	
LEMST 13	X	
LEMST 14		X
LEMST 15	X	
LEMST 16		X
LEMST 17	X	
LEMST 18	X	
LEMST 19		X
LEMST 20	X	
LEMST 21		X
LEMST 22		X
LEMST 23		X

LEMST 24	X	
LEMST 25	X	
LEMST 26	X	
LEMST 27	X	
LEMST 28	X	

Tabla 5 Tabla de susceptibilidad de las cepas de Staphylococcus spp a la actividad inhibidora de la cepa de Bacillus velezensis 1054

Con esta prueba se pudieron seleccionar a las cepas que muestran una mayor susceptibilidad ante el poder de inhibición que muestra la cepa de *Bacillus*, se decidió seleccionar a las cepas *S. LEMST 12*, *S. LEMST 13* y *S. LEMST 28*. debido a que estas presentan susceptibilidad ante el efecto de inhibición de la cepa de *Bacillus* y en la prueba de antibiograma mostraron ser unas de las cepas con mayor multidrogoresistencia ante los antibióticos probados.

9.7 Método de estrías

El propósito de esta prueba es el evidenciar de una manera más clara el potencial antimicrobiano de las cepas de *Bacillus spp.* colocándolas solamente una junto de la otra teniendo una mayor cantidad de inóculo de las cepas de *Bacillus spp.*

Para esto en las placas de agar LB primero se colocó la cepa de *Staphylococcus spp.* que fueron seleccionadas; las cepas seleccionadas fueron:

- *Staphylococcus sp. LEMST 1*
- *Staphylococcus sp. LEMST 2*
- *Staphylococcus sp. LEMST 12*
- *Staphylococcus sp. LEMST 13*
- *Staphylococcus sp. LEMST 28*

Se seleccionaron estas cepas debido a que en pruebas anteriores evidenciaron una mayor inhibición por parte de las cepas de *Bacillus velezensis 1054* y *Bacillus sp. 1061*.

Se realizaron cultivos a cada una de las cepas *Staphylococcus* con cada una de las cepas de *Bacillus* , también se hicieron diferentes controles para poder observar el crecimiento de cada una de las cepas por separado.

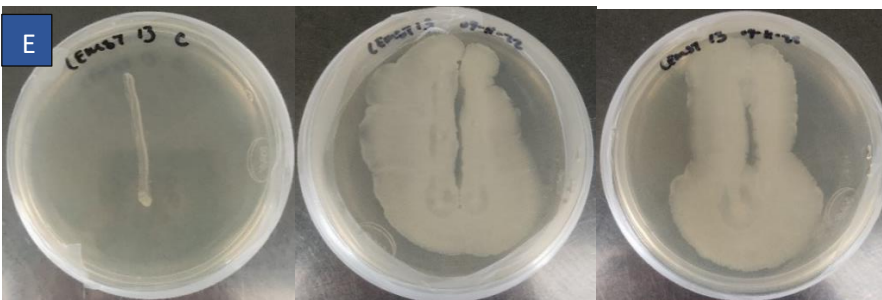
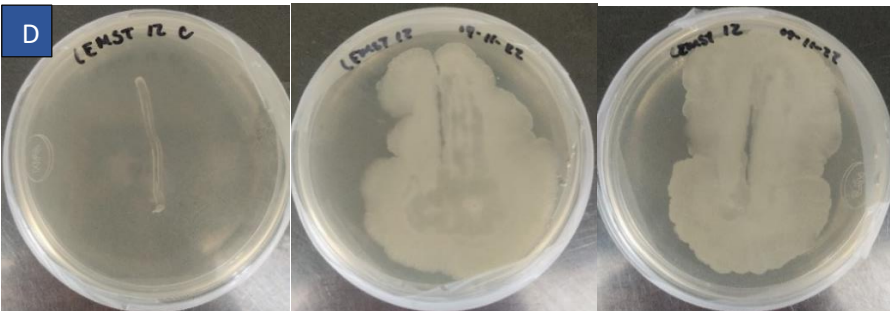
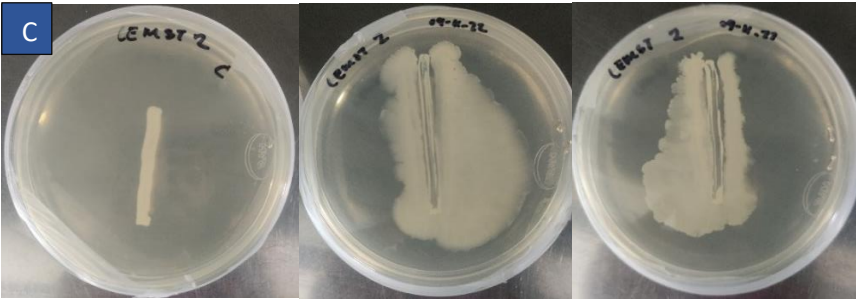
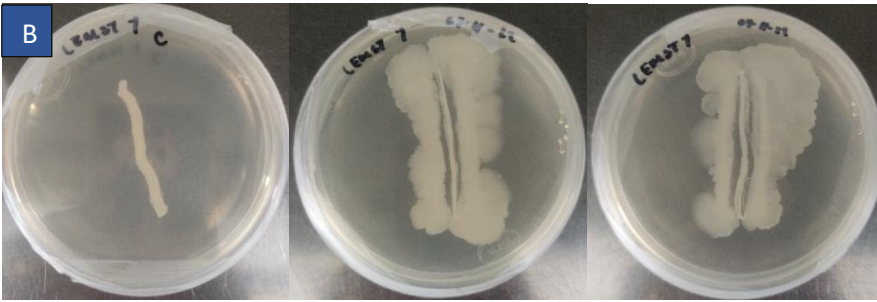
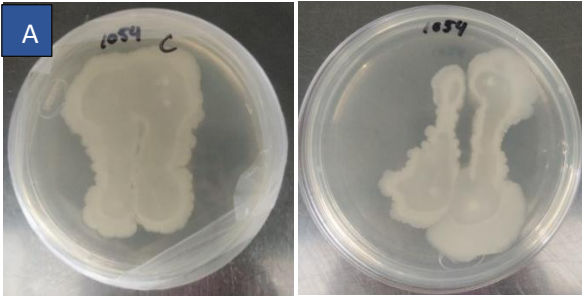
Los resultados observados fueron los siguientes:

En la placa con el inóculo de *Staphylococcus LEMST 1* se observó que los *Bacillus* crecieron de forma favorable, ya que *Bacillus LEM 1054* se extendió de forma amplia, también se puede observar que hubo un poco de crecimiento de *Staphylococcus LEMST 1* sin embargo este solo creció un poco en donde fue inoculado. Comparando con las cepas control que se inocularon, se puede ver que el crecimiento de *Staphylococcus* es menor cuando está en presencia de *Bacillus* por lo que se deduce que *Bacillus* si inhibe el crecimiento de *Staphylococcus LEMST 1*.

Con la cepa de *Staphylococcus LEMST 2* paso el mismo caso donde la cepa de *Bacillus* creció de forma amplia sobre la placa y el crecimiento de *Staphylococcus* no fue tan amplio en comparación de la placa control.

Sin embargo, con las cepas de *Staphylococcus LEMST 12* y *Staphylococcus LEMST 13* ocurrió algo distinto, donde la cepa de *Bacillus LEMM 1054* creció de forma muy amplia en la placa e inhibió completamente el crecimiento de las cepas de *Staphylococcus* y solo se puede observar como un pequeño hueco en donde fue inoculadas las de cepas de *Staphylococcus*.

Por último, lo que se observó con la cepa de *Staphylococcus LEMST 28* fue que *Bacillus* creció, pero no tan ampliamente como en las anteriores placas, sin embargo, de igual manera la cepa de *Staphylococcus* muestra un mucho menor crecimiento en comparación con las placas control, por lo que si se observa claramente como es que la cepa de *Bacillus* inhibe de forma clara el crecimiento de *Staphylococcus* ya que también se observan huecos en donde fue inoculada.



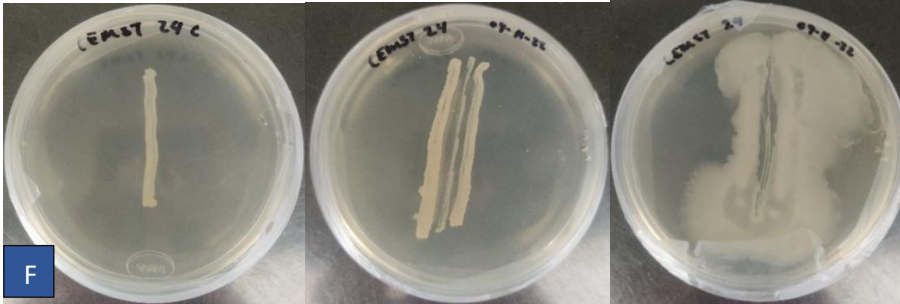


Figura 20 Placas con medio de cultivo agar LB donde fueron inoculadas a las cepas seleccionadas de *Staphylococcus* por la parte de en medio de las placas y a los lados fue inoculada la cepa de *Bacillus velezensis* 1054. A) Cepa control de *Bacillus velezensis* 1054. B) *S. LEMST 1*, C) *S. LEMST 2*, D) *S. LEMST 12*, E) *S. LEMST 13*, F) *S. LEMST 28*.

9.8 Método de estrías cruzadas

En esta prueba se busca identificar la capacidad de inhibición de las distintas cepas del género *Bacillus*, pero a diferencia de la prueba de estrías, lo que se hizo primero fue dejar crecer en la placa a la cepa de *Bacillus* para que esta pudiera crecer sin la interferencia del *Staphylococcus* y así poder ampliar su poder de inhibición. En esta prueba se ocuparon a las 28 cepas de *Bacillus* para comparar y seleccionar a las que muestren una mayor inhibición de *Bacillus*.

Para esto se seleccionaron solamente 3 de las cepas de *Staphylococcus*, estas fueron elegidas debido a que en pruebas anteriores demostraron ser susceptibles ante los compuestos de *Bacillus* para su inhibición.

Se inocularon a las cepas seleccionadas de *Staphylococcus*, estas fueron:

- *Staphylococcus* sp. LEMST 12
- *Staphylococcus* sp. LEMST 13
- *Staphylococcus* sp. LEMST 28

Las 3 fueron inoculadas en la misma placa que el *Bacilo* solo que estas fueron sembradas de forma perpendicular al *Bacilo* y dejando un espacio considerable entre cada una de estas. Pasado el tiempo de incubación lo que se observó fue:

Bacillus 1033

- Solamente se puede notar un poco de inhibición de la cepa de *S. LEMST 13*, en cambio las otras cepas crecieron adecuadamente en donde fueron sembradas.

Bacillus 1047

- No se observa inhibición en el crecimiento de las cepas de *Staphylococcus*

Bacillus 1051

- Aunque se nota como *Bacillus* creció ampliamente solo se puede observar una pequeña inhibición hacia el crecimiento de las cepas de *Staphylococcus* en la parte donde están más juntas ambas cepas

Bacillus 1056

- Todas las cepas de *Staphylococcus* crecieron adecuadamente y no se nota inhibición

Bacillus 1058

- Se observó que las cepas de *Staphylococcus* crecieron un poco, se presentó un pequeño halo de inhibición en el crecimiento de *Staphylococcus* alrededor del *Bacilo*.

Bacillus 1062

- No se observa inhibición en el crecimiento de las cepas de *Staphylococcus*

Bacillus 1074

- No se observa inhibición en el crecimiento de las cepas de *Staphylococcus*

Bacillus 1075

- Aunque el crecimiento de la cepa de *Bacillus* no es tan extenso se notó claramente una inhibición en el crecimiento de las cepas de *Staphylococcus*

Bacillus 1076

- Claramente se notó un gran halo de inhibición de crecimiento de las cepas de *Staphylococcus* alrededor de la cepa de *Bacillus*

Bacillus 1078

- Claramente se observó inhibición del crecimiento de las cepas *Staphylococcus* el rededor de la cepa de *Bacillus* por lo que se presentó un gran halo

Bacillus 1080-A

- No se observa inhibición en el crecimiento de las cepas de *Staphylococcus*

Bacillus 1081

- No se observó la presencia de inhibición de las cepas de *Staphylococcus* por parte de *Bacillus*.

Bacillus 1082

- La cepa de *Bacillus* creció ampliamente por la placa sin embargo solo se observa un poco de inhibición en el crecimiento de las cepas de *S. LEMST 12* y *S. LEMST 13*

Bacillus 1083

- Solamente se observó inhibición en el crecimiento de las cepas de *S. LEMST 12* y *S. LEMST 13*. Estas presentaron un pequeño halo de inhibición alrededor de la cepa de *Bacillus*.

Bacillus 1084

- Se distinguió como la cepa de *Bacillus* creció ampliamente y alrededor del crecimiento de *Bacillus* se observó un halo de inhibición ya que ninguna de las cepas de *Staphylococcus* tuvo un amplio crecimiento cerca de esta, se notó como solo crece en las partes alejadas de Bacilo.

Bacillus 1085 - B

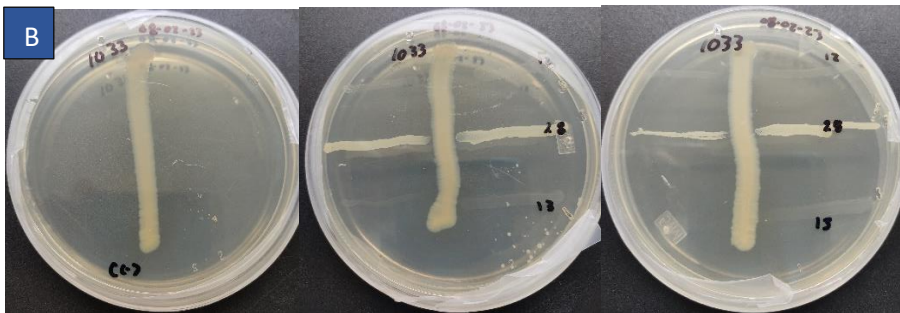
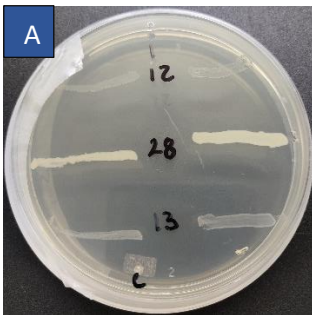
- Se observó cómo hay una gran inhibición en el crecimiento de las cepas de *Staphylococcus* en la parte que se encuentran mas cerca de la cepa de *Bacillus*

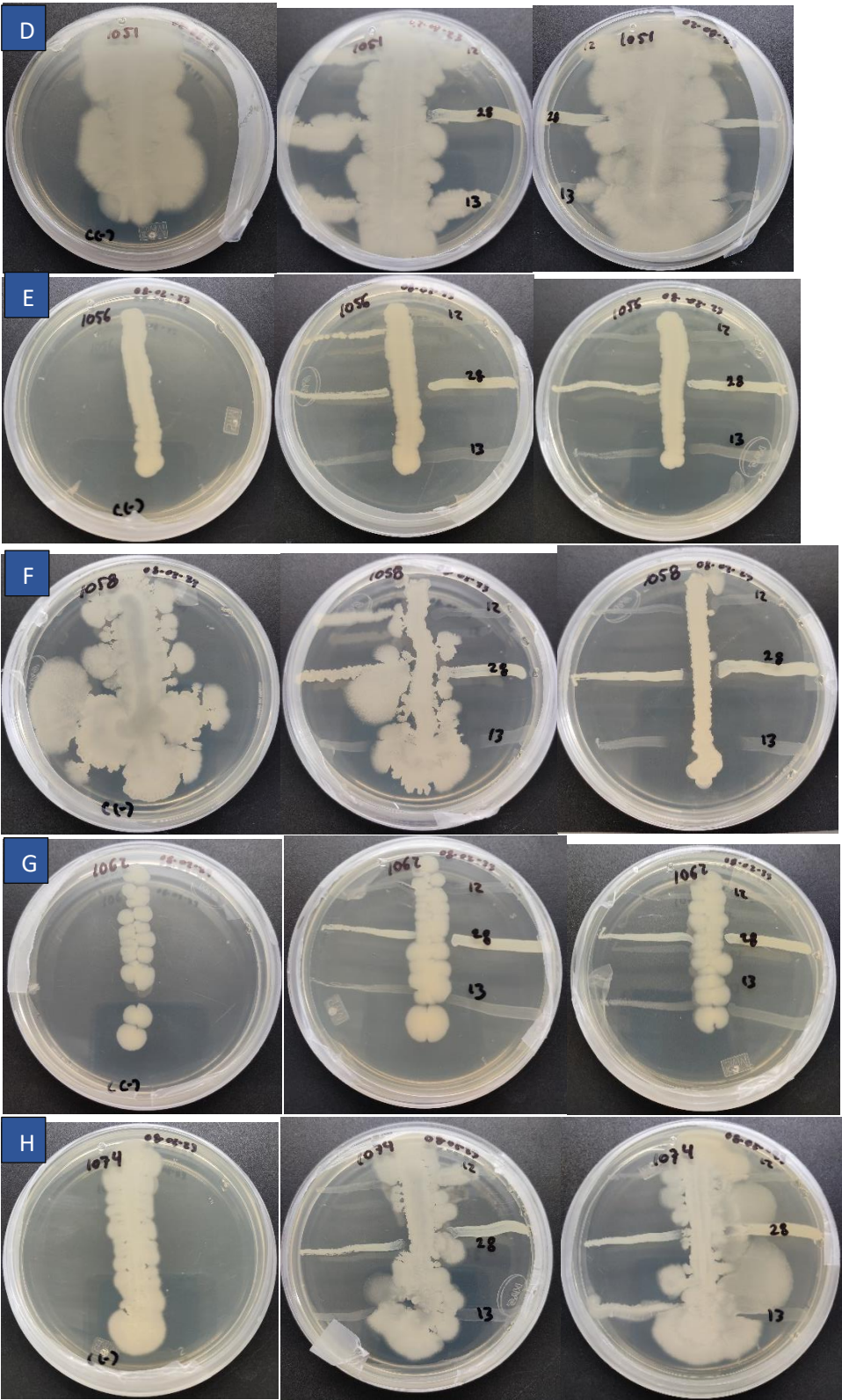
Bacillus 1087

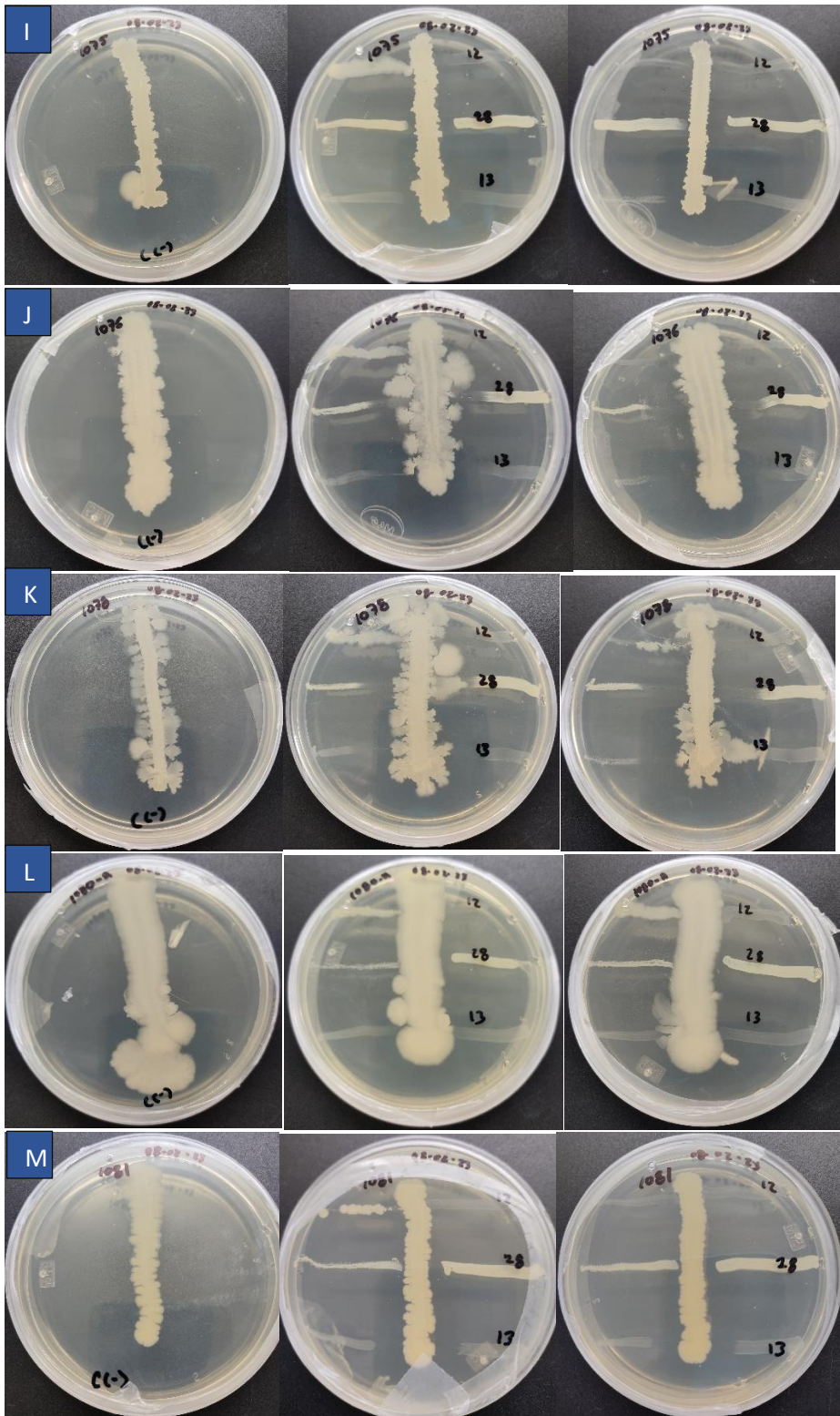
- Aunque se observó como la cepa de *Bacillus* creció de manera favorable y ampliamente por la placa, no se percibió que haya inhibición en el crecimiento de *Staphylococcus* ya que se observa claramente como este creció en donde fue sembrado.

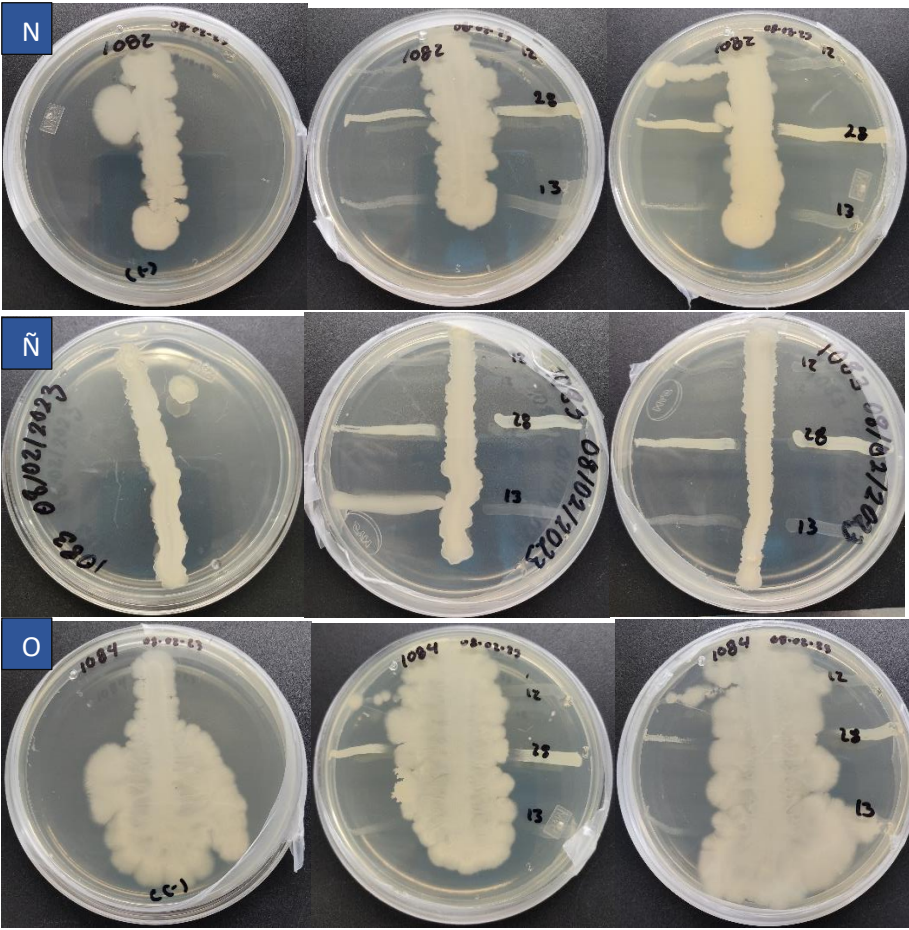
Bacillus 1088

- No se observó inhibición alguna por parte del *Bacilo* ya que las tres cepas de *Staphylococcus* crecieron adecuadamente









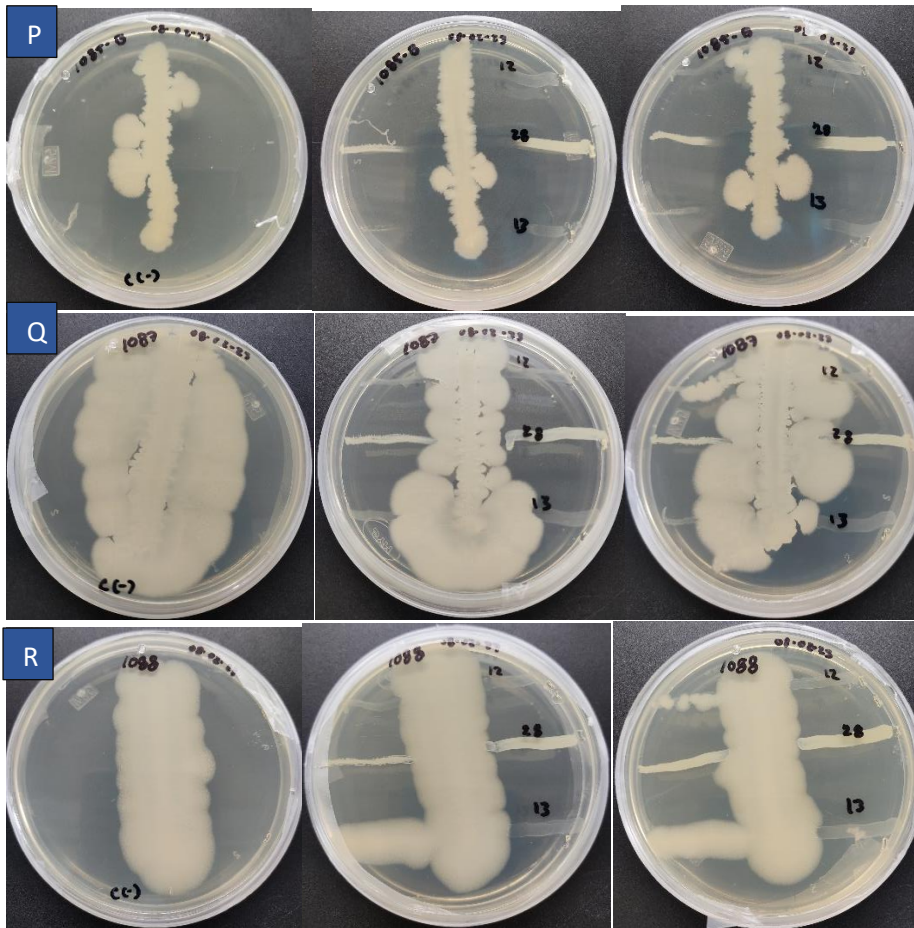


Figura 21 Placas con medio de cultivo agar LB donde fueron sembradas las diferentes cepas de *Bacillus* spp, para así exponer su poder de inhibición ante las cepas de *Staphylococcus* (*S. LEMST* 12, *S. LEMST* 13 y *S. LEMST* 28) que fueron seleccionadas. A) Cepas control de *Staphylococcus* (*S. LEMST* 12, *S. LEMST* 13 y *S. LEMST* 28), B) *Bacillus* sp 1033, C) *Bacillus* sp 1047, D) *Bacillus* sp 1051, E) *Bacillus* sp 1056, F) *Bacillus* sp 1058, G) *Bacillus* sp 1062, H) *Bacillus* sp 1074, I) *Bacillus* sp 1075, J) *Bacillus* sp 1076, K) *Bacillus* sp 1078, L) *Bacillus* sp 1080-A, M) *Bacillus* sp 1081, N) *Bacillus* sp 1082, Ñ) *Bacillus* sp 1083, O) *Bacillus* sp 1084, P) *Bacillus* sp 1085-B, Q) *Bacillus* sp 1087, R) *Bacillus* sp 1088

9.9 Prueba en pozos

En esta prueba lo que se busca es el poder evidenciar la capacidad de inhibición de algunas de las cepas de *Bacillus* seleccionadas:

- *Bacillus sp 1078*
- *Bacillus sp 1076*
- *Bacillus sp 1085-B*
- *Bacillus sp 1051*
- *Bacillus sp 1054*

Estas fueron seleccionadas ya que habían evidenciado anteriormente inhibición hacia las cepas de *Staphylococcus*, esto se busca ahora solo con el sobrenadante del cultivo de las cepas de *Bacillus*.

Se inocularon a las cepas de *Staphylococcus* seleccionadas:

- *S. LEMST 12*
- *S. LEMST 13*
- *S. LEMST 28*

Estas fueron elegidas debido a su alta susceptibilidad ante estos compuestos producidos por *Bacillus*.

Pasado ya el tiempo de incubación de las placas, se puede observar como en todas las placas inoculadas, las cepas de *Bacillus sp 1076*, *Bacillus sp 1078*, *Bacillus sp 1085-B* presentan claramente un halo de inhibición en el crecimiento de todas las cepas de *Staphylococcus*.

Las cepas de *Bacillus velezensis 1054* y *Bacillus sp 1084* igualmente presentan un halo de inhibición en el crecimiento de las cepas de *Staphylococcus* sin embargo es un poco más pequeño en comparación a las otras cepas de *Bacillus*.

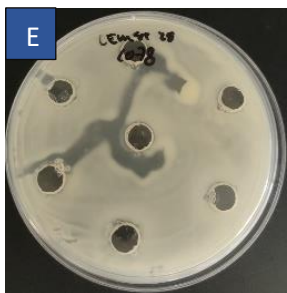
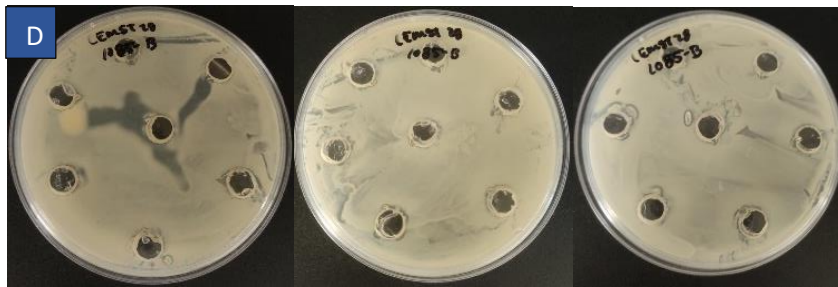
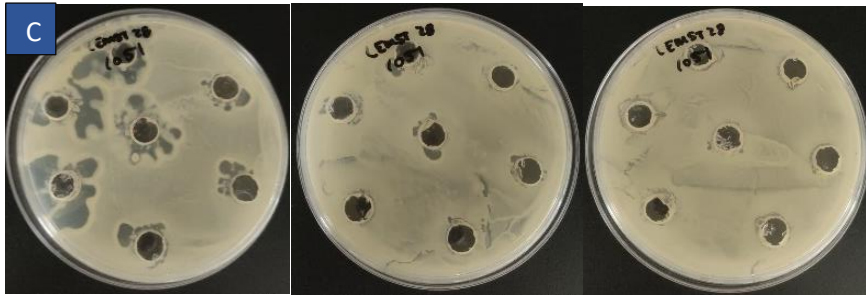
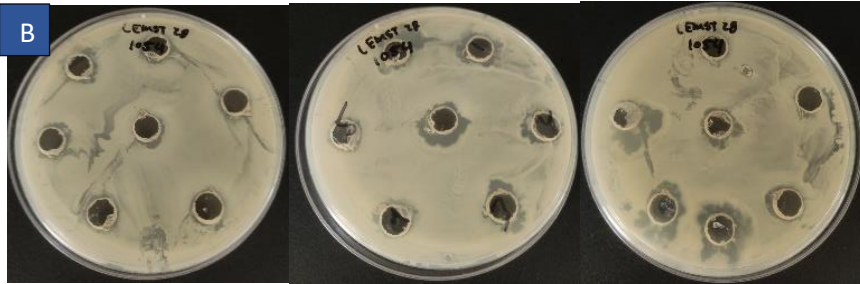
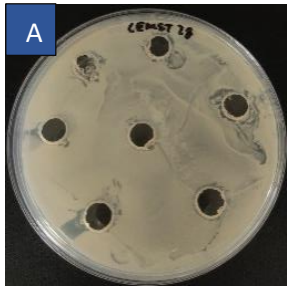


Figura 22 Placas con medio agar LB donde fue aplicada la prueba en pozos, colocando en masivo a la cepa de *Staphylococcus* sp. LEMST 28 y en los pozos al

Bacillus correspondiente A) *Bacillus* sp 1076, B) *Bacillus* sp 1054, C) *Bacillus* sp. 1051, D) *Bacillus* sp 1085 – B, E) *Bacillus* sp 1078

Al analizar los resultados de las diferentes pruebas realizadas se observó como en cada una se muestran resultados diferentes ya que hay pruebas donde se pudo evidenciar con mayor eficacia la capacidad de inhibición que tienen las cepas de *Bacillus*. Al comparar los resultados obtenidos se observó que con la prueba de estría cruzada y la difusión de microgotas son las pruebas que demostraron mayor evidencia de inhibición de la cepa de *Staphylococcus*.

10. CONCLUSIONES

- Las cepas de *Staphylococcus* LEMST 11, LEMST 12, LEMST 13, LEMST 14, LEMST 28 se demostraron como las de mayor multidrogoresistencia hacia todos los antibióticos.
- Se identificaron a las cepas de *Bacillus velezensis* 1054, *Bacillus* sp 1078, *Bacillus* sp 1076 y *Bacillus* sp 1085 como las que presentan un mayor potencial de inhibición hacia las cepas de *Staphylococcus*.
- Se observó una mayor inhibición del crecimiento de *Staphylococcus* cuando la cepa de *Bacillus* está en contacto directo con esta.
- Se observa una mayor inhibición de *Staphylococcus* spp. cuando las cepas de *Bacillus* son incubadas un día antes y ya presentan un notable crecimiento

11. BIBLIOGRAFIA

1. Alcaraz LD, Moreno-Hagelsieb G, Eguiarte LE, Souza V, Herrera-Estrella L and Olmedo G. 2010. Understanding the evolutionary relationships and major traits of *Bacillus* through comparative genomics. *BMC Genomics*. 11:332. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-11-332>
2. Barón S, editor. *Microbiología médica*. 4ª edición. Galveston (TX): rama médica de la Universidad de Texas en Galveston; 1996. Capítulo 15. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7699/>
3. Borriss, R., Chen, X., Rueckert, C., Blom, J., Becker, A., Baumgarth, B., et al. (2011). Relationship of *Bacillus amyloliquefaciens* clades associated with strains DSM7T and FZB42: a proposal for *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* subsp. nov. and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* subsp. nov. based on their discriminating complete genome sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 1786–1801. doi: 10.1099/ijms.0.023267-0
4. Cao Y., Pi H., Chandransu P., Li Y., Wang Y., Zhou H., Xiong H., Helmann JD, Cai Y. Antagonismo de dos aislados de *Bacillus velezensis* que promueven el crecimiento de plantas contra *Ralstonia solanacearum* y *Fusarium oxysporum*. *ciencia Rep.* 2018; 8 :1–14. doi: 10.1038/s41598-018-22782-z.
5. Castillo, C., Sosa, B y Scorza, J. (2004). Evaluación de la termorresistencia en metabolitos antifúngicos, producidos por esporulados del género *Bacillus*. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* Vol. 24, num 1-2, p 65-67.
6. Castro-Orozco, Raimundo, Villafañe-Ferrer, Lucy, Rocha-Jiménez, Julio, & Alvis-Guzmán, Nelson. (2018). RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *Staphylococcus aureus* Y *Staphylococcus epidermidis*: TENDENCIA TEMPORAL (2010-2016) Y FENOTIPOS DE MULTIRRESISTENCIA, CARTAGENA (COLOMBIA). *Biosalud*, 17(2), 25-36. <https://doi.org/10.17151/biosa.2018.17.2.2>
7. Cervantes-García, E., García-González, R., & Salazar-Schettino, P. M. (2013). Importancia de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente intrahospitalario y adquirido en la comunidad. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y*

8. Chen XH, Koumoutsis A., Scholz R., Schneider K., Vater J., Süssmuth R., Piel J., Borriss R. El análisis del genoma de *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 revela su potencial para el control biológico de patógenos de plantas. *J. Biotecnología*. 2009; 140 :27–37. doi: 10.1016/j.jbiotec.2008.10.011
9. Chowdhury SP, Hartmann A, Gao X, Borriss R. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 - a review. *Front Microbiol*. 2015 Jul 28;6:780. doi: 10.3389/fmicb.2015.00780. PMID: 26284057; PMCID: PMC4517070.
10. Cohn F. 1972. Untersuchungen Über Bakterien. *Beitrage zur Biologie Pflanz*. 1:127-1224
11. Duitman, E. H., Hamoen, L. W., Rembold, M., Venema, G., Seitz, H., Saenger, W., et al. (1999). The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 13294–13299. doi: 10.1073/pnas.96.23.13294
12. Fan, B., Wang, C., Song, X., Ding, X., Wu, L., Wu, H., Gao, X. & Borriss, R. (2019). Corrigendum: *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The Gram-Positive Model Strain for Plant Growth Promotion and Biocontrol. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01279>
13. Garza-Velasco, Raúl, Zúñiga-Rangel, Oliva, & Perea-Mejía, Luis Manuel. (2013). La importancia clínica actual de *Staphylococcus aureus* en el ambiente intrahospitalario. *Educación química*, 24(1), 8-13. Recuperado en 03 de abril de 2023, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-893X2013000100002&lng=es&tlng=es.
14. Goodson, J. R., Klupt, S., Zhang, C., Straight, P., and Winkler, W. C. (2017). LoaP is a broadly conserved antiterminator protein that regulates antibiotic gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens*. *Nat. Microbiol*. 2:17003. doi: 10.1038/nmicrobiol.2017.3

15. He, P., Hao, K., Blom, J., Rückert, C., Vater, J., Mao, Z., et al. (2012). Genome sequence of the plant growth promoting strain *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* B9601-Y2 and expression of mersacidin and other secondary metabolites. *J. Biotechnol.* 164, 281–291. doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.12.014
16. Holt, J., Sneath, P., Mair, N. & Sharpe, M. (1984). *Bergey's, Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2. Edited by Williams & Wilkins. Baltimore, MD, USA. 965-1599 p.
17. Hurtado, M. P., de la Parte, M. A., & Brito, A. (2002). *Staphylococcus aureus*: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica.. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 22(2), 112-118. Recuperado de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562002000200003&lng=es&tlng=es.
18. Ito, T., Okuma, K., Ma, XX, Yuzawa, H., & Hiramatsu, K. (2003). Perspectives on genome-wide *Staphylococcus aureus* antibiotic resistance: SCC genomic island. *Drug Resistance Updates*, 6(1), 41–52. doi:10.1016/s1368-7646(03)00003-7
19. Lertcanawanichakul, M., & Sawangnop, S. (2011). A Comparison of Two Methods Used for Measuring the Antagonistic Activity of *Bacillus* Species. *Walailak Journal of Science and Technology*, 5(2), 161–171. <https://doi.org/10.2004/wjst.v5i2.86>
20. Lin, L. Z., Zheng, Q. W., Wei, T., Zhang, Z. Q., Zhao, C. F., Zhong, H., Xu, Q. Y., Lin, J. F. & Guo, L. Q. (2020). Isolation and Characterization of Fengycins Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* JFL21 and Its Broad-Spectrum Antimicrobial Potential Against Multidrug-Resistant Foodborne Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.579621>
21. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K et al. Mortalidad mundial y regional por 235 causas de muerte para 20 grupos de edad en 1990 y 2010: un

- análisis sistemático para el estudio de la carga mundial de morbilidad 2010. Lancet 2012; 380: 2095– 2128
22. LPSN, List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. 2016. Genus Bacillus. Microbiology Society. Charles Darwin House, 12 Roger St, London WC1N 2JU, United Kingdom. <http://www.bacterio.net/bacillus.html>
 23. Maughan H and van der Auwera G. 2011. Bacillus taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. Infection, Genetics and Evolution. 11:789-797. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.02.001>
 24. Montero-Recalde, Mayra, Vayas, Lorena, Avilés-Esquivel, Diana, Pazmiño, Pilar, & Erazo-Gutiérrez, Vinicio. (2018). Evaluación de dos métodos para medir la sensibilidad a la inhibición del crecimiento de la cepa certificada de Staphylococcus aureus subsp. aureo Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú , 29 (4), 1543-1547. <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v29i4.15185>
 25. Nakamura L. K. , Roberts M. S. , Cohan F. M. 1999 ; Relación de los clados de Bacillus subtilis asociados con las cepas 168 y W23: una propuesta para Bacillus subtilis subsp. subtilis subesp. nov. y Bacillus subtilis subesp. spizizenii subesp. nov. Int J Syst Bacteriol 49: 1211– 1215
 26. Ongena M., Jacques P. Lipopéptidos de Bacillus : armas versátiles para el control biológico de enfermedades de las plantas. Tendencias Microbiol. 2008; 16 :115–125. doi: 10.1016/j.tim.2007.12.009
 27. Orenstein A. The discovery and naming of Staphylococcus aureus. <http://www.antimicrobe.org/h04c.files/history/S-aureus.pdf>
 28. Pasachova Garzón, J, Ramírez Martínez, S, & Muñoz Molina, L. (2019). Staphylococcus aureus: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. Nova, 17(32), 25-38. Retrieved February 25, 2023, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702019000200025&lng=en&tlng=es.
 29. Pradhan, A. K., Pradhan, N., Mall, G., Panda, H. T., Sukla, L. B., Panda, P. K., et al. (2013). Application of lipopeptide biosurfactant isolated from a halophile: Bacillus tequilensis CH for inhibition of biofilm. Appl. Biochem. Biotechnol. 171, 1362–1375. doi: 10.1007/s12010-013-0428-3

30. Rabbee MF, Ali MS, Choi J, Hwang BS, Jeong SC, Baek KH. *Bacillus velezensis*: A Valuable Member of Bioactive Molecules within Plant Microbiomes. *Molecules*. 2019 Mar 16;24(6):1046. doi: 10.3390/molecules24061046. PMID: 30884857; PMCID: PMC6470737
31. Ramírez V, Baez A, López P, Bustillos R, Villalobos MÁ, Carreño R, Contreras JL, Muñoz-Rojas J, Fuentes LE, Martínez J, Munive JA. Chromium Hyper-Tolerant *Bacillus* sp. MH778713 Assists Phytoremediation of Heavy Metals by Mesquite Trees (*Prosopis laevigata*). *Front Microbiol*. 2019 Aug 13;10:1833. doi: 10.3389/fmicb.2019.01833. PMID: 31456770; PMCID: PMC6700308.
32. Ruiz-García C, Béjar V, Martínez-Checa F, Llamas I, Quesada E. *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2005 Jan;55(Pt 1):191-195. doi: 10.1099/ijs.0.63310-0. PMID: 15653875.
33. Santos, A. L. dos, Santos, D. O., Freitas, C. C. de, Ferreira, B. L. A., Afonso, I. F., Rodrigues, C. R., & Castro, H. C. (2007). *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *Revista Brasileira de Patologia e Medicina Laboratorial*, 43(6), 413–423. doi:10.1590/s1676-24442007000600005
34. Secretaría de Salud Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud Dirección General de Epidemiología www.gob.mx/salud. (2022, agosto). PANORAMA EPIDEMIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES ASOCIADAS A LA ATENCIÓN DE LA SALUD (IAAS). Boletín Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS) Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE). https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/770528/BOLET_NR_HOVEAGOSTO2022_Final_21102022_1.pdf
35. Shen, B. (2003). Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7, 285–295. doi: 10.1016/S1367-5931(03)00020-6
36. Souza, N. C., Gomes, M. N., Maciel, R. R., Silva, R. J., Trescher, T. F., Gorza, F. D., Pedro, G. C., Correa, K. C., Souza, M. C., & Silva, J. R. (2013). Evaluation of the antimicrobial activity of *Stryphnodendron barbatiman* against

<l>*Citrobacter freundii*</i> Materials Sciences and Applications, 04(12), 780–785.
<https://doi.org/10.4236/msa.2013.412099>

37. Tejera-Hernández B, Rojas-Badía MM y Heydrich-Pérez M. 2011. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 42:131-138
38. Todd, E. C. D. (2014). Bacteria: *Staphylococcus aureus*. *Encyclopedia of Food Safety*, 530–534. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-378612-8.00115-3>
39. Villarreal-Delgado, María Fernanda, Villa-Rodríguez, Eber Daniel, Cira-Chávez, Luis Alberto, Estrada-Alvarado, María Isabel, Parra-Cota, Fannie Isela, & Santos-Villalobos, Sergio de los. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista mexicana de fitopatología*, 36(1), 95-130. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706>
40. <https://www.probiotek.com/productos/reactivos/medios-de-cultivo-reactivos/caldo-luria-luria-bertani-lb/>
41. <https://apracom-ec.com/producto/agar-ym-formulaciones-de-agar/#:~:text=El%20agar%20YM%20se%20utiliza,la%20formulaci%C3%B3n%20publicada%20por%20Wickerham.>