



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA**

POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS



**ESTUDIO DE LOS PRODUCTOS NATURALES PRODUCIDOS EN ESPECIES
DEL GRUPO DE *Bacillus cereus***

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS**

PRESENTA:

M. C. MARTÍN BRUNO SALAZAR GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS

Dr. José Aurelio Ortiz Márquez

CO-ASESOR DE TESIS

Dra. Estibaliz Sansinenea Royano

H. PUEBLA DE Z. JULIO DE 2024





BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por la Dra. Martha Sosa Rivadeneyra, Dr. David Miguel Aparicio Solano, Dra. Carmen María González Álvarez, Dra. Jessica Vaca Calderón y la Dra. Gabriela Huelgas Saavedra, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **“ESTUDIO DE LOS PRODUCTOS NATURALES PRODUCIDOS EN ESPECIES DEL GRUPO DE *Bacillus cereus*”**, que presenta el alumno **M.C. Martín Bruno Salazar González** para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los cuatro días del mes de junio del año dos mil veinticuatro.

ATENTAMENTE

Dra. Martha Sosa Rivadeneyra

Dr. David Miguel Aparicio Solano

Dra. Carmen María González Álvarez

Dra. Jessica Vaca Calderón

Dra. Gabriela Huelgas Saavedra

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología microbiana y Síntesis Orgánica del posgrado en Ciencias químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), bajo la dirección del Dr. J. Aurelio Ortíz Márquez y la Dra. Estibaliz Sansinenea, con el apoyo de la beca Nacional otorgada por CONAHCYT y el proyecto VIEP 100518932-2023.

AGRADECIMIENTOS

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla que me permitió realizar mis estudios de doctorado dentro de su casa de estudios, ha sido un gusto para mí formar parte de esta institución que siempre se preocupa porque al alumno no le falten los instrumentos necesarios para sus estudios, en especial a la rectora la doctora Lilia Cedillo por su gestión siempre preocupada por los alumnos.

Al laboratorio de Biotecnología microbiana y Síntesis Orgánica del posgrado en Ciencias químicas (FCQ2) presidido por la doctora Estibaliz Sansinenea Royano y el doctor José Aurelio Ortíz Márquez, con su invaluable apoyo fue posible la finalización de este proyecto.

A mis compañeros y amigos de laboratorio que me ayudaron en la introducción al mundo de los productos naturales en microorganismos. Gracias a Jessica, Yhareli, Andrea, Daniel, Samaria y Adria. Siempre fue muy grato y ameno el trabajo a lado de ustedes. De igual manera quiero agradecer a Juan Gois y a Ulises por su apoyo a la hora de trabajar con los disolventes, son personas muy serviciales.

También gracias al apoyo de los chicos de servicios social, por su apoyo técnico dentro del laboratorio, gracias a Debhani, Eridani, Itzel, Dafne, Erika, Alexa y Karen.

Al Doctor David M. Aparicio encargado de resonancia y su alumno Alan Esau por su apoyo cuando algo se complicaba con el espectrometro, siempre hubo una pronta respuesta, gracias.

Por último y no menos importante, gracias a mis sinodales, gracias por sus observaciones para la escritura de la tesis y por el tiempo dedicado a la revisión de la misma.

DEDICATORIA

En primer lugar, quiero dedicar este logro a Dios por la inigualable dicha de llegar a finalizar esta etapa, recordemos que este proyecto se realizó en el transcurso de la pandemia (SARS-COV-2) y muchas vidas se perdieron alrededor del mundo. Siempre he contado con su protección y no merece menos que siempre estar agradecido. Para finalizar este primer párrafo quiero citar un pequeño poema que escuché en una película y creo que se adecua a lo que es Dios para mí:

“Incapaz de percibir tu forma,
te encuentro a mi alrededor.
Tu presencia llena mis ojos con tu amor,
vuelve humilde mi corazón,
porque estás en todas partes”

<<The shape of water>>

Quiero dedicar también este trabajo a la memoria de mi tía-abuela María Julia Báez Báez, no hay palabras que puedan agradecer todo su apoyo, ella fue la única madre que conocí. Ella junto a mi bisabuelita –Piedad Báez Saldaña– nos criaron a mis hermanos y a mí. Si existe el cielo estoy seguro que ambas forman parte de ese paraíso, del que tantas religiones hablan. Podría escribir más cosas, pero definitivamente no hay palabras para describir sus almas tan nobles. Solo me queda dejar este testimonio escrito, que habla sobre dos mujeres extraordinarias, que tuve el honor de haber conocido.

A mi difunto padre, Juan Salazar Báez, sé que estarías muy orgullo de nosotros. En muy pocas oportunidades hablo de él porque, aunque han pasado más de treinta años, no me deja de doler su ausencia. Pero a donde quiera que esté tu alma, ten por seguro que mi tía Mari y mi bisabuelita, hicieron un gran trabajo.

A mis hermanos Arturo y Carla que siempre hemos estado juntos en las buenas y en las malas, pero siempre apoyándonos. Los quiero mucho, son muy importantes en vida.

A mi querida sobrina Miranda, eres una niña muy inocente y noble, no cambies jamás, tu esencia que hace de tu alma, un alma pura.

A los amigos que he hecho aquí en Puebla, gracias por su cariño y amistad. Gracias a Andrea Calderón, Cinthia Cerón, Jessica Vaca, Yhareli Herrera, Jorge Sánchez y Daniel Torres. Me dio mucho gusto conocerlos.

A mis directores de tesis, gracias por su apoyo y tiempo en las asesorías que se presentaron a lo largo de mi estancia en su laboratorio. No olvidaré la emoción que sentí al ver mi nombre en la lista de aceptados al posgrado.

Por último, a las doctoras Carmen y Fabiola, gracias por su amistad y cariño. Amistad que se ha fortalecido por estos diez años de conocernos, espero que sean muchos más. Ha sido un gran honor contar con su amistad.

PUBLICACIONES

Parte de los resultados obtenidos durante la elaboración del presente trabajo de tesis doctoral ha generado las siguientes publicaciones:

- Bruno Salazar, Aurelio Ortiz, Chetan Keswani, Tatiana Minkina, Saglara Mandzhieva, Satyendra Pratap Singh, Bhagwan Rekadwad, Rainer Borriss, Akansha Jain, Harikesh B. Singh, Estibaliz Sansinenea. Bacillus Spp as Bio-factories for Antifungal Secondary Metabolites: Innovation Beyond Whole Organism Formulations. *Microbial Ecology* (2023) 86:1–24, <https://doi.org/10.1007/s00248-022-02044-2>.
- Bruno Salazar, Jessica Vaca, Carmen María González-Álvarez, Aurelio Ortiz, Estibaliz Sansinenea. A comparative study about the compounds isolated from species of the Bacillus cereus group: helping to define the species. *Natural Product Research*. (2024) En revisión.

INDICE

<i>AGRADECIMIENTO</i>	3
<i>DEDICATORIA</i>	4
<i>PUBLICACIONES</i>	5
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUCCIÓN	10
2. ANTECEDENTES	12
2.1 Productos Naturales y su extracción	12
2.2 Productos Naturales de <i>Bacillus</i> Sp	15
2.3 El grupo de <i>Bacillus cereus</i>	19
2.3.1 <i>B. mycoides</i>	21
2.3.2 <i>Bacillus weihenstephanensis</i>	21
2.3.3 <i>Bacillus thuringiensis</i>	21
2.3.4 <i>Bacillus anthracis</i>	22
2.3.5 <i>Bacillus cereus</i>	23
2.3.6 <i>Bacillus pseudomycoides</i>	23
2.3.7 <i>Bacillus cytotoxicus</i>	24
2.3.8 <i>Bacillus toyonensis</i>	24
3. OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo general	25
3.2 Objetivos particulares.....	25
4. PARTE EXPERIMENTAL	26
4.1 Obtención de extractos crudos	26
4.2 Purificación de los extractos crudos mediante cromatografía en columna	27
4.3 Caracterización de los compuestos	27
4.4 Electroforesis en gel SDS-PAGE.....	27
4.5 Pruebas biológicas en bacterias.....	29
5. RESULTADOS	30
5.1 Compuestos naturales obtenidos en tres especies de <i>Bacillus</i> del grupo <i>B. cereus</i>	30
5.2 Compuestos naturales obtenidos de <i>B. weihenstephanensis</i>	31
5.3 Purificación de los compuestos naturales obtenidos de <i>B. weihenstephanensis</i>	33
5.3.1 Fracción 5.....	34
5.3.2 Fracción 6.....	38
5.3.3 Fracción 7.....	41

5.3.4 Fracciones 11-13	49
5.4 Compuestos naturales obtenidos de <i>B. cereus</i>	51
5.5 Purificación de los compuestos naturales obtenidos de <i>B. cereus</i>	52
5.5.1 Fracción 5	53
5.5.2 Fracción 6	53
5.5.3 Fracción 7	53
5.5.4 Fracción 10-12	53
5.6 Estudio comparativo de compuestos naturales obtenidos de las especies del grupo <i>B. cereus</i>	55
6. CONCLUSIONES	58
7- BIBLIOGRAFÍA	61

RESUMEN

El estudio químico de un organismo, y la elucidación de las estructuras moleculares de sus componentes, puede dar lugar a una serie de aplicaciones que van desde la utilización del propio organismo estudiado, como materia prima bruta, sin ningún tipo de tratamiento, hasta la producción masiva de éste para la posterior aplicación de procedimientos extractivos, orientado a la producción industrial, en “biofábricas” o “biogranjas”, de productos de alto valor añadido aplicables a sectores como el farmacéutico, cosmético, nutracéutico, agrario entre otros. El género bacteriano *Bacillus* Spp es uno de los que más han llamado la atención de la investigación científica debido a su capacidad para producir toxinas, enzimas y productos naturales con actividad antifúngica, antibacteriana, antiviral, estimuladora de crecimiento vegetal y activadora de mecanismos de resistencia en plantas.

El grupo de *Bacillus. cereus* es una subdivisión del género *Bacillus* y agrupa a ocho especies diferentes que son: *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycooides*, *B. weihenstephanensis*, *B. pseudomycooides*, *B. cytotoxicus*, y *B. toyonensis*.

En el laboratorio se tienen cepas de cinco de estas especies, identificadas en estudios previos mediante análisis de la secuencia 16S rRNA, como son *B. cereus*, *B. mycooides*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis* y *B. toyonensis*. En este estudio se analizarán los metabolitos que cada una de estas cepas sintetiza. Para realizar un estudio acerca de qué productos naturales se encuentran en cada especie y si hay alguna diferencia entre los generados, esto podría ser una característica que diferencie a estas especies cuya identidad de genoma es muy alta y a veces difícil de aclarar las diferencias o similitudes de las diferentes especies de este grupo. Por lo que poder establecer una diferencia respecto al perfil de compuestos químicos, podría establecer sin duda ante que especie estamos, sin necesidad de realizar estudios genéticos.

ABSTRACT

The chemical study of an organism, and the elucidation of the molecular structures of its components, can give rise to a series of applications ranging from the use of the organism under study as raw material, without any type of treatment, to the mass production of this for the subsequent application of extractive procedures, oriented towards the industrial production, in "biofactories" or "bio-farms", of high added value products applicable to sectors such as pharmaceuticals, cosmetics, nutraceuticals, agriculture, among others. The bacterial genus *Bacillus* Spp is one of those that have attracted most attention in scientific research due to its ability to produce toxins, enzymes and natural products with antifungal, antibacterial, antiviral, plant growth stimulating and resistance activating activity in plants.

The *B. cereus* group is a subdivision of the genus *Bacillus* and groups eight different species which are: *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. pseudomycoides*, *B. cytotoxicus* and *B. toyonensis*,

The laboratory has strains of five of these species, identified in previous studies by 16S rRNA sequence analysis, such as *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis* and *B. toyonensis*. In this study, the compounds that each of these strains have will be analyzed.

This will allow a study to be made of which natural products are found in each species and if there is any difference between the products produced it could be a feature that differentiates these species whose genome identity is very high and sometimes difficult to clarify the differences or similarities of the different species in this group. Therefore, being able to establish a difference with respect to the profile of chemical compounds could establish without a doubt which species we are dealing with without the need to carry out genetic studies.

1. INTRODUCCIÓN

Absolutamente todo lo que nos rodea está compuesto por moléculas, tanto orgánicas como inorgánicas y elementos. Todo a nuestro alrededor tiene una química intrínseca que se debe diferenciar de la sintética y de la natural. El término producto natural ha sido utilizado desde finales del siglo XVIII hasta nuestros días, ya que desde ese tiempo se usaban procedimientos químicos para la extracción, aislamiento y caracterización estructural de las sustancias. Este término se puede definir como cualquier sustancia aislada de organismos vivos, ya sean plantas, animales, hongos o bacterias.

Los microorganismos son maquinarias excelentes para la síntesis de productos naturales con extraordinarias estructuras tanto por su complejidad química como por su bioactividad.¹ Los productos naturales son moléculas de distinto peso molecular, que no se producen en la vía metabólica primaria y que no juegan un papel fundamental en las funciones primarias o de crecimiento y que tienen un impacto profundo en muchas áreas de investigación, incluida la medicina, química orgánica y la biología celular.²⁻⁴

Estos compuestos mantienen una fuente importante para el descubrimiento de fármacos y continúa siendo una inspiración para la química sintética por su compleja arquitectura superlativa.⁵ Es importante destacar que, aunque se cultiven cepas del mismo género y sean idénticas pueden producir productos naturales diferentes y alternativamente cepas que son diferentes pueden producir los mismos productos naturales y por supuesto su manejo en el laboratorio puede ser distinto. El futuro está en aprovechar las excelentes propiedades biosintéticas de los seres vivos en beneficio de la salud.⁶ La exploración de la diversidad microbiana y la cantidad de compuestos producidos por bacterias ha llevado a considerarlos como una fuente importante de productos naturales con propiedades biológicas.

El estudio químico de un organismo, y la elucidación de las estructuras moleculares de sus componentes, puede dar lugar a una serie de aplicaciones que van desde la utilización del propio organismo estudiado como materia prima bruta, sin ningún tipo de tratamiento, hasta la producción masiva de éste, un claro ejemplo de esto es la producción a gran escala de la insulina humana, auxiliar en el tratamiento de la diabetes⁷ para la posterior aplicación de procedimientos extractivos, orientado a la producción industrial, en “biofábricas” o “biogranjas”, de productos de alto valor añadido aplicables a sectores como el farmacéutico, cosmético, nutracéutico, agrario entre otros.⁸

El género bacteriano *Bacillus* Spp es uno de los que más han llamado la atención de la investigación científica debido a su capacidad para producir toxinas, enzimas y productos naturales con actividad antifúngica, antibacteriana, antiviral, estimuladora de crecimiento vegetal y activadora de mecanismos de resistencia en plantas.⁹

El grupo de *B. cereus* es una subdivisión del género *Bacillus* y agrupa a ocho especies diferentes que son: *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. pseudomycooides*, *B. cytotoxicus* y *B. toyonensis*. Dichas bacterias tienen menos del 5% de diferencias genéticas comparadas con otras especies del género *Bacillus*.¹⁰

En este grupo de investigación, de Biotecnología de Productos Naturales, se han caracterizado los compuestos aislados de varias especies del género de *Bacillus*. Algunos compuestos se encuentran en varias especies y otros no, porque son específicos de cada una de ellas. En este trabajo se pretende estudiar los compuestos aislados en cinco especies diferentes pertenecientes a la familia de *B. cereus*. Esto permitirá poder realizar un estudio acerca de qué productos naturales se encuentran en cada especie y si hay alguna diferencia entre los productos generados, entonces este hallazgo podrá ser una característica que ayude a diferenciar a dichas especies cuya identidad de genoma es muy alta.

2. ANTECEDENTES

2.1 Productos Naturales y su extracción

El hombre siempre busca comprender el complejo, pero fascinante mundo de la química natural y trata en lo posible de imitarla, sintetizando los principios activos y de allí por ejemplo se ha logrado formular un sin fin de medicamentos de uso común cuyo origen se deriva de plantas medicinales.

Las medicinas naturales se desarrollaron en la vida cotidiana de nuestros antepasados y en este proceso de lucha contra las enfermedades durante miles de años, se ha gestado un impacto positivo en el progreso de la civilización humana. Hoy en día, los medicamentos que se conocen tienen sus raíces en medios naturales, ejemplo de esto se encuentra a la penicilina, descubierta en la década de los cuarenta, que ayudó a tratar las infecciones en los diversos campos de concentración durante la segunda guerra mundial.¹¹ También en los años sesenta fue descubierto el taxol, como parte de un ambicioso proyecto de los Estados Unidos de América, con la finalidad de combatir el cáncer. Los medicamentos no solo satisfacen las necesidades de atención primaria de la salud en la mayoría de las personas que viven en países en vías de desarrollo, sino que han atraído cada vez más atención en los países desarrollados debido a los altos costos de la atención médica y la austeridad financiera universal. Los productos químicos que se sabe que tienen beneficios medicinales se consideran "ingredientes activos" o "principios activos" de las medicinas naturales. De este modo los productos naturales han proporcionado las fuentes principales para el desarrollo de nuevos fármacos y aún se continúa buscando moléculas que sean capaces de combatir aquellas enfermedades que se han vuelto resistentes a los tratamientos conocidos.¹²

Para realizar la síntesis de los productos naturales la Naturaleza utiliza una serie de unidades básicas como material de construcción (building blocks). Cada uno de esos metabolitos va a formar parte de una ruta de biosíntesis, por mencionar algunas: están la ruta del mevalonato, ruta del ácido shikimico, así como también de los policétidos, ruta para la síntesis de alcaloides, entre otras. Cada una de estas rutas va a formar una compleja red de metabolitos, con características similares. Éstos pueden poseer un número variado de átomos de carbono, como parte de la estructura principal, además otros elementos como oxígeno y nitrógeno. Ejemplos muy característicos, son terpenos, flavonoides, cumarinas, alcaloides, entre otros tantos.¹³ Hay que mencionar que no todas las rutas de biosíntesis se encuentran

en todos los organismos, algunas son exclusivas de plantas, en este caso los metabolitos que son principalmente sintetizados en plantas son los terpenos, se han identificado más de 50,000 compuestos.¹⁴ También los alcaloides, que son compuestos nitrogenados, a partir de aminoácidos pueden ser sintetizados en plantas.¹⁵

El suelo como nicho ecológico de distintos tipos de microorganismos, se caracteriza por ser heterogéneo y complejo, en él se encuentra contenido una gran parte de la microbiota del planeta (bacterias, hongos y levaduras); a pesar de esto se han investigado pocos organismos y los metabolitos secundarios producidos por los mismos.¹⁶ El futuro está en aprovechar las excelentes propiedades biosintéticas de los seres vivos en beneficio de la salud. La exploración de la diversidad microbiana y la cantidad de productos naturales producidos por bacterias ha llevado a considerarlos como una fuente importante de productos naturales con propiedades biológicas.¹⁷ Los productos naturales por mucho tiempo se han utilizado en medicina por su interés farmacológico, incluso antes de que la medicina fuera formalmente una ciencia, distintas civilizaciones utilizaban de manera indirecta a los productos naturales para curar diversas enfermedades.¹⁸

El rendimiento de los productos naturales que se encuentran en los microorganismos es siempre bastante bajo. El proceso de extracción y aislamiento requiere mucho tiempo y trabajo dentro del laboratorio, esto ha sido el cuello de botella para la utilización de productos naturales en el desarrollo de fármacos. Existe una necesidad urgente de desarrollar métodos efectivos y selectivos para la extracción y aislamiento de productos naturales bioactivos.

La extracción es el primer paso para separar los productos naturales deseados de las materias primas. Dicha extracción va a depender del tipo de metabolito que se esté buscando, por ejemplo, aceites esenciales, terpenos, alcaloides, lipopéptidos, etcétera. La extracción con solventes es el método más utilizado. La extracción de productos naturales progresa a través de las siguientes etapas: (1) el solvente penetra en la matriz sólida; (2) el soluto se disuelve en los solventes; (3) el soluto se difunde fuera de la matriz sólida; (4) se recogen los solutos extraídos. Cualquier factor que mejore la difusividad y la solubilidad en los pasos anteriores facilitará la extracción. Las propiedades del disolvente de extracción, el tamaño de partícula de las materias primas, la ración de disolvente a sólido, la temperatura de extracción y la duración de la extracción afectarán la eficiencia de extracción.¹⁹

Otro método para extraer compuestos es utilizar las resinas adsorbentes. Las resinas macroporosas son polímeros fisicoquímicamente estables con características polares, no

polares o ligeramente polares y una elevada capacidad de adsorción de compuestos orgánicos.²⁰ Están hechas de resina a base de poliestireno-divinilbenceno (XAD-1, XAD-2, XAD-4, XAD-16, etcétera) y resinas a base de éster de ácido poliacrílico (XAD-7, XAD-8 y XAD-11). Pueden adsorber una gran cantidad de compuestos polares debido a su contacto superficial con muestras acuosas.²¹ Como se puede ver en la tabla 1 hay distintos tamaños de partícula, con una gran superficie de adsorción. Estas resinas pueden ser o no, hidrofóbicas. Tales resinas macroporosas tienen una extensa aplicación para la obtención de metales pesados en una muestra, así como también para la obtención de polifenoles a partir de extractos de plantas.²² Estos sistemas de adsorción han sido ampliamente utilizados ya sea como un sistema independiente, o como parte de un proceso de pretratamiento para eliminar impurezas o enriquecer compuestos debido a sus ventajas, que incluyen: alta capacidad de adsorción, costo relativamente bajo, fácil regeneración y fácil escalado. Los mecanismos por los cuales las resinas macroporosas tienen esa capacidad de ser adsorbentes incluyen fuerzas electrostáticas y formación de puentes de hidrógeno.²³

Tabla 1. Algunos tipos de resinas macroporosas y sus características.

Amberlita	Tamaño de poro Å	Superficie específica (m ² /g)	Tamaño de partícula (mesh)
XAD-2	90	330	20-60
XAD-4	40	725	20-60
XAD-16	100	800	20-60

Los extractos obtenidos por medio de estas resinas macroporosas, contienen una gran diversidad de metabolitos y por la complejidad del extracto se necesita un mayor número de procesos de purificación. La separación depende de las características químicas del producto a purificar. Una técnica muy utilizada para la separación de compuestos es la cromatografía, especialmente la cromatografía en columna y este es el principal método utilizado para obtener productos naturales puros a partir de una mezcla compleja.¹⁹

La separación se basa en las diferencias entre las afinidades de adsorción de los productos naturales a la superficie de los adsorbentes. La selección de adsorbentes (fase estacionaria), así como la fase móvil es crucial para lograr una buena separación de los productos naturales, maximizar la recuperación de los compuestos objetivo y evitar la adsorción irreversible de los mismos en los adsorbentes. El gel de sílice es el adsorbente más

utilizado en la investigación de productos naturales. Esta fase estacionaria es un adsorbente polar con grupos silanol. Las moléculas son retenidas por el gel de sílice a través de enlaces de hidrógeno, también llamados puentes de hidrógeno e interacciones dipolo–dipolo.²⁴ Por lo tanto, los productos naturales polares se retienen más tiempo en columnas de gel de sílice que los no polares. A veces, ciertos productos naturales polares pueden sufrir quimisorción irreversible. La desactivación del gel de sílice mediante la adición de agua antes de su uso o el uso de una fase móvil que contenga agua debilitará la adsorción.¹⁹

2.2 Productos Naturales de *Bacillus* Sp

El modelo de estudio de este proyecto es el género bacteriano *Bacillus*. Entre las características de *Bacillus* destaca su crecimiento aerobio o en ocasiones anaerobio facultativo, Gram-positivas, morfología bacilar, movilidad flagelar, y tamaño variable (0.5 a 10 μm), 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), poseen capacidad de producir endosporas (ovales o cilíndricas) como mecanismo de resistencia a diversos tipos de estrés. La presencia de endosporas le confiere al género de *Bacillus* la 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.²⁵

Las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* tienen una larga y distinguida historia en los ámbitos de la biotecnología. En este género se incluyen muchas bacterias versátiles, tales como los agentes de control biológico, estas bacterias son muy eficaces para tratar diversas plagas de insectos. Las especies de *Bacillus* son capaces de producir un amplio rango de metabolitos con estructura y naturaleza muy diferente mostrando un amplio espectro de actividades. Estos productos naturales incluyen antibióticos, pigmentos, toxinas, promotores de crecimiento y otros compuestos bioactivos que están diseñados para capacitar a la bacteria para sobrevivir en su ambiente natural.²⁵⁻²⁶ Las plantas son excelentes productores de productos naturales. Sin embargo, también en los microorganismos hay una gran producción de estas sustancias y muchas de ellas tienen estructuras bastante inusuales, entre estas hay anillos de β -lactama, dobles enlaces de poli-acetileno, compuestos diazo, cloro y bromo unidos covalentemente, macrólidos, etcétera.⁴ Esta amplia variabilidad de estructuras y actividades de los compuestos expande el potencial de la importancia industrial

y biotecnológica del género *Bacillus* con sus especies relacionadas y variadas aplicaciones en el ambiente, la agricultura y la biotecnología industrial. Dentro de los productos naturales producidos por especies de *Bacillus* Spp se encuentran cuatro familias: bacteriocinas, lantibióticos, lipopéptidos y Policétidos.²⁵ Entre algunas de las funciones de estos metabolitos encontramos: promotores de crecimiento, bactericidas, fungicidas, quelantes del Hierro, etc.²⁶

En nuestro laboratorio de Biotecnología Microbiana se ha trabajado en la extracción, purificación e identificación de compuestos orgánicos de varias cepas de *Bacillus* con especial énfasis en *B. thuringiensis* y *B. amyloliquefaciens*. Algunos compuestos se presentan de manera general en diferentes especies, sin embargo, otros compuestos son más específicos de ciertas especies. De esa manera se han podido identificar dicetopiperazinas, metabolitos formados por la condensación de dos α -aminoácidos (Figura 1), aislados a partir de *B. thuringiensis* y *B. endophyticus*²⁷ por lo que en este caso parecen ser compuestos independientes de la especie.

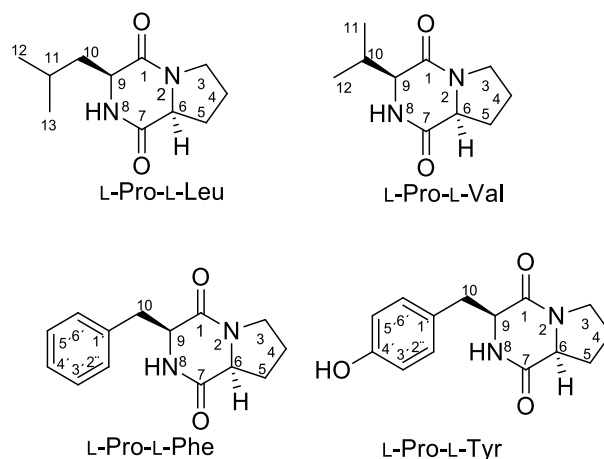


Figura 1. Estructuras de dicetopiperazinas aisladas de *B. thuringiensis*

Otro compuesto identificado de la bacteria *B. thuringiensis* y otras especies de *Bacillus* ha sido el di-(2-etilhexil)ftalato un compuesto relacionado con la industria de los plásticos (Figura 2), su estructura está compuesta por un anillo de benceno con dos grupos éster en posición orto. A pesar de haber sido aislado del género *Bacillus* Spp este compuesto puede ser sintetizado *in vitro* por varias reacciones de esterificación del ácido ftálico con diferentes alcoholes²⁸.

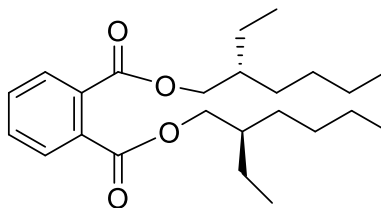


Figura 2. Di-(2-etilhexil) ftalato compuesto aislado de distintas cepas de *Bacillus Sp*

Otro hallazgo importante en la bacteria *B. thuringiensis* es que se pudo aislar la Melanina, un fotoprotector natural que ayuda a proteger a la misma especie de los rayos UV del sol que a la vez inactivan las toxinas Cry cuya función principal es ser bioinsecticidas contra plagas que se encuentran en los campos agrícolas.²⁹

Por otro parte, en las bacterias *B. thuringiensis* y *B. velezensis* se pudieron aislar diferentes alcaloides de tipo indol que tuvieron actividad antifúngica contra *Alternaria Sp*, *Fusarium oxysporum* y *Moniliophthora roreri*. Por otro lado, el estudio de estos compuestos determinó la capacidad antibacterial de la *N*-acetil triptamina hacia distintas bacterias de tipo Gram-positivas como *S. agalactie*, *S. saprophyticus*, *S. aureus*, etc.³⁰

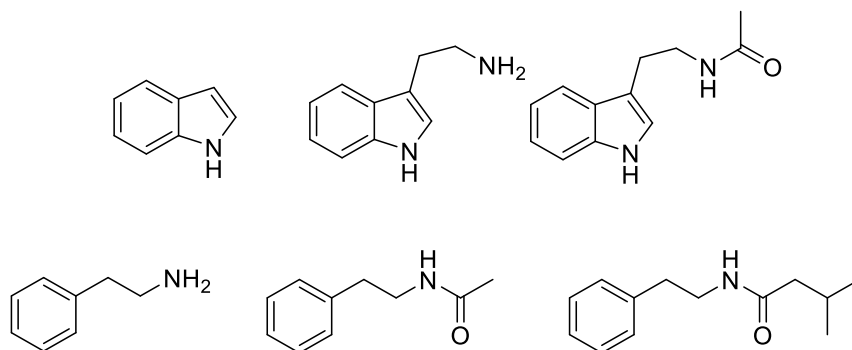


Figura 3. Estructuras de derivados indólicos aislados de *B. thuringiensis* y *B. velezensis*.

También se aislaron dos compuestos uno de ellos se había identificado previamente a principios de los años noventa por Gustafson y colaboradores³¹ en otra especie de *Bacillus sp* proveniente de un nicho marino. Se trata de la macrolactina a, y la 7-O- succinil Macrolactina A (Figura 4) que fue aislada por primera vez a finales de los años noventa, y cuya actividad fue evaluada contra dos bacterias Gram-positivas.³² Dentro de nuestro laboratorio se obtuvieron y purificaron estas moléculas a partir del extracto crudo de *B. amyloliquefaciens*. Dichos compuestos presentaron una destacada actividad antifúngica contra *A. niger*, *A. alternata*, *Fusarium Sp*, *F. proliferatum* entre otros, siendo la 7-O-succinil macrolactina a, más activa comparada con su análoga estructural, la macrolactina

a.³³ De este estudio se concluyó que las diferencias estructurales pueden ser decisivas cuando se evalúa su actividad biológica.

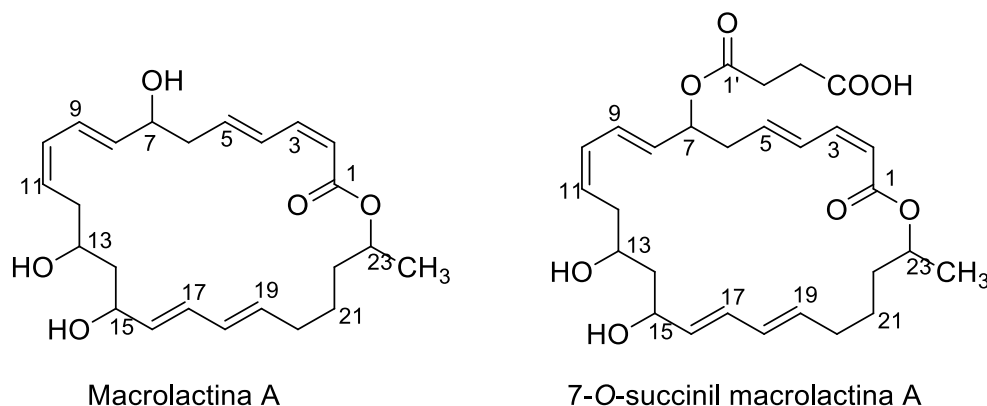


Figura 4. Estructuras de macrolactinas aisladas de *B. amyloliquefaciens*.

De la misma bacteria *Bacillus amyloliquefaciens*, también se pudieron aislar los lipopéptidos fengicina y surfactina que se han reportado como antifúngicos, así como bacteriocinas contra un amplio rango de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.³⁴

Cabe destacar que tanto los extractos crudos de cada bacteria como todos los compuestos aislados han sido sometidos a pruebas de actividad biológica contra hongos fitopatógenos y contra bacterias de interés clínico que son causantes de enfermedades en el ser humano.³⁰

Los hongos fitopatógenos son una amenaza para la agricultura, esta actividad siempre ha sido un método irremplazable para satisfacer la demanda de alimentos a nivel mundial. Actualmente la población mundial está creciendo muy rápido y con ello es muy importante que la agricultura pueda responder a esta demanda incrementando el rendimiento y la calidad de los cultivos. Se estima que para 2030 no se pueda alcanzar la meta de “cero hambre” debido a que más de 700 millones de personas viven en condiciones de inseguridad alimentaria y esta cifra parece que va en aumento.³⁵ Una de las razones por la que los alimentos escasean es que los cultivos sufren varias enfermedades y plagas ocasionadas por diversos microorganismos e insectos provocando daños en las cosechas y terribles pérdidas económicas. Para mitigar los efectos de las plagas se han venido utilizando durante varias décadas insecticidas y fungicidas químicos. Sin embargo, su uso a largo plazo ha provocado serios daños al ambiente y a la salud, ocasionando incluso resistencia de las plagas. También, origina mayores daños en el suelo tornándolo infértil y provocando una disminución en las cosechas cada vez más acentuada.³⁶ Por ello, el mundo actual se ha

volcado en el uso de biofertilizantes y biopesticidas que mejoran las cosechas, restauran la fertilidad de la tierra y atacan a plagas y patógenos de los cultivos y todo ello sin provocar daño ni en el medioambiente ni en la salud humana debido a su naturaleza de ser biológicos de origen natural. Entre los patógenos que causan graves daños en cosechas muy importantes se pueden encontrar *Fusarium oxysporum*³⁷ y *Moniliophthora roreri*.³⁸

F. oxysporum es una extensa familia de hongos que se presenta principalmente como saprófitos o patógenos especializados y que atacan todo tipo de cultivos de hortalizas como el tomate, pimientos, coliflor, brócoli, entre otros. Aquí en México un cultivo de gran importancia económica por su exportación a nivel mundial es el cultivo del Agave que se ve dañado seriamente por este hongo.³⁹ Por su parte *M. roreri* causa enfermedad en la planta de cacao (*Theobroma cacao*, fuente del chocolate). Síntomas externos como pequeñas partes oscuras en la superficie de las mazorcas pueden ser vistas después de 40 a 80 días de infección. México es gran productor de cacao a nivel Latinoamérica por lo que un daño severo en sus cultivos produce pérdidas económicas muy serias.⁴⁰

Las bacterias de interés clínico son aquellas que pueden causar enfermedades tan severas que pueden ocasionar hasta la muerte. Afortunadamente los antibióticos que matan a dichos patógenos en su mayoría son extraídos de otros microorganismos. Debido al mal uso de los antibióticos, se está incrementando el fenómeno llamado resistencia a los antibióticos. Esta resistencia a fármacos está siendo un problema de salud a nivel mundial con graves consecuencias.⁴¹ En este sentido es urgente la búsqueda de nuevos fármacos para mejorar el manejo de infecciones bacterianas. Por ello es importante encontrar nuevos compuestos con actividad antibacteriana.⁴²

2.3 El grupo de *Bacillus cereus*

Bacillus sp como se ha comentado es uno de los géneros más estudiados y utilizados en distintos sectores de la población. Es un género de bacterias Gram-positivas, formadoras de esporas, tienen un crecimiento óptimo a 29 °C, son aerobias, tienen forma bacilar redondeada.⁴³ Se encuentra ampliamente distribuida en diversos ambientes. La morfología colonial y el tamaño varían entre especies. Las bacterias vistas a microscopía pueden aparecer individualmente, en parejas o en cadenas (a veces de gran tamaño). Las morfologías coloniales varían dependiendo el medio de cultivo, sin embargo, las colonias de *Bacillus* en un medio de rutina no son difíciles de identificar, ya que suelen ser grandes, con

formas y bordes irregulares, de color crema y aspecto ceroso o brillante y algunas incluso muestran rizos en los bordes. Ciertas especies poseen la capacidad de ser biopesticidas, como es el caso de *B. thuringiensis*. Sin embargo, también alberga especies que pueden ser dañinas para la salud humana como es *B. cereus* o mortales como *B. anthracis*. Por esta razón una buena clasificación de estas especies ha sido una tarea ardua y larga, sobre todo por la similitud entre las diferentes especies y el descubrimiento de nuevas especies.⁴⁴

Durante años, la evolución y filogenia del grupo de *B. cereus* ha sido analizada y las primeras diferencias rápidamente surgieron entre las tres especies anteriormente mencionadas. Mientras que *B. thuringiensis* produce las proteínas insecticidas Cry, *B. anthracis* produce las toxinas que son tóxicas para el ser humano y *B. cereus* contiene componentes que contaminan los alimentos provocando problemas gastrointestinales.^{45,46} Estas diferencias radican en los plásmidos que contienen. La morfología de estas tres especies *B. thuringiensis*, *B. cereus* y *B. anthracis* es muy parecida, con colonias de aspecto ceroso, color crema, redondas grandes y con bordes irregulares e incluso la caracterización bioquímica de los tres es muy similar por lo que no sirve como herramienta para identificarlas.

Sin embargo, en la actualidad el grupo de *Bacillus cereus* está conformado por ocho especies bien caracterizadas y establecidas como son, *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. cytotoxicus*, y *B. toyonensis*.¹¹ (Figura 5). Para la diferenciación de los miembros del grupo *B. cereus* se ha utilizado la detección de genes específicos de cada especie; pero dada su estrecha relación filogenética, su ADN genómico es altamente similar y la mayoría de los genes codificantes para factores de virulencia son comunes. Esta subdivisión se hace en base a las secuencias genéticas que incluso han podido establecer que *B. weihenstephanensis* y *B. mycoides* son la misma especie.^{47,48} A continuación se describirán cada una de estas especies.

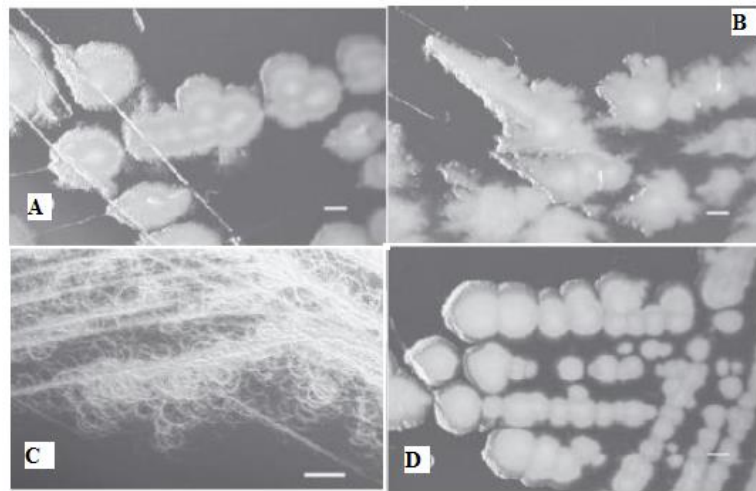


Figura 5. A) *B. anthracis*: colonias circulares a irregulares con bordes ondulados y crenados y textura de superficie granulosa; B) *B. cereus*: bordes irregulares, ondulados y crenados y textura granulosa; C) *B. mycooides*: colonias rizoides o de aspecto peludas las cuales pueden cubrir todo el agar; D) *B. thuringiensis*: colonias circulares o irregulares con bordes enteros u ondulados y textura granulosa;

2.3.1 *B. mycooides*.

Este tipo de *Bacillus* se puede aislar de varias fuentes como son los suelos y son fácilmente reconocibles por su morfología colonial de aspecto rizoide y observable a simple vista en una placa Petri. Salvo esa peculiaridad se parece al resto de especies del grupo de *B. cereus* con colonias de color crema y opacas.^{44, 49}

2.3.2 *Bacillus weihenstephanensis*.

B. weihenstephanensis, fue aislada por primera vez en el sur de Alemania, a finales de los años noventa. Se trata de una bacteria psicrotolerante, es decir puede crecer a bajas temperaturas como 7 °C pero no puede crecer a 43 °C. Realizando estudios taxonómicos, genotípicos y fenotípicos se ha podido incluir dentro del grupo de *B. cereus* y muy cercano a *B. mycooides*, la cual es de morfología rizoide tal y como ya se mencionó, a diferencia de esta especie que tiene una morfología colonial cerosa y bastante más similar a las demás especies del grupo. Incluso hay estudios genéticos que han podido establecer que *B. weihenstephanensis* y *B. mycooides* son la misma especie.^{47,50-52}

2.3.3 *Bacillus thuringiensis*.

B. thuringiensis es una bacteria entomopatógena y la bacteria más usada en el mundo como un biopesticida natural. *B. thuringiensis*, produce las proteínas llamadas delta-

endotoxinas, que son activas contra larvas de insectos y que pueden ser observadas bajo el microscopio de contraste de fases junto con la espora, por lo que *B. thuringiensis* se puede distinguir con la microscopía de contraste de fases del resto de especies del mismo grupo. En algunos estudios se ha sugerido que *B. cereus*, *B. thuringiensis* y *B. anthracis* pertenecen a la misma especie. Sin embargo, los dos plásmidos que codifican las toxinas de *B. anthracis* no se encuentran de forma natural ni en *B. thuringiensis* ni en *B. cereus*, y tampoco se han encontrado de forma natural en *B. anthracis* cuerpos parasporales que contengan proteínas similares a las de *B. thuringiensis*, las Delta endotoxinas Cry. Por lo tanto, esto apoya el hecho de mantener *B. anthracis* como una especie diferente de *B. cereus* y *B. thuringiensis*.⁵³

2.3.4 *Bacillus anthracis*

La mayoría de las especies de *Bacillus* tienen poca patogenicidad y muy pocas veces se asocian con enfermedades en humanos o en otros animales. Una excepción es *B. anthracis* que es el bacilo causante de la mortal enfermedad del ántrax o carbunco. El ántrax es una enfermedad bacteriana que ataca la piel. Su reservorio está constituido por los animales enfermos o muertos (herbívoros domésticos y salvajes) y sus subproductos (cuero, lana, cerda, harina de hueso) de igual manera el medio ambiente contaminado (suelo). Las aves de rapiña que se alimentan de carroña infectada pueden diseminar el microorganismo de una zona a otra. Si por algún motivo un ser humano es infectado por esta enfermedad y no se le da la atención adecuada y fallece, podría convertirse en un reservorio de dicha enfermedad. La enfermedad en su forma zoonótica es endémica, con incidencia variable, en las zonas agrícolas y ganaderas en los países en desarrollo. Entre veinte y treinta casos por año son notificados en Argentina. La infección ocurre cuando las endosporas entran al cuerpo desde el ambiente, ya que la espora es la forma primaria de infección.⁴⁴ La infección de la piel se produce por contacto con tejidos animales (bovinos, ovejas, cabras, caballos, cerdos y otros más) que han muerto de la enfermedad, y tal vez por insectos picadores que se han alimentado parcialmente de dichos animales; por pelo, lana o cueros contaminados o por productos hechos con ellos como tambores, cepillos, etcétera; por tierra contaminada por animales infectados o harina de hueso contaminada que se usa como abono en horticultura y jardinería.⁴⁴

La resistencia de las esporas al calor, radiación, desinfectantes o desecación, convierte a estas especies en un problema en las salas de operaciones o en el diseño de productos farmacéuticos. *B. anthracis* por su parte tiene dos megaplásmidos que codifican

las unidades proteicas que conforman la toxina del anthrax y la cápsula poli- γ -D-glutámica, respectivamente.

2.3.5 *Bacillus cereus*

B. cereus, es el siguiente patógeno de importancia clínica para humanos, causa enfermedad transmitida por alimentos contaminados e infecciones oportunistas. Respecto a la enfermedad transmitida por alimentos es un agente etiológico de dos síndromes de intoxicación alimenticia diferentes: a) de tipo diarrea, caracterizada por dolor abdominal con diarrea entre 8 y 16 horas después de la ingestión de alimentos contaminados b) de tipo emético caracterizado por náuseas y vómitos entre 1 y 5 horas después de haber ingerido alimentos contaminados.^{44,54} Las esporas de *B. cereus* pueden sobrevivir a procedimientos de cocción normales y bajo condiciones de almacenamiento inadecuadas las esporas pueden germinar y las células vegetativas pueden multiplicarse. En los casos diarreicos las toxinas responsables se producen por el microorganismo en el intestino delgado mientras que las toxinas eméticas se ingieren en los alimentos. *B. cereus* por su parte en la mayoría de las cepas no tiene presencia de plásmidos sólo algunas cepas de *B. cereus* contiene, los genes para sintetizar la toxina emética mientras que en otras especies esta toxina se produce cromosomalmente. Esta toxina es la responsable de causar vómito cuando hay una intoxicación alimenticia por esta bacteria. Además, puede causar insuficiencia hepática debido a que interfiere en la fosforilación oxidativa llevada a cabo por las mitocondrias de los hepatocitos. Se ha sugerido que existe una baja probabilidad de que la toxina emética se produzca en alimentos refrigerados, debido a que las cepas productoras crecen a temperaturas superiores a 15 °C, por tanto, se asume que los alimentos refrigerados estarían libres de la toxina mientras se conserve la cadena de frío.⁴⁶

2.3.6 *Bacillus pseudomycooides*

Esta especie fenotípicamente es muy similar a *B. cereus* e indistinguible de *B. mycooides* ya que presenta un aspecto de colonia rizoide. Sólo se puede distinguir respecto a las demás realizando un estudio de sus secuencias genéticas.^{44,55} Se realizó un análisis filogenético para determinar que *B. pseudomycooides* no era igual a *B. mycooides* a pesar de ser indistinguibles por morfología colonial.⁵⁵

2.3.7 *Bacillus cytotoxicus*

B. cytotoxicus, es la especie más divergente del grupo, los genomas del resto de especies de este grupo son altamente conservados. *B. cytotoxicus* es termotolerante ya que puede crecer a temperaturas por arriba de los 52 °C y produce la citotoxina K-1, que causa diarreas muy fuertes y se encuentra relacionado a intoxicación alimenticia.⁵⁶

2.3.8 *Bacillus toyonensis*.

Esta cepa fue inicialmente identificada como *B. cereus* var *toyoi* y usada por más de 30 años como ingrediente activo de la preparación Toyocerin® que es un aditivo utilizado para la nutrición animal. Sin embargo, un estudio taxonómico propuso que fuera una nueva cepa llamada *B. toyonensis*.^{57, 58}

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

En nuestro laboratorio de Biotecnología microbiana se tienen cepas de seis especies del grupo de *B. cereus*, identificadas en estudios previos mediante análisis de la secuencia 16S rRNA, como son *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. pseudomycooides* y *B. toyonensis*. Se pretende realizar un estudio del perfil químico de cada especie analizando que productos naturales se encuentran en cada especie. Teniendo ese perfil químico se podría diferenciar entre una cepa y otra, sin necesidad de realizar estudios genéticos.

En este proyecto, se pretende extraer, purificar e identificar productos naturales de varias especies del grupo de *Bacillus cereus* como son: *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis* y *B. toyonensis* que mostraron tener un gran poder inhibitorio y de amplio espectro contra varias bacterias y hongos. Se estudiarán los compuestos obtenidos para tratar de relacionar la producción de alguno con alguna especie.

3.2 Objetivos particulares

1. Tener extracto crudo de las cepas de *B. cereus* y *B. weihenstephanensis*, mediante extracción con la matriz adsorbente de Amberlita XAD-16.
2. De cada extracto crudo realizar una separación cromatográfica en columnas de gel de sílice con diferentes sistemas como eluentes para asegurar una buena separación (fraccionamiento inicial).
3. Purificar cada fracción para obtener él o los compuestos mayoritarios de cada una.
4. De cada compuesto puro obtenido se realizará la caracterización por medio de diferentes técnicas espectroscópicas (RMN, IR, Espectrometría de Masas, etc).
5. Llevar a cabo las pruebas de actividad biológica; antibiogramas con bacterias.
6. Comparar los compuestos de las diferentes especies para poder conocer variaciones que diferencien a dichas especies.

4. PARTE EXPERIMENTAL

Para llevar a cabo el presente proyecto se siguió el siguiente esquema (Figura 6).

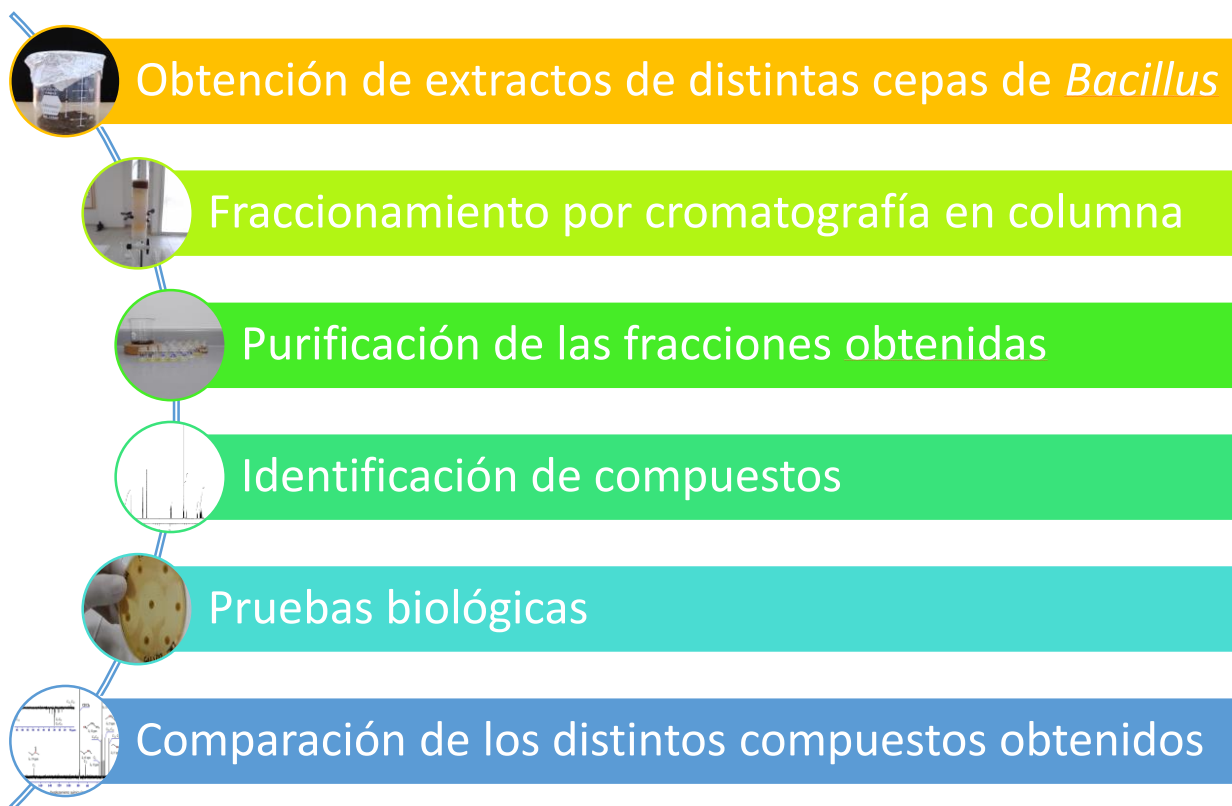


Figura 6. Esquema de trabajo para la obtención y análisis de metabolitos producidos por *Bacillus Spp*

4.1 Obtención de extractos crudos

Las cepas se crecen primeramente en una placa de medio sólido Luria Bertani (LB), durante 24 horas. Posteriormente se procede a inocularla en el caldo de cultivo LB 5.4 litros y se realizan por triplicado la extracción en condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar y mechero Bunsen). Una vez inoculado el caldo de cultivo, se adiciona la Amberlita XAD-16 en cada uno de los matraces, (500 mg por cada 100 mL de medio de cultivo) posteriormente se deben incubar los matraces a 29 °C y con una agitación orbital de 175 rpm durante 7 días.

Pasado el tiempo de incubación se procede a decantar el medio de cultivo, con el propósito de dejar en el fondo del matraz la amberlita, la cual ha adsorbido los metabolitos presentes

en el medio de cultivo. A cada uno de los matraces se le adicionará 100 mL de metanol y se somete a agitación de 175 rpm durante treinta minutos para dar paso al proceso de desorción de los metabolitos. Concluido el tiempo de agitación el metanol se vierte en tubos falcon de 50 mL para poder centrifugar a 5500 rpm durante 5 min, posteriormente mediante decantación se recupera el disolvente en un matraz de bola.

Colectado el metanol se evapora en un rotavapor a 58 °C con presión reducida. El extracto crudo se colecta en un vaso de precipitados y se deja secar por siete días para conocer su rendimiento final. Concluido el tiempo de secado, se toma 3.5 gramos de extracto y se somete a separación por cromatografía en columna. Para la fase estacionaria se utiliza gel de sílice y como fase móvil, mezclas de diferentes disolventes orgánicos.

[4.2 Purificación de los extractos crudos mediante cromatografía en columna](#)

Este extracto crudo se aplica a una columna cromatográfica usando gel de sílice como fase estacionaria y como fases móviles diferentes disolventes (eluyentes) de diferente polaridad tales como: Hexano, acetato de etilo, diclorometano y metanol. Las fracciones serán analizadas por varios procesos cromatográficos para su purificación.

[4.3 Caracterización de los compuestos](#)

Para la caracterización de los compuestos por medio de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se utilizó un espectrofotómetro Bruker Mod. Ascend™ a 500 MHz, para ^1H y 125 MHz para ^{13}C , los desplazamientos químicos están dados en partes por millón (ppm). Para el análisis de las muestras se hizo uso de Cloroformo Deuterado (CDCl_3) como disolvente y como referencia interna Tetrametilsilano (TMS).

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Barnstead Electrothermal 9100 en capilares abiertos. Los espectros de masas se realizaron en el modo espectrometría de masas por impacto electrónico (EMIE) y espectrometría de masas de alta resolución (EMAR) en el espectrómetro de masas Jeol JMS-700.

[4.4 Electroforesis en gel SDS-PAGE](#)

Para el caso de compuestos de origen peptídico, como es el caso de las bacteriocinas, se utilizó la técnica de Electroforesis SDS PAGE.

Para la electroforesis se requiere en primera instancia de un gel que se encuentra constituido por dos partes:

- Gel concentrador: gel de poliacrilamida, el cual se preparó con una solución tampón de Tris/HCl con un pH de 6.8, dos unidades de pH menor que el tampón de electroforesis (Tris/glicina).
- Gel separador: es un gel de poliacrilamida que se preparó utilizando un tampón Tris/HCl con un pH de 8.8. En el gel de resolución es donde las macromoléculas se separan de acuerdo con su tamaño.

Para el gel se utilizaron los siguientes reactivos:

- o Persulfato amónico (PSA).
- o Glicina, o ácido aminoacético.
- o Tris, nombre abreviado del tris (hidroximetil) aminometano.
- o Bisacrilamida, o *N,N'*-metilenbisacrilamida.
- o TEMED, acrónimo de *N,N,N',N'*-tetrametiletlenodiamina.
- o Dodecilsulfato sódico (SDS).

A continuación, se describen las cantidades utilizadas de cada uno de los reactivos.

	Gel concentrador 4%	Gel separador 12%
➤ 30% bis acrilamida	1.98 mL	6 mL
➤ 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	3.78 mL	---
➤ 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	---	3.75 mL
➤ 10% SDS	150 µl	150 µl
➤ H ₂ O	9 mL	5 mL
➤ TEMED	15 µl	7.5 µl
➤ 10% PSA	75 µl	75 µl
Volumen total	15 mL	15 mL

Con el gel preparado se colocaron 7-12 µl de la muestra previamente disuelta en el gel de carga. Después de ello se colocó dentro del recipiente, lo que permitirá el paso continuo de la corriente eléctrica. El equipo espectrofotométrico se encendió a 80 V y cuando la muestra paso al gel concentrador se cambió el voltaje a 120 V. Terminado el tiempo de corrimiento del gel, este se tiñó con azul de Coomassie.

4.5 Pruebas biológicas en bacterias

Para evaluar el efecto bactericida que presentan los metabolitos extraídos se preparan cultivos con una suspensión de las bacterias que se tienen que probar con los extractos de *Bacillus* que son *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Shigella* sp, *Salmonella cholerasuis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus* con 3 mL de caldo LB, incubándolos a 29 °C con agitación constante a 200 revoluciones por minuto (rpm) durante 24 h, para alcanzar una densidad celular aproximada de 1×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro. De los cultivos en suspensión se siembran en cajas Petri de 100 x 15 mm. Por otro lado, con los extractos de cada cepa de *Bacillus* se impregnan discos de papel filtro, con el compuesto a evaluar, estos discos previamente son esterilizados. Por otro lado, las soluciones preparadas con los extractos de cada cepa de *Bacillus* se mojan discos de papel filtro estéril. Las placas se incuban a 29°C durante 24 horas. En los días siguientes a la inoculación, se observa cada una de las placas y si ya hay crecimiento de la bacteria, se registra el diámetro de los halos de inhibición alrededor de los discos.

5. RESULTADOS

5.1 Compuestos naturales obtenidos en tres especies de *Bacillus* del grupo *B. cereus*

Tal y como ya se describió en los antecedentes la discriminación entre especies del grupo de *B. cereus* es un reto debido a que sus secuencias genómicas comparten más del 99% de similitud.⁵⁹ Por lo tanto, esta similitud aunada a una morfología similar provoca que se realice una clasificación incorrecta de las especies. Se ha tratado de mejorar la identificación a nivel especies utilizando diferentes marcadores genéticos, pero a pesar de ello se siguen dando inconsistencias.^{60,61}

En los antecedentes ya se resaltó la importancia del género *Bacillus* para secretar diferentes compuestos químicos.^{62,63} Nuestro grupo de investigación ha trabajado aislando estos compuestos desde hace años.^{30,64} El perfil químico puede ser muy específico para cada especie determinando que especie se relaciona con cada perfil químico. Este análisis químico puede ser complementario y útil junto con los estudios moleculares para clasificar taxonómicamente a las especies de *Bacillus*.

En nuestro laboratorio se tienen cepas de cinco especies del grupo de *B. cereus*, identificadas en estudios previos mediante análisis de la secuencia 16S rRNA, como son *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis* y *B. toyonensis*.

En nuestro grupo de trabajo previamente se habían obtenido compuestos naturales de tres especies que pertenecen al grupo de *B. cereus* como son, *B. thuringiensis*, *B. mycoides* y *B. toyonensis*, que se pueden observar en la Tabla 2.

Tabla 2. Compuestos encontrados en *B.mycoides*, *B. toyonensis* y *B.thuringiensis*

<i>Bacillus mycoides</i>	<i>Bacillus toyonensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
GRASA	GRASA	GRASA
Ftalato de 2 bis- <i>R</i> -(2- etilhexilo)	-----	Ftalato de 2 bis- <i>R</i> -(2- etilhexilo)
1-Palmitilglicerol	<i>R</i> -2,3 Dihidroxil estereato	Melanina
Ácido antranílico	<i>N</i> -acetiltriptamina	<i>N</i> -acetil triptamina Fenilacetamida Triptamina Fenilamina
L-Pro-L-Leu L-Pro-L-Phe L-Pro L-Tyr	L-Pro-L-Leu L-Pro-L-Phe L-Pro-L-Tyr L-Pro L-Val	L-Pro L-Leu L-Pro-L-Phe L-Pro-L-Tyr L-Pro-L-Val

Lipopéptidos	Lipopéptidos	Lipopéptidos
Bacteriocina 3.39 kDa	Bacteriocina 3.83 kDa	Bacteriocina 2.6 kDa
Bacteriocina 2.91 kDa	Bacteriocina 3.89 kDa	Bacteriocina 4.1 kDa

Destacan algunos compuestos que son bastante constantes y aparecen en prácticamente todas las especies como son las dicetopiperazinas, que ya han sido reportadas por el grupo de investigación.²⁷ El compuesto Ftalato de 2 bis-*R*-(2-etilhexilo) también es un compuesto que se encuentra bastante distribuido entre las especies de *Bacillus* y que ya fue reportado por este grupo de investigación.²⁸ Los lipopéptidos también aparecen en todas las cepas siendo las surfactinas, iturinas y fengicinas las familias de lipopéptidos características del género *Bacillus*, tal y como se reportó previamente.^{34,62} Las bacteriocinas son péptidos que se encuentran en todas las especies de *Bacillus* y que varían en peso y actividades bactericidas. Se puede observar que hay otros compuestos que aparecen en algunas especies, pero no en otras. Por ejemplo, los compuestos indólicos que no se encuentran en todas las especies sólo en algunas como es *B. thuringiensis*³⁰ o los monoacilgliceroles que se encuentran en *B. mycooides* y *B. toyonensis* pero no en *B. thuringiensis*.

Esto da una idea de que hay compuestos muy generales que se pueden encontrar en diferentes especies, pero hay compuestos más específicos de una especie en concreto, por lo tanto, el perfil químico de cada especie puede dar una idea de que especie se trata sin necesidad de realizar estudios genéticos. Para poder realizar un estudio comparativo más completo, en esta tesis se trabajaron dos especies del mismo grupo de *B. cereus* como son *B. weihenstephanensis* y *B. cereus* que es la especie que le da el nombre al grupo.

5.2 Compuestos naturales obtenidos de *B. weihenstephanensis*

Se comenzó trabajando la cepa ELI224 la cual había sido aislada de un suelo de la ciudad de Puebla y que posteriormente, en trabajos anteriores en el laboratorio fue identificada genéticamente como *B. weihenstephanensis*. Esta cepa había mostrado un alto poder de inhibición contra varias bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas y también contra varios hongos. Esto dio pauta a pensar que esta cepa secretaba metabolitos con diversas actividades biológicas.



Figura 7. Cepa de *B. weihenstephanensis* en agar Luria Bertani.

Como se puede observar en la imagen, las colonias de *B. weihenstephanensis* son grandes, cerosas, color crema y de bordes irregulares. Es una morfología clásica de las especies del grupo de *B. cereus*.

Para la extracción de los metabolitos secundarios se utilizó una resina conocida como Amberlita XAD-16®. Se obtuvieron 17.6 gramos de extracto con un rendimiento de 0.920 miligramos (mg) por litro de extracto, de un total de 16.2 litros.

Se realizó un fraccionamiento general con 5 gramos, del extracto obtenido), mediante cromatografía en columna utilizando gel de sílice (70-230 mesh) como fase estacionaria y como fase móvil diferentes disolventes como hexano, acetato de etilo y metanol. Se obtuvieron 13 eluatos de 200 mL como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Fracciones obtenidas del fraccionamiento del extracto crudo

Eluyentes	Proporción %	fracción
Hexano	100	1
Hexano: AcOEt	75:25	2
Hexano: AcOEt	50:50	3
Hexano: AcOEt	25:75	4
AcOEt	100	5
AcOEt: MeOH	90:10	6
AcOEt: MeOH	80:20	7
AcOEt: MeOH	70:30	8
AcOEt: MeOH	60:40	9
AcOEt: MeOH	50:50	10
AcOEt: MeOH	70:30	11
AcOEt: MeOH	20:80	12
MeOH	100	13

Se realizó un seguimiento cromatográfico en capa fina para las fracciones, utilizando como revelador luz UV de onda corta (254 nm) y onda larga (365 nm) para observar las fracciones de cuantos compuestos se componían.

5.3 Purificación de los compuestos naturales obtenidos de *B. weihenstephanensis*

A modo de resumen se presenta en la Tabla 4 los compuestos que se identificaron en esta cepa de *B. weihenstephanensis* en las fracciones obtenidas.

Tabla 4. Compuestos encontrados en *B. weihenstephanensis*

Fracciones	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>
1	GRASA
2	Ftalato de 2 bis- <i>R</i> -(2-etilhexilo)
3	-----
4	-----
5	Macrolactina a 1-Palmitilglicerol
6	L-Pro-L-Leu
7	7- <i>O</i> -succinil macrolactina a L-Pro-L-Val L-Pro-L-Phe
8	Lipopéptidos
9	Lipopéptidos
10	Lipopéptidos
11	Bacteriocina 3.71 kDa
12	Bacteriocina 3.71 kDa
13	Bacteriocina 3.71 kDa

Se puede observar que en esta cepa se aislaron varios compuestos que ya se habían aislado anteriormente en *B. mycoides*, *B. toyonensis* y *B. thuringiensis*. Uno de ellos es el compuesto Ftalato de 2 bis-*R*-(2-etilhexilo), muy común en general en *Bacillus*. Se puede resaltar que las dicetopiperazinas son compuestos muy comunes, sin embargo, las encontradas en *B. weihenstephanensis* son exactamente las mismas que las encontradas en *B. thuringiensis*, que son L-Pro-L-Val, L-Pro-L-Phe y L-Pro-L-Leu. También se encuentran los lipopéptidos y las bacteriocinas que son de origen peptídico y cuya biosíntesis se encuentra

codificada en genes alojados en el cromosoma de la mayoría de *Bacillus* Sp También se pudo identificar el 1-Palmitilglicerol que se aisló en *B. mycoides*, pero en ninguna otra cepa.

Sin embargo, llama la atención que se pudieron aislar dos compuestos que no se habían obtenido anteriormente en ninguna cepa del grupo de *B. cereus* (Tablas 2 y 4). Se trata de la macrolactina a y del 7-*O*-succinil macrolactina a.

5.3.1 Fracción 5

La fracción 5 fue obtenida con sólo acetato de etilo al 100% y en ella se pudieron identificar dos compuestos.

El primero de ellos fue el compuesto macrolactina a. Este compuesto únicamente se encontró en la cepa de *B. weihenstephanensis*, ni siquiera en la cepa de *B. mycoides* con la cual comparte gran similitud a nivel genético.⁴⁸ Incluso en el trabajo de taxonomía basada en genética por Liu y colaboradores⁴⁷ se menciona que *B. mycoides* y *B. weihenstephanensis* se pueden considerar como cepas sinónimas. Como ya se había mencionado anteriormente la morfología colonial de ambas especies es muy diferente ya que en placa *B. mycoides* es rizoide y *B. weihenstephanensis* es cerosa más similar en aspecto a *B. cereus*. Con este estudio del análisis del perfil químico de las especies que conforman el grupo de *B. cereus* se demuestra que se deberían de tratar como dos especies diferentes.

Cabe destacar que este compuesto se había aislado previamente en el grupo de investigación de otra especie *B. amyloliquefaciens*, relacionada con el grupo de *B. subtilis*.

En el espectro de RMN de ¹H (Figura 8) se observaron unas señales ya conocidas, que corresponden a un compuesto de tipo policétido, denominado como macrolactina a. En 7.21 ppm se observa una señal doble de dobles ($J = 11.5, 12$ Hz) que integra para un hidrógeno que se asignó al H4. En 6.60 y 6.54 ppm se ven dos señales traslapadas, que integran para dos hidrógenos, una triple (t) y una doble de doble (dd) que corresponde a los hidrógenos H-9 y H-3 respectivamente. También se observa una señal múltiple entre 6.30 y 6.00 ppm, que integran para cuatro hidrógenos, que corresponden a los hidrógenos adyacentes a los dobles enlaces de los carbonos 18, 5, 10 y 17. En 5.79 ppm se observa un doble de dobles ($J = 5.5, 5.5$ Hz) que integra para un hidrógeno correspondiente al H8. En la región que comprende 5.65 a 5.61 ppm se observan señales traslapadas, que integran para tres hidrógenos, correspondientes a los protones H-2, H-19 y H-16 que son protones vinílicos. En 5.51 ppm se observa una señal cuádruple ($J = 9, 9$ Hz) que integra para un hidrógeno que corresponde con H11. En 5.05 se observa una señal múltiple que integra para

un hidrógeno que corresponde con H23. En 4.52 ppm y 4.36 ppm se observan dos señales que integran para un hidrógeno cada una, que corresponden con H15 y H7, respectivamente. En 3.98 ppm se ve una señal múltiple que integra para un hidrógeno que corresponde con H13. En la región de 2.48 a 2.40 se observa una señal múltiple que integra para cuatro hidrógenos que corresponde con H12a, H12b, y H6 (CH₂). En la región de 2.17 ppm a 1.55 ppm se observan varias señales múltiples, integrando para dos hidrógenos, correspondientes a los metilenos H20, H14, H21 y H22. Finalmente, en 1.28 ppm se ve una señal doble que integra para tres hidrógenos correspondiente al metilo de la molécula H24.

21 21

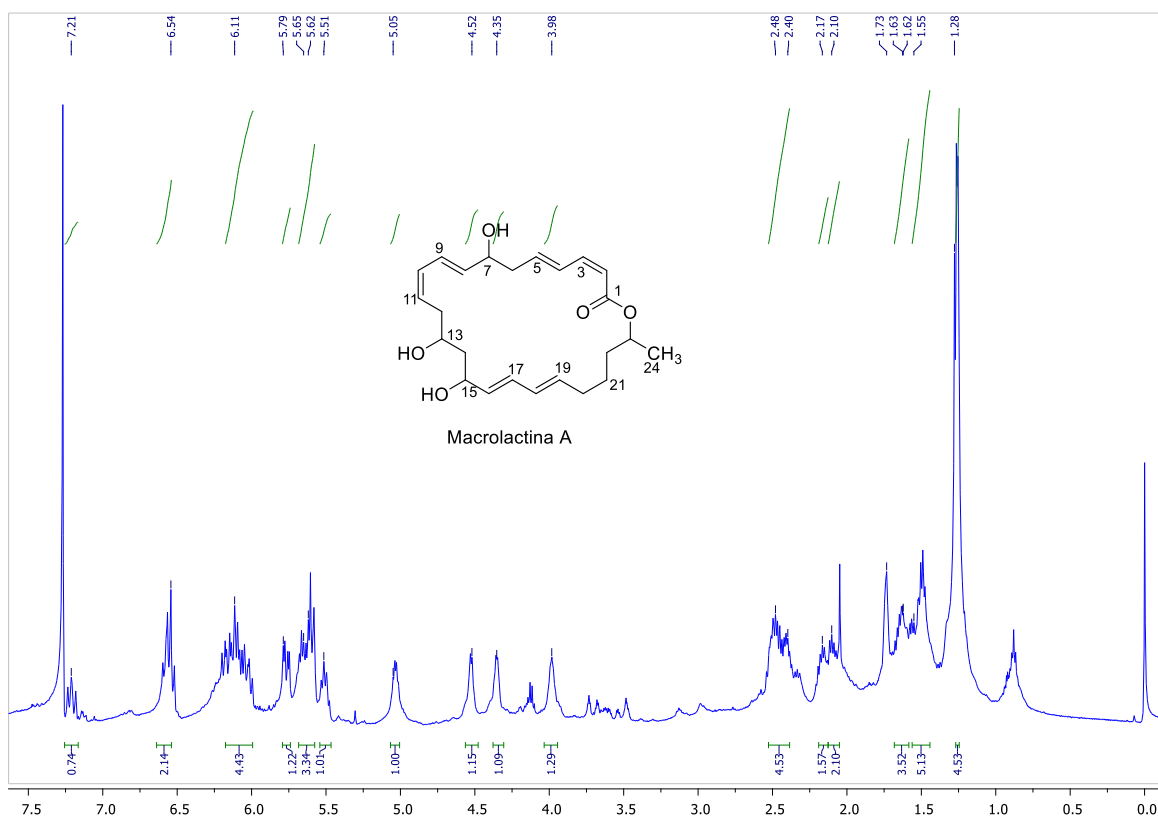


Figura 8. Espectro de RMN ¹H macrolactina a (CDCl₃ 500 MHz)

En el espectro de RMN de ¹³C (Figura 9) se observan 24 señales diferentes correspondientes a 24 átomos de carbono presentes en la molécula. Destaca que en 166 ppm se observa una señal indicando por la región que se trata de un carbonilo. Las señales entre 145 y 115 ppm indican carbonos de dobles enlaces. En la Tabla 5 se resumen las señales de ambos espectros de RMN.

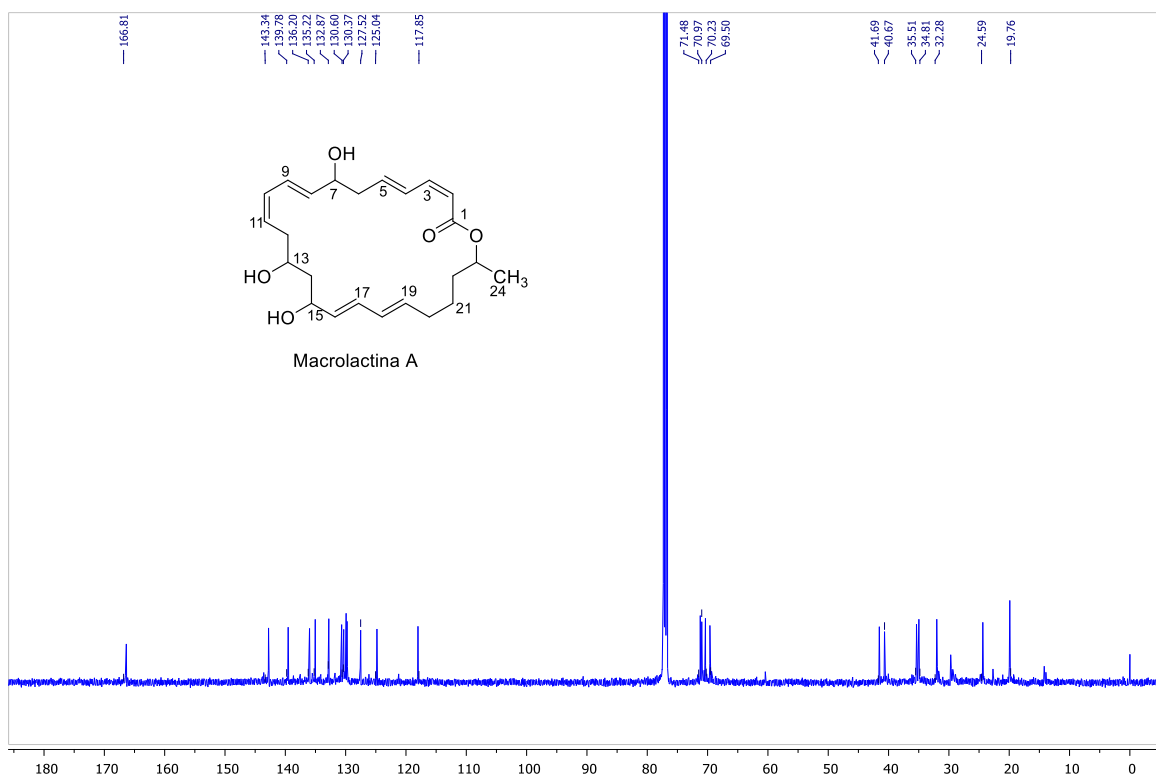


Figura 9. Espectro de RMN ^{13}C macrolactina a (CDCl_3 125 MHz).

Tabla 5. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C de la macrolactina a en CDCl_3

Macrolactina a		
carbon	δ_{H}	δ_{C}
1	-	166.5
2	5.60	118.2
3	6.54	142.9
4	7.23	129.9
5	6.11	139.7
6	2.48	41.7
7	4.36	71.4
8	5.78	136.1
9	6.60	124.9
10	6.14	130.5
11	5.51	127.7
12	2.50, 2.40	35.5
13	3.98	69.8
14	1.73	40.8
15	4.53	70.5
16	5.63	132.9
17	6.17	130.1
18	6.04	130.8
19	5.66	135.1
20	2.16	32.1
21	1.64, 1.55	35.1
22	1.56	24.5
23	5.03	71.1
24	1.27	20.0

En esta fracción 5 tal y como se mostró en la Tabla 4 se pudo identificar un segundo compuesto llamado 1-Palmitilglicerol, que fue purificado con hexano/ acetato de etilo 30/70 como un sólido blanco. Este compuesto se caracteriza por tener una larga cadena hidrocarbonada, unida a un grupo éster y dos grupos hidroxilo como sustituyentes.

En el espectro de RMN de ^1H (Figura 10) (500 MHz, CDCl_3), se observan dos dobles de dobles a 4.20 ppm y 4.16 ppm ($J = 4.5$ y 11.5 Hz; $J = 6.5$ y 11.5 Hz) correspondientes a dos hidrógenos diastereotópicos pertenecientes a un grupo metileno. En 3.93 ppm se observa un quintuple que integra para un hidrógeno correspondiente a un grupo metino ($J = 4.5$ Hz). En 3.69 ppm y 3.61 ppm se observan dos dobles de dobles ($J = 4.0$ y 11.5 Hz; $J = 5.5$ y 11.5 Hz) correspondientes a dos hidrógenos diastereotópicos pertenecientes a un grupo metileno. En 2.35 ppm se observa un triplete ($J = 7.5$ Hz) que integra para dos hidrógenos que corresponde a un metileno. En 1.63 ppm se observa un quintuple ($J = 4.5$ Hz) que integra para dos hidrógenos y corresponde con un metileno y en 1.25 ppm una señal múltiple que integra para varios hidrógenos y que corresponde con varios metilenos. En 0.88 ppm se observa una señal triple ($J = 7.0$ Hz) que corresponde con un metilo. Finalmente se observan dos señales anchas en 2.48 ppm y 2.03 ppm indicando la presencia de dos grupos hidroxilo.

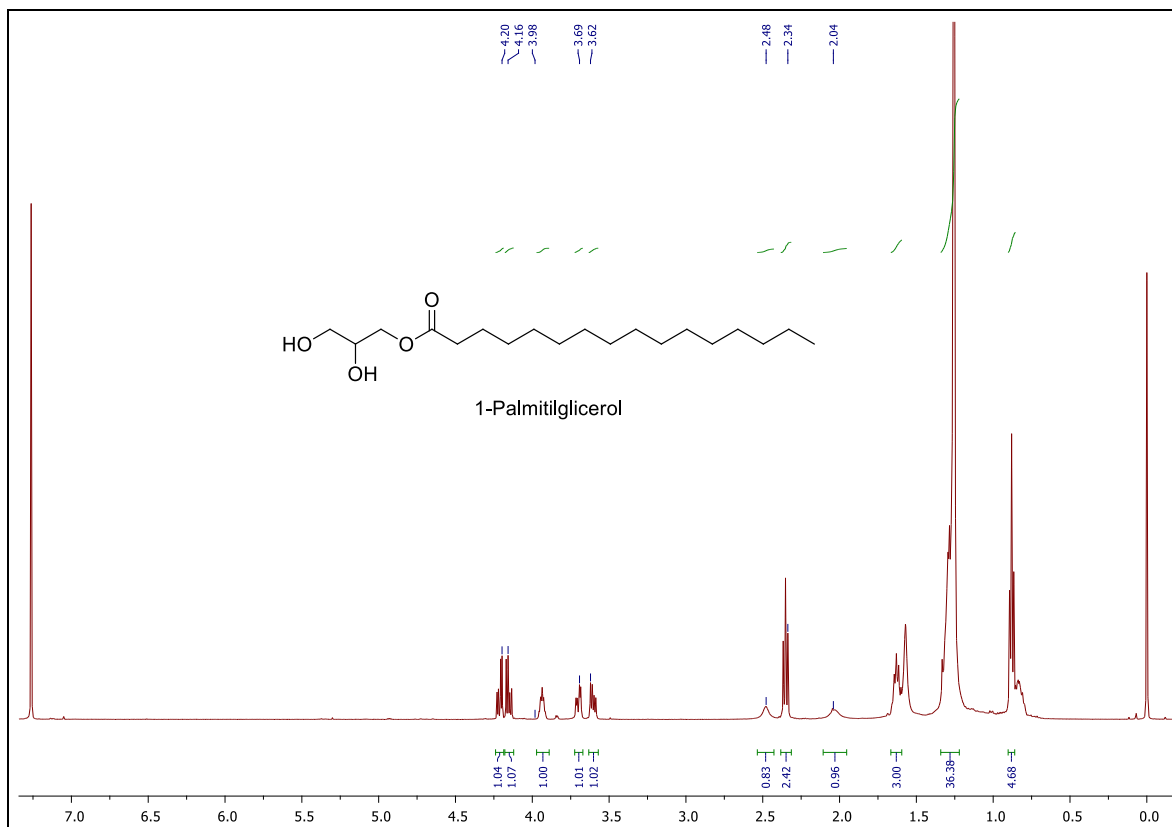


Figura 10. Espectro de RMN ^1H 1-Palmitilglicerol (CDCl_3 500 MHz)

En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 11) se observa en 174.5 ppm una señal correspondiente a un carbonilo de éster. También se observan varios metilenos, así como un metino y un metilo.

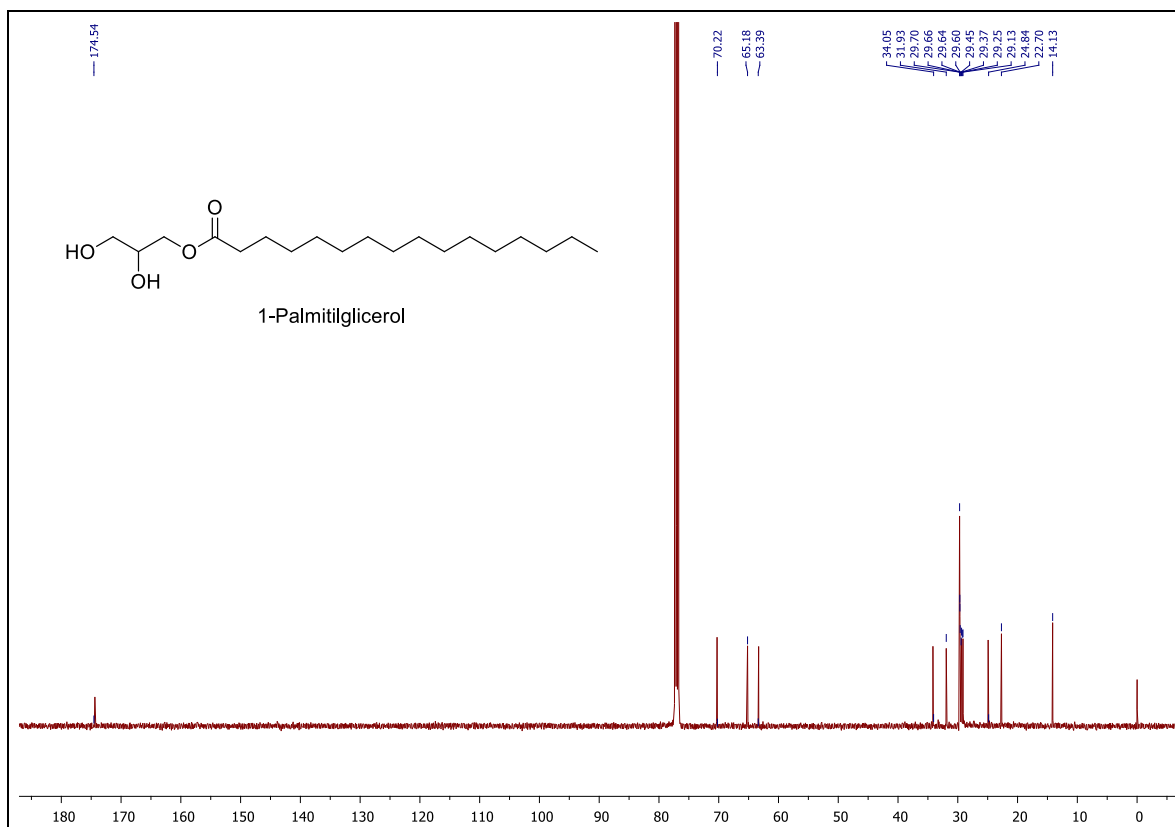


Figura 11. Espectro de RMN ^{13}C de 1-Palmitilglicerol (CDCl_3 , 125 MHz)

5.3.2 Fracción 6

La fracción 6 se obtuvo con una mezcla de acetato de etilo/metanol al 20% y se observó en la placa cromatográfica un compuesto mayoritario que absorbe en la luz UV a 254 nm mostrando una coloración azul intensa. Se procedió a analizar por RMN y dicho espectro fue comparado con los ya obtenidos en el grupo de investigación y se identificó como una dicetopiperazina L-Pro-Leu.

En el espectro de RMN de ^1H (Figura 12) se observa en 6.3 ppm una señal simple y ancha que integra para un hidrógeno que corresponde con el grupo amino. Se observa en 4.1 y 4.0 ppm dos señales, una es triple y la otra es un doble de dobles, ($J = 8.1$ Hz y $J = 9.5$ y 3.5 Hz), los cuales son hidrógenos de los 2 centros estereogénicos, integran para un hidrógeno cada señal y corresponden con el H6 y H9. En 3.5 ppm se observa una señal múltiple que integra para dos hidrógenos y que corresponde con H3. En 2.3 y 2.1 ppm se observan dos señales que integran para un hidrógeno cada una y que son los hidrógenos diastereotópicos H5a y H5b. De manera similar en 2.05 y 2.03 ppm se observan dos señales

que integran para un hidrógeno cada una y que corresponden con H10b y H4a. En 1.9 ppm se observa una señal séptuple que integra para un hidrógeno que corresponde con H11. En 1.8 ppm una señal que integra para un hidrógeno que corresponde con H4b. En 1.5 ppm se observa una señal que corresponde con H10a. Finalmente en 1 y 0.95 ppm se observan dos señales dobles que integran para tres hidrógenos cada una y que corresponden con los metilos H12 y H13.

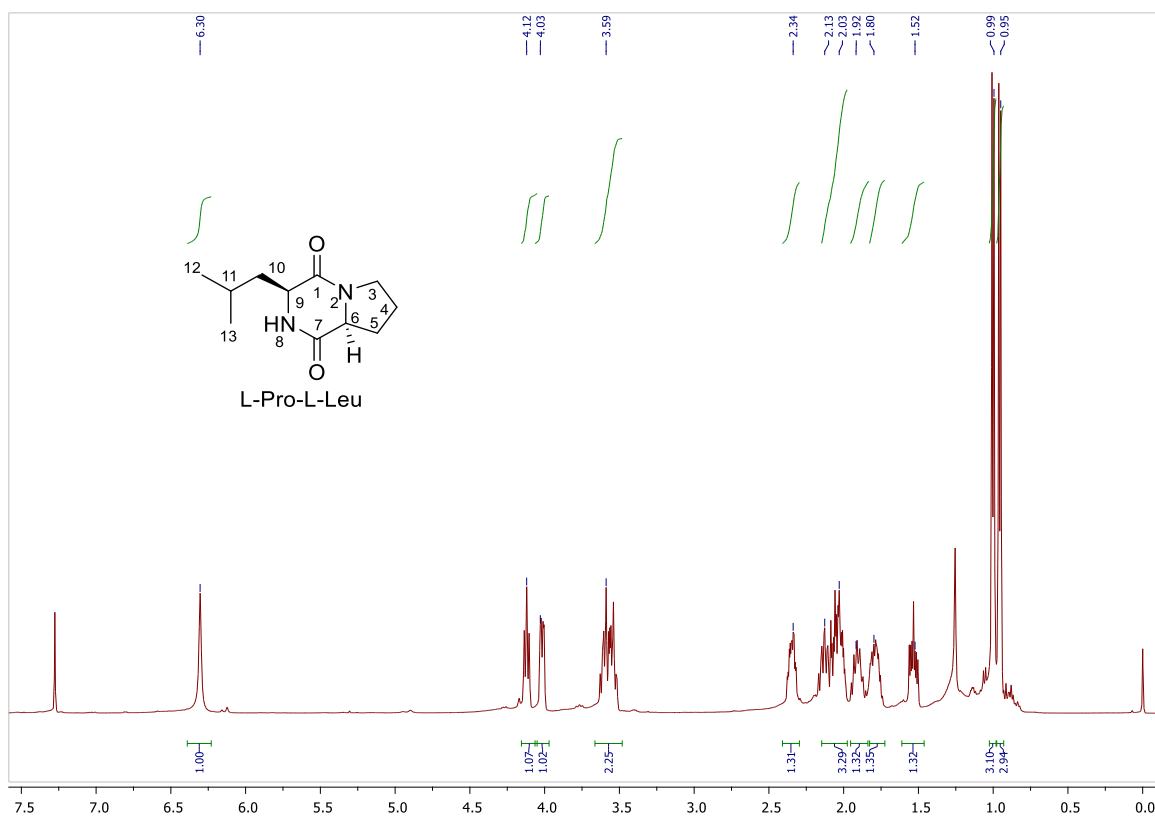


Figura 12. Espectro de RMN ^1H L-Pro-L-Leu (CDCl_3 500 MHz)

Respecto al espectro de RMN ^{13}C (Figura 13) se observa en 166 y 170 ppm dos señales que corresponden con los carbonilos de la molécula. En 59 y 53 ppm se observan los carbonos C6 y C9 y en 45 ppm el C3. El resto de señales coinciden con los carbonos que se encuentran en la molécula. En la tabla 6 se resumen las señales de ambos espectros de RMN.

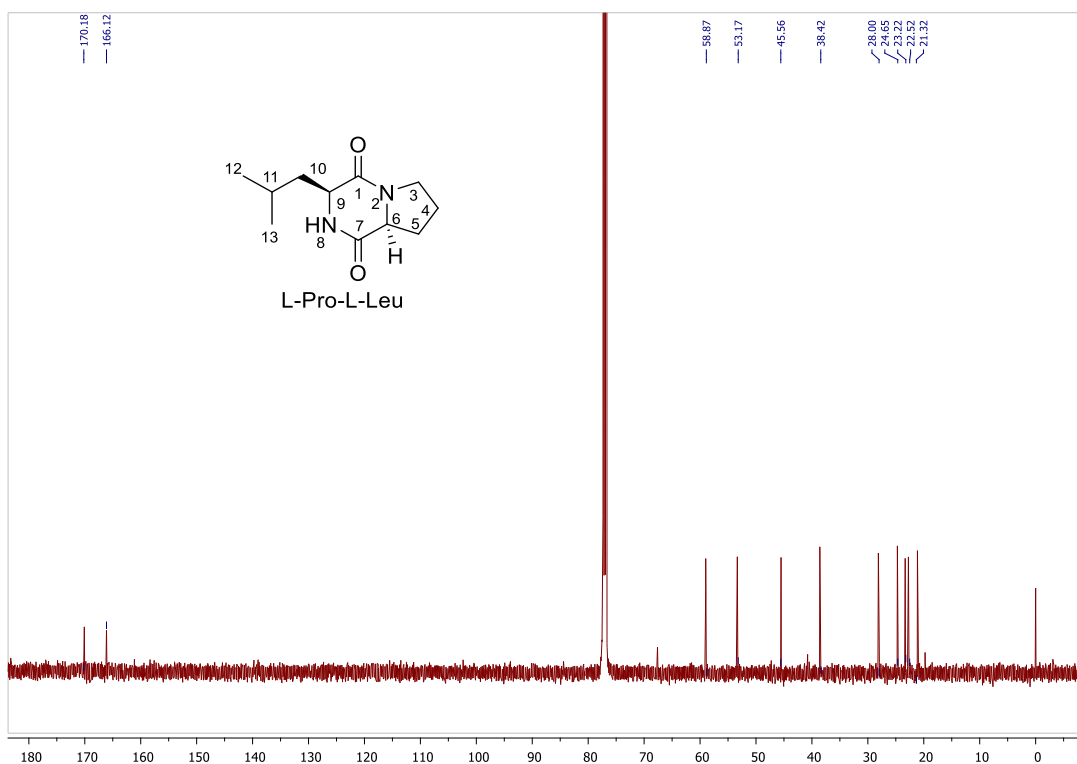


Figura 13. Espectro de RMN ^{13}C L-Pro-L-Leu (CDCl_3 , 125 MHz)

Tabla 6. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C de L-Pro-L-Leu en CDCl_3

RMN ^1H δ (ppm)	Grupo	J (Hz)	RMN ^{13}C δ (ppm)	Grupo
5.80	NH		170.1	C7
4.13	H6-Pro	8.1	166.1	C1
4.01	H9-Pro	9.5, 3.5	58.9	C6
3.54–3.61	H3-Pro		53.1	C9
2.35	H _a 5-Pro		45.5	C3
2.12	H _b 5-Pro		38.4	C10
2.07	H _b 10		28.0	C5
2.05	H _b 4-Pro		24.6	C11
1.91	H _a 4-Pro		23.2	C12
1.73	H11		22.5	C4
1.55	H _a 10		21.3	C13
1.0	3H12	6.6		
0.95	3H13	6.6		

5.3.3 Fracción 7

Ésta, se sometió a purificación en una columna cromatográfica de gel de sílice. Se obtuvieron tres compuestos diferentes en esta fracción después de su purificación. Primeramente, se obtuvo un compuesto que al ser analizado por RMN mostró señales muy parecidas al compuesto de macrolactina obtenido anteriormente, pero con algunas pequeñas diferencias. Por comparación con espectros anteriores de nuestro grupo de investigación se concluyó que era el compuesto 7-*O*-succinil macrolactina a.

En el espectro de RMN de ^1H (Figura 14) se observan las señales múltiples en 7.14, 6.63, 6.51, y 6.09-5.93 similar a las anteriormente analizadas en el espectro de la macrolactina a (figura 8). En la región 5.68-5.38 ppm se observa la primera diferencia en donde 5.55- 5.61 ppm integra para cuatro hidrógenos en lugar de tres que se veían en el espectro de la macrolactina a (Figura 8). Esto es debido a que corresponde con el H7 el cual en la macrolactina a se encontraba en 4.35 ppm y ahora está más desplazado por efecto de la proximidad de los dos átomos de oxígeno que tiene cerca. Las señales en 5.00, 4.58 y 4.11 ppm corresponden a los hidrógenos H23, H15 y H13. Sin embargo, una gran diferencia se observa en 2.75 y 2.68 ppm en donde se observan dos señales múltiples que corresponden a los H3' y H2' de la cadena succinilo. El resto de hidrógenos son prácticamente similares a los descritos en el espectro de la macrolactina a (Figura 8 y 14).

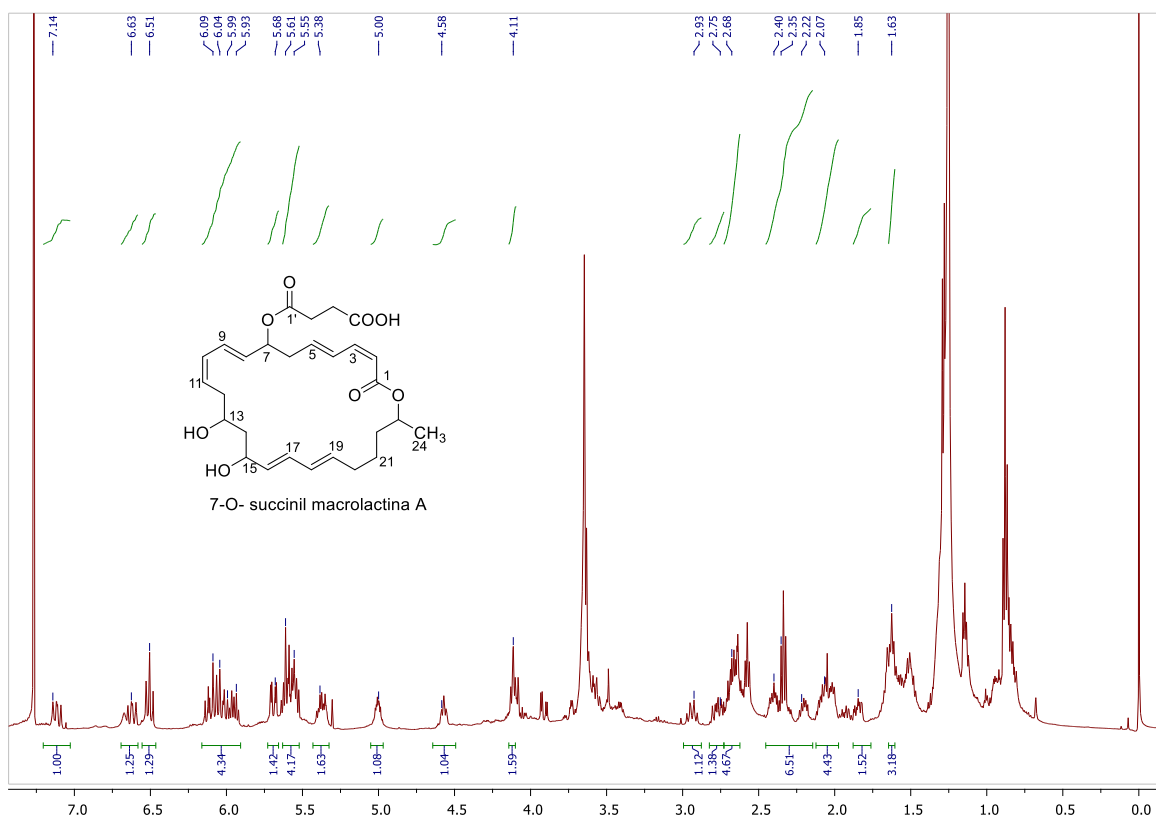


Figura 14. Espectro de RMN ^1H de 7-O-succinil macrolactina a (CDCl_3 500 MHz)

En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 15) se observan cuatro carbonos más que en el espectro de la macrolactina a (Figura 9). Dos de ellos aparecen en la zona de carbonilos marcando una gran diferencia en 175 y 171 ppm que corresponden con $\text{C}4'$ y $\text{C}1'$ respectivamente. El resto de señales prácticamente son iguales a las mostradas en la macrolactina a (Figuras 9 y 15). En la Tabla 7 se resumen las señales de ambos espectros de RMN.

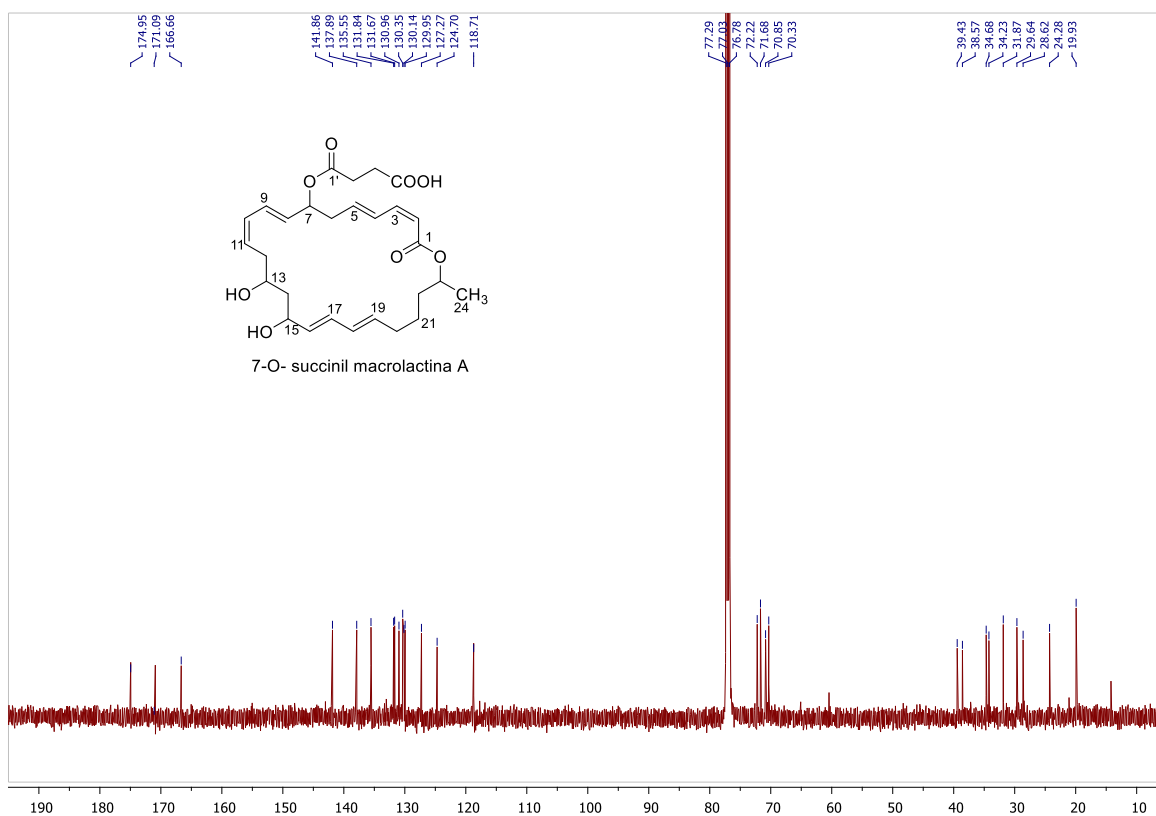


Figura 15. Espectro de RMN ^{13}C de 7-O-succinil macrolactina a (CDCl_3 , 125 MHz)

Tabla 7. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C de 7-O-succinil macrolactina a en CDCl_3

7-O-succinil macrolactina a		
carbon	δ_{H}	δ_{C}
1	-	166.7
2	5.61	118.7
3	6.51	141.9
4	7.14	130.1
5	5.93	138.0
6	2.68	39.4
7	5.60	72.2
8	5.68	131.0
9	6.63	124.7
10	6.00	130.3
11	5.38	127.3
12	2.93, 2.35	34.7
13	4.11	70.8
14	1.86	38.6
15	4.58	70.3
16	5.56	131.8
17	6.09	131.7
18	6.04	130.0
19	5.55	135.5
20	2.22, 2.07	31.9
21	1.63	24.3
22	1.83	34.2
23	5.00	71.7

24	1.29	20.0
1'	-	171.1
2'	2.68	28.6
3'	2.75	29.6
4'	-	175.0

Posteriormente, se obtuvieron dos compuestos de tipo dicetopiperazinas. La primera se obtuvo como un sólido blanco el cual se analizó por RMN y se determinó por comparación con los compuestos obtenidos previamente por el grupo de investigación que es una dicetopiperazina L-Pro-L-Val y se puede observar su espectro en la figura 16.

En el espectro de RMN de ^1H (Figura 16) se pueden observar señales muy similares a las observadas para el espectro de L-Pro-L-Leu. Se observa en 5.68 ppm el hidrógeno del grupo amino. En 4.1 y 3.9 ppm dos señales, una es triple y la otra es simple ancha, ($J = 8.0$ Hz y $J = 10$ y 4 Hz), los cuales son hidrógenos de los 2 centros estereogénicos, integran para un hidrógeno cada señal y corresponden con el H6 y H9. En 3.63-3.56 ppm se observan dos señales múltiples que integra para un hidrógeno cada una y que corresponde con H3. En 2.64 se observa una señal que integra para un hidrógeno y que corresponde con H10. En 2.38 ppm se observa una señal que integra para un hidrógeno y que corresponde con H5a. De manera similar en 2.05 ppm se observan una señal que integran para dos hidrógenos y que corresponden con H5b y H4a. En 1.9 ppm se observa una señal séptuple que integra para un hidrógeno que corresponde con H4b. Finalmente en 1.06 y 0.91 ppm se observan dos señales dobles que integran para tres hidrógenos cada una y que corresponden con los metilos H11 y H12. Se puede ver que están más separados los metilos que en el caso de L-Pro-L-Leu.

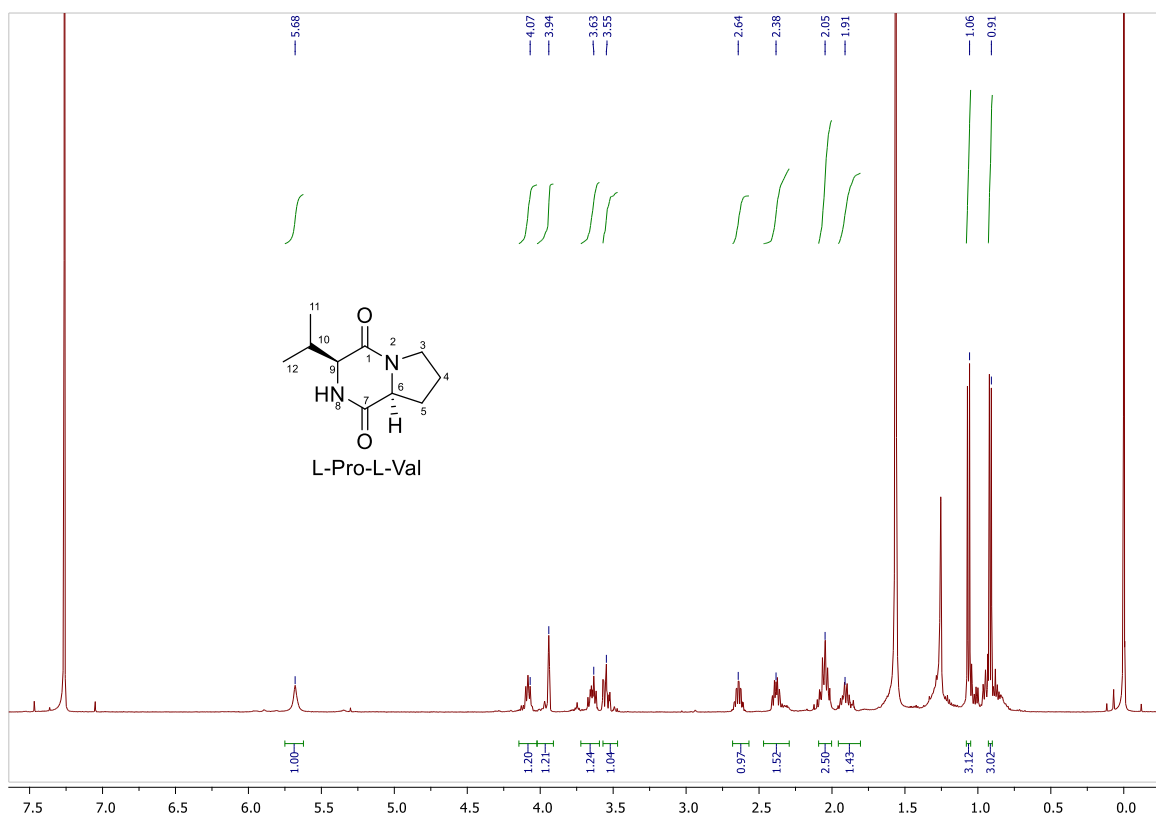


Figura 16. Espectro de RMN ^1H L-Pro-Val (CDCl_3 500 MHz)

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 17) del compuesto designado como L-Pro-Val se observan señales muy similares a las del compuesto L-Pro-L-Leu pero con un carbono menos. En la tabla 8 se resumen las señales de ambos espectros de RMN.

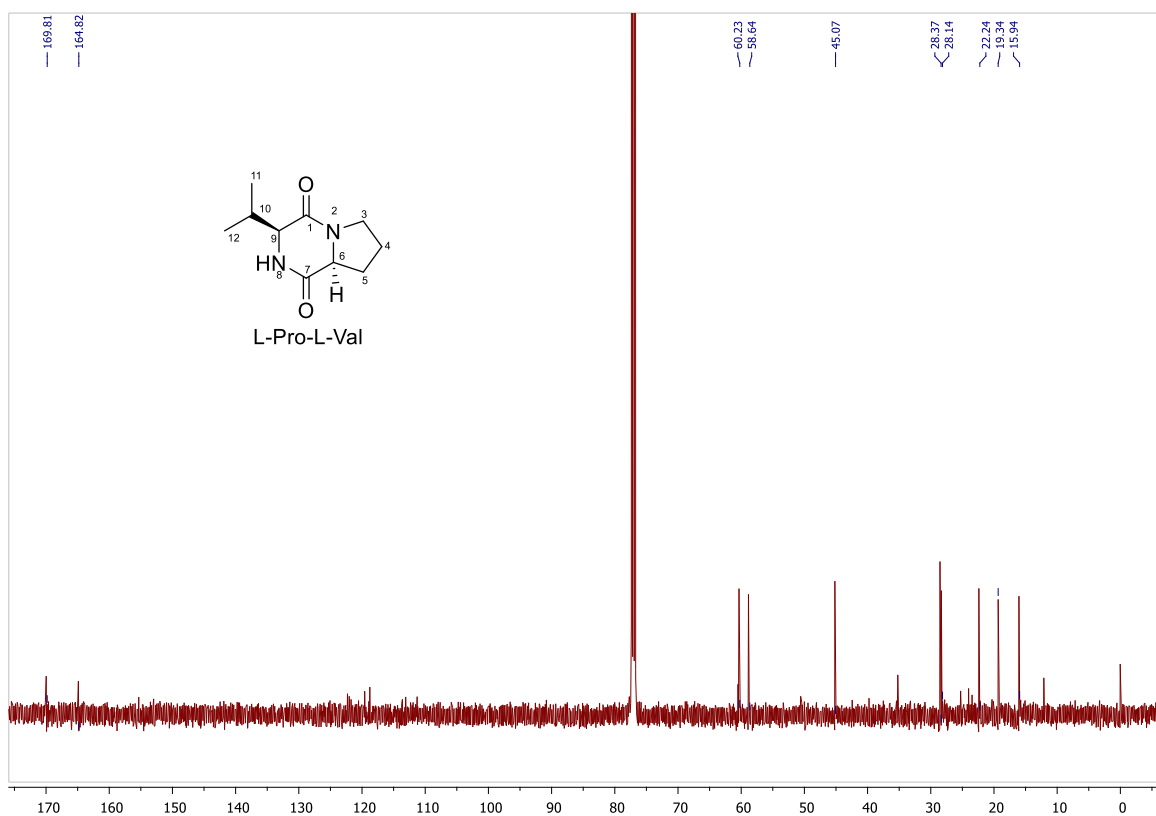


Figura 17. Espectro de RMN ^{13}C L-Pro-Val (CDCl_3 , 125 MHz)

Tabla 8. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C de L-Pro-L-Val en CDCl_3

RMN ^1H δ (ppm)	Grupo	J (Hz)	RMN ^{13}C δ (ppm)	Grupo
5.68	NH		169.8	C7
4.08	H6	8.0	164.8	C1
3.94	H9	10, 4	60.2	C6
3.63–3.56	2H3		58.6	C9
2.64	H10		45.1	C3
2.38	H5 _a		28.3	C5
2.05	H5 _b H4 _a		28.1	C10
1.91	H _b 4		22.2	C4
1.0	3H12	6.6	19.3	C11
0.95	3H13	6.6	15.9	C12

Prácticamente junto con la dicetopiperazina L-Pro-L-Val en la purificación de la fracción 7 se obtuvo otro compuesto de tipo dicetopiperazina. Se procedió a analizar por RMN y se identificó como una dicetopiperazina L-Pro-L-Phe.

En el espectro de RMN de ^1H (Figura 18), a diferencia de los espectros de las dos dicetopiperazinas anteriormente analizadas (Figuras 12 y 16), se observan señales en la región de aromáticos (7.36-7.22 ppm) que integran para cinco hidrógenos. En 5.59 ppm se observa una señal ancha que corresponde al NH. En 4.27 ppm se observa un doblete de dobles ($J= 10.5, 3$ Hz) que integra para un hidrógeno y que corresponde con H9. En 4.09 ppm se observa una señal triple ($J= 8.5$ Hz) que integra para un hidrógeno que corresponde al H6. En 3.63-3.56 ppm se observa una señal múltiple que integra para tres hidrógenos y que corresponden con 2H3 y H10a. En 2.77 ppm se observa el hidrógeno H10b. En 2.34 ppm se observa una señal que integra para un hidrógeno y que corresponde con H5a. De manera similar en 2.03 ppm se observa una señal que integran para dos hidrógenos y que corresponden con H5b. En 1.9 ppm se observa una señal séptuple que integra para dos hidrógenos que corresponde con H4.

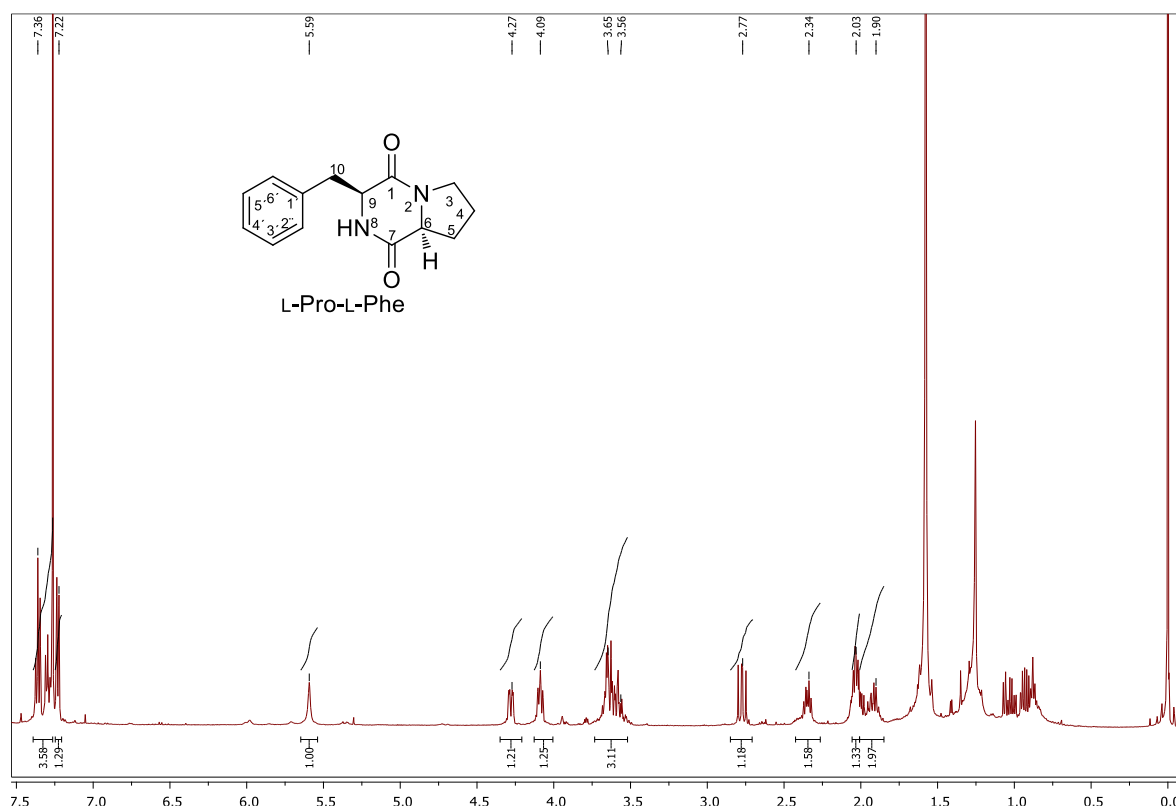


Figura 18. Espectro de RMN ^1H L-Pro-L-Phe (CDCl_3 500 MHz)

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 19) del compuesto designado como L-Pro-L-Phe se observan señales que no estaban en los espectros de las dicetopiperazinas anteriores que son las que se encuentran en 135.9, 129.4, 129.0 y 127.6 ppm correspondientes a los

carbonos aromáticos del grupo fenilo. En la tabla 9 se resumen las señales de ambos espectros de RMN.

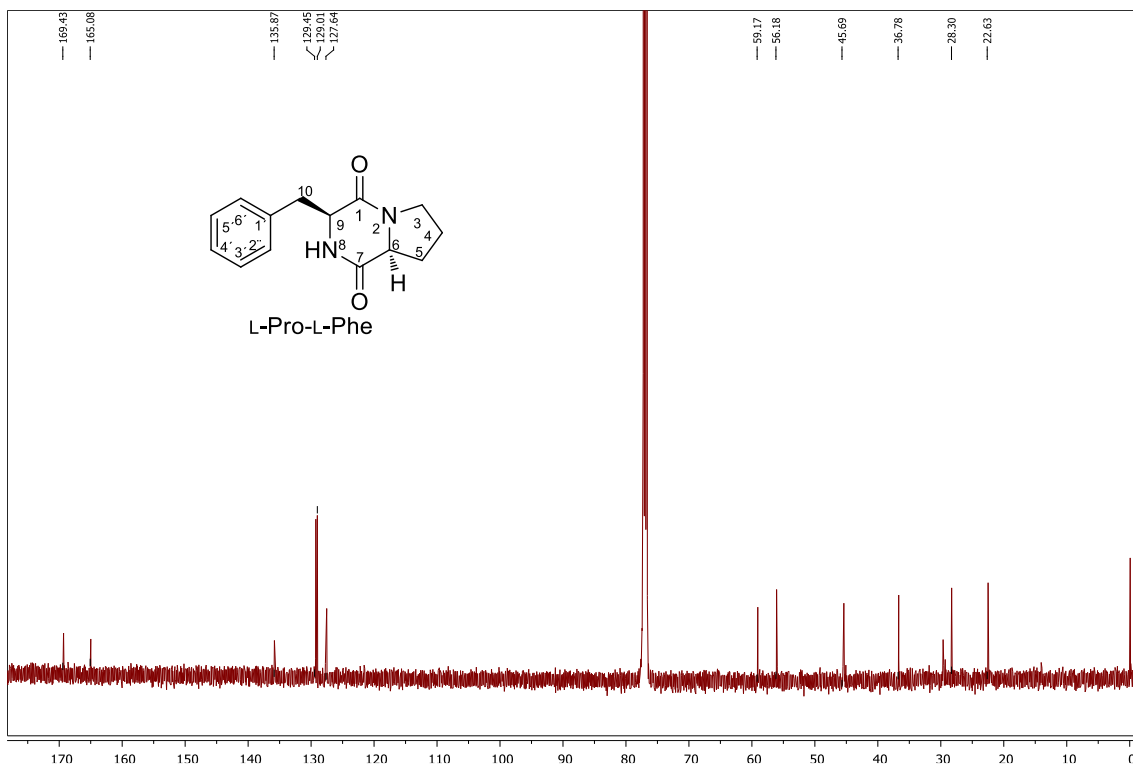


Figura 19. Espectro de RMN ^{13}C L-Pro-L-Phe (CDCl_3 , 125 MHz)

Tabla 9. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C de L-Pro-L-Phe en CDCl_3

RMN ^1H δ (ppm)	Grupo	J (Hz)	RMN ^{13}C δ (ppm)	Grupo
7.29	Ph-Phe		169.3	C7
5.59	NH		165.0	C1
4.27	H9	10.5, 3.0	135.8	C1'
4.09	H6	8.5	129.4	C3', C5'
3.65	H _a 10		129.0	C2', C6'
3.56	H3		127.6	C4'
2.77	H _b 10	14.5, 10.5	59.2	C6
2.34	H _a 5		56.2	C9
2.03	H _b 5		45.7	C3
1.91	H4		36.8	C10
			28.3	C5
			22.6	C4

5.3.4 Fracciones 11-13

Continuando con el análisis de metabolitos secundarios y por lo reportado en la bibliografía, los microorganismos son excelentes productores de bacteriocinas y en el caso de *Bacillus*, no es excepción.

Se realizó un primer análisis de la actividad antibacterial de las fracciones 11-13, la cual se resume en la tabla 10. En esta tabla se aprecia que las fracciones 11 y 12 tienen actividad contra varias bacterias lo que da idea de que en ellas existen bacteriocinas.

Tabla 10. Halos de inhibición en mm para las fracciones 11-13 de *B. weihenstephanensis*.

Bacteria	F-11	F-12	F-13
<i>Bacillus cereus</i>	18	12	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	14	8	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	21	15	0
<i>Vibrio paraemolitycus</i>	12	11	10
<i>Escherichia coli</i>	8	7	0
<i>Salmonella</i>	0	9	6
<i>Shigella</i>	13	10	7

Se analizaron las fracciones más polares de la 11 a la 13 (mayor porcentaje de metanol) y se determinó por la técnica de electroforesis SDS-PAGE la existencia de una bacteriocina con un peso de 3.71 kDa (Figura 20).

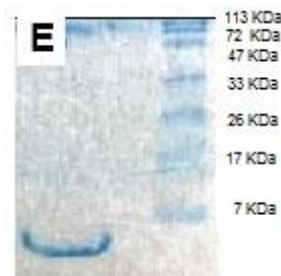


Figura 20. Electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) de la bacteriocina producida *B. weihenstephanensis*.

La bacteriocina fue tratada con diferentes disolventes para probar su solubilidad siendo soluble en agua y metanol. También se le hicieron pruebas de estabilidad a diferentes temperaturas siendo estable en un rango de 60–80 °C y 100 °C su estabilidad se redujo en un

15% y se perdió completamente a 121 °C por 20 minutos. Se midió su susceptibilidad en rangos de pH diferentes y se comprobó que permanecía estable en rangos de pH 2–10.

Debido a que las bacteriocinas son antibacteriales, se analizó su actividad antimicrobiana contra diversas bacterias mostrando actividad bacteriostática contra *Listeria monocytogenes* y actividad bacteriolítica contra *Bacillus cereus* con un halo de inhibición de 1.5 cm, como se observa en la Tabla 11.

Tabla 11. Actividad antibacteriana de la bacteriocina de *B. weihenstephanensis* contra varias bacterias expresadas en mm.

BACTERIA	<i>B. weihenstephanensis</i> (3.71 kDa)
<i>L. monocytogenes</i>	10*
<i>B. cereus</i>	15
<i>S. choleraesuis</i>	0
<i>V. parahaemolyticus</i>	0
<i>V. cholerae</i>	0

*Bacteriostático

Esta actividad antibacteriana también fue observada mediante el experimento de autoradiografía en multicapa. Este experimento consiste en colocar el gel que se obtuvo por electroforesis SDS-PAGE en una placa que tenga agar, posteriormente, se adiciona agar semisólido inoculado con la bacteria que se va a utilizar para la prueba y se incuba por 24 horas a 29 °C. Se eligieron *B. cereus* (Figura 21A) y *L. monocytogenes* (Figura 21B) como bacterias indicadoras. Se puede observar que en *B. cereus* se nota el halo bien nítido mientras que en *L. monocytogenes* se nota un halo opaco que indica la actividad bacteriostática hacia esta bacteria.

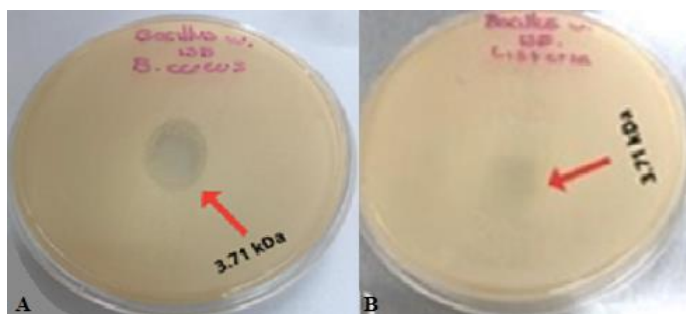


Figura 21. Actividad en la autoradiografía en multicapa utilizando A) *B. cereus* y B) *L. monocytogenes*.

5.4 Compuestos naturales obtenidos de *B. cereus*

Se continuó trabajando con la cepa ELI67 la cual fue identificada genéticamente como *B. cereus*, que es la especie que le da el nombre al grupo.

Para la extracción de los metabolitos secundarios se utilizó la misma resina Amberlita XAD-16[®]. Se obtuvieron 18.90 gramos de extracto con un rendimiento de .875 miligramos (mg) por litro de extracto, de un total de 21.6 litros.

Se realizó un fraccionamiento general con 3.5 gramos del extracto obtenido, mediante cromatografía en columna utilizando gel de sílice (70-230 mesh) como fase estacionaria y como fase móvil diferentes disolventes como hexano, acetato de etilo y metanol. Se obtuvieron 12 eluatos de 200 mL como se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12. Fracciones obtenidas del fraccionamiento del extracto crudo

Eluyentes	Proporción %	fracción
Hexano	100	1
Hexano: AcOEt	75:25	2
Hexano: AcOEt	50:50	3
Hexano: AcOEt	25:75	4
AcOEt	100	5
AcOEt: MeOH	90:10	6
AcOEt: MeOH	80:20	7
AcOEt: MeOH	70:30	8
AcOEt: MeOH	60:40	9
AcOEt: MeOH	50:50	10
AcOEt: MeOH	20:80	11
MeOH	100	12

Se realizó un seguimiento cromatográfico en capa fina para las fracciones, utilizando como revelador luz UV de onda corta (254 nm) y onda larga (365 nm) para observar las fracciones de cuantos compuestos se componían.

5.5 Purificación de los compuestos naturales obtenidos de *B. cereus*

A modo de resumen se presenta en la Tabla 13 los compuestos que se identificaron en esta cepa de *B. cereus* en las fracciones obtenidas.

Tabla 13. Compuestos encontrados en *B. cereus*

Fracciones	<i>Bacillus cereus</i>
1	GRASA
2	Ftalato de 2 bis- <i>R</i> -(2-etilhexilo)
3	-----
4	-----
5	1-Palmitilglicerol
6	L-Pro-L-Leu
7	L-Pro-L-Val L-Pro-L-Phe
8	Lipopéptidos
9	Lipopéptidos
10	Bacteriocina 1.67 kDa
11	Bacteriocina 1.67 kDa
12	Bacteriocina 1.67 kDa

Se puede observar que en esta cepa se aislaron varios compuestos que ya se habían aislado anteriormente en *B. mycoides*, *B. toyonensis*, *B. thuringiensis* y *B. weihenstephanensis*. Uno de ellos es el compuesto Ftalato de 2 bis-*R*-(2-etilhexilo), muy común en general en *Bacillus*. Se puede resaltar que las dicetopiperazinas son compuestos muy comunes, sin embargo, las encontradas en *B. cereus* son exactamente las mismas que las encontradas en *B. weihenstephanensis* que son L-Pro-L-Val, L-Pro-L-Phe y L-Pro-L-Leu. También se encuentran los lipopéptidos y las bacteriocinas que son de origen peptídico y cuya biosíntesis se encuentra codificada en genes alojados en el cromosoma de la mayoría de *Bacillus* Sp También se pudo identificar el 1-Palmitilglicerol que se aisló en *B. mycoides* y *B. weihenstephanensis*.

No se pudo identificar ningún compuesto que no hubiera sido anteriormente aislado de las otras especies. Sólo llama la atención el bajo peso molecular de la bacteriocina aislada que es de 1.67 kDa.

5.5.1 Fracción 5

Para la purificación de la fracción 5 se hizo por medio de una pequeña columna con una altura de 6 cm y un diámetro de 1.6 cm, de dicha purificación se obtuvieron alrededor de 110 tubos de ensayo con 1-2.5 ml de mezcla de disolventes para la separación de sus componentes. Se pudo identificar el 1-Palmitilglicerol que se obtuvo con una mezcla de hexano/acetato de etilo 1:1 y es coincidente el tipo de estructura con lo que previamente se identificó en nuestro grupo de trabajo.

5.5.2 Fracción 6

Esta fracción se obtuvo a partir de la columna general con una mezcla de acetato de etilo y metanol (98:2) por lo tanto se utilizaron mezclas similares en polaridad. Se utilizó una columna pequeña de 7 cm de altura y 1.7 cm de diámetro. Se obtuvo un sólido blanco, que correspondía a la dicetopiperazina (DCP) L-Pro-L-Leu.

5.5.3 Fracción 7

Esta se obtuvo de hexano/acetato de etilo 2:8. Se identificó a la DCP L-Pro-L-Val En el caso de la segunda reunión se identificó otra DCP siendo L-Pro-L-Phe.

5.5.4 Fracción 10-12

Se realizó el análisis de la actividad antibacteriana de las fracciones 10-12 que contenían la bacteriocina (Tabla 14). En la figura 22 se muestran las actividades antibacteriales de la bacteriocina contra algunas bacterias. Se determinó que por su actividad sí era una bacteriocina y por la técnica de electroforesis SDS-PAGE se pudo saber que tenía un peso de 1.67 kDa, tal y como se muestra en la figura 23.

Tabla 14. Actividad antibacteriana de la bacteriocina de *B. cereus* contra varias bacterias, halos de inhibición expresados en mm.

BACTERIA	<i>B. cereus</i> (1.67 kDa)
<i>L. monocytogenes</i>	12
<i>B. cereus</i>	10
<i>S. choleraesuis</i>	0
<i>E.coli</i>	0
<i>Shigella</i>	0
<i>Proteus vulgaris</i>	0
<i>S.agalactiae</i>	10
<i>S. aureus</i>	11
<i>S. saprophyticus</i>	7
<i>Proteus mirabilis</i>	10
<i>Enterobacter</i>	8

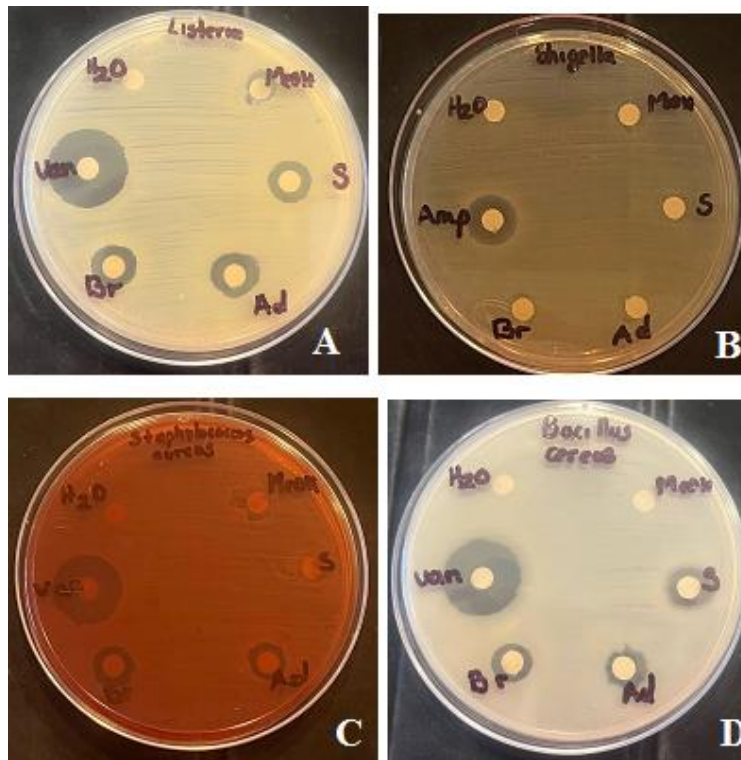


Figura 22: Actividad antibacteriana de la bacteriocina (Br) contra A) *L. monocytogenes*, B) *Shigella*, C) *S. aureus* y D) *B. cereus*

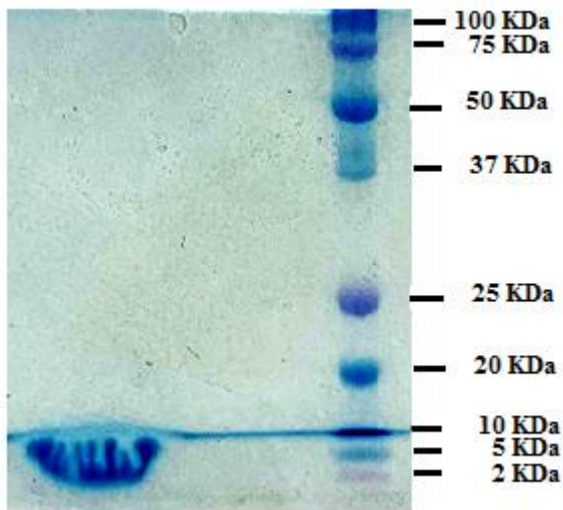


Figura 23. Electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) de la bacteriocina producida *B. cereus*.

5.6 Estudio comparativo de compuestos naturales obtenidos de las especies del grupo *B. cereus*

Una vez que se concluyó con las dos cepas que restaban se realizó un estudio comparativo acerca de los compuestos naturales aislados de *B. cereus* ELI67, *B. mycoides* ELI220, *B. thuringiensis* ELI52, *B. weihenstephanensis* ELI224 y *B. toyonensis* ELI73. El objetivo era tener una idea acerca del perfil químico de cada especie y relacionarlo con cada especie para diferenciar entre estas. En la Tabla 15 se resumen todos los compuestos de las cinco especies analizadas.

Tabla 15. Compuestos químicos aislados de *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis* y *B. toyonensis*.

<i>B. cereus</i>	<i>B. mycoides</i>	<i>B. toyonensis</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. weihenstephanensis</i>
Ftalato de 2 bis- <i>R</i> -(2-etilhexilo)	Ftalato de 2 bis- <i>R</i> -(2-etilhexilo)		Ftalato de 2 bis- <i>R</i> -(2-etilhexilo)	Ftalato de 2 bis- <i>R</i> -(2-etilhexilo)
1-Palmitilglicerol	1-Palmitilglicerol	<i>R</i> -2,3 Dihidroxi- <i>l</i> estereato	Melanina	1-Palmitilglicerol
	Ácido antranílico	<i>N</i> -acetil triptamina	<i>N</i> -acetil triptamina Fenilacetamida Triptamina Fenilamina	Macrolactina a 7- <i>O</i> -succinil macrolactina a
L-Pro-L-Leu L-Pro-L-Phe ----- L-Pro-L-Val	L-Pro-L-Leu L-Pro-L-Phe L-Pro L-Tyr -----	L-Pro-L-Leu L-Pro-L-Phe L-Pro-L-Tyr L-Pro-L-Val	L-Pro-L-Leu L-Pro-L-Phe L-Pro-L-Tyr L-Pro-L-Val	L-Pro-L-Leu L-Pro-L-Phe ----- L-Pro-L-Val
Lipopéptidos	Lipopéptidos	Lipopéptidos	Lipopéptidos	Lipopéptidos
Bacteriocina 1.67 kDa	Bacteriocina 3.39 kDa Bacteriocina 2.91 kDa	Bacteriocina 3.83 kDa Bacteriocina 3.89 kDa	Bacteriocina 2.6 kDa Bacteriocina 4.1 kDa	Bacteriocina 3.71 kDa

Como se observa en la tabla 15 algunos compuestos son muy comunes y aparecen en todas las especies del grupo *B. cereus*, tal como las dicetopiperazinas, las cuales habían sido

reportadas ya en el grupo de investigación²⁷ o el Ftalato de 2 bis-*R*-(2-etilhexilo) que también se encuentra ampliamente distribuido en el género *Bacillus*.²⁸

Los lipopéptidos también son compuestos de origen peptídico muy comunes en el género de *Bacillus* con actividad antifúngica. Otros compuestos muy comunes, son las bacteriocinas que tienen actividad antibacterial. Aunque en las bacteriocinas una diferencia que se puede resaltar es que son de diferente peso molecular de una especie a otra o que a veces sólo se puede aislar una y otras veces dos. Sin embargo, es una diferencia poco significativa. Los monoacil gliceroles 1-palmitilglicerol y *R*-2,3 dihidroxil estereato son bastante comunes, aunque como se observa no se pudo encontrar en *B. thuringiensis*.

En la tabla también se observa que hay un grupo de compuestos que se aíslan en algunas especies, pero en otras no. Es el caso de los compuestos indólicos. Los compuestos *N*-acetil triptamina, fenetilacetamida, triptamina y fenetilamina fueron aislado en *B. thuringiensis* y sólo uno de ellos, la *N*-acetil triptamina, pudo aislarse de *B. toyonensis*. El resto de las especies del grupo de *B. cereus* no produjo ningún compuesto indólico. Por lo tanto, se puede concluir que estos compuestos pueden ser específicos para poder identificar *B. thuringiensis*.

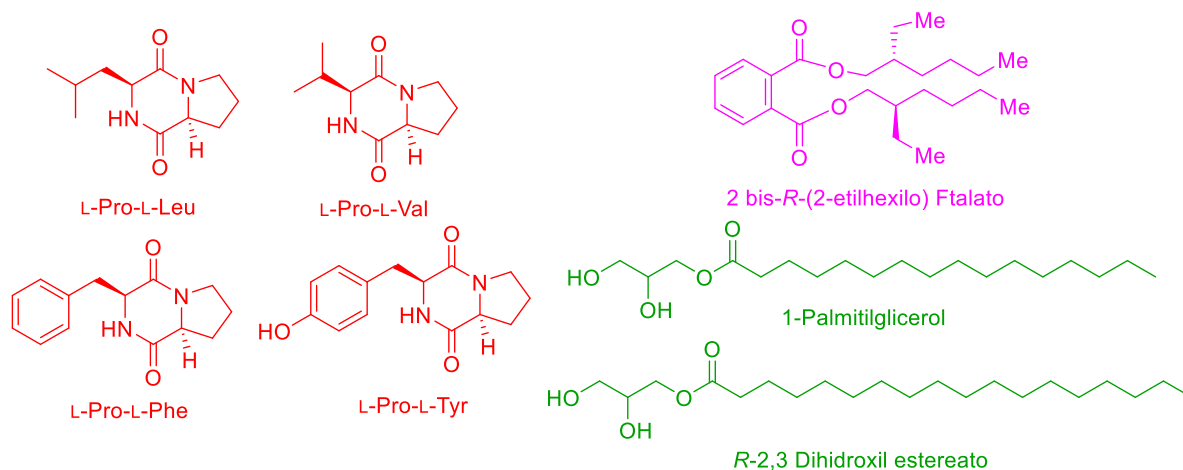
Sin embargo, el resultado más relevante y llamativo se refiere a los compuestos de macrolactina. Dos de estos compuestos, denominados macrolactina a y 7-*O*-succinil macrolactina a, se aislaron únicamente de *B. weihenstephanensis*, pero no pudieron aislarse de ninguna otra cepa. Estos resultados dan una idea de que algunos compuestos son muy generales y pueden encontrarse en diferentes especies; sin embargo, hay algunos compuestos que son muy específicos y sólo son producidos por algunas especies. Los compuestos de macrolactina son muy específicos de la especie *B. weihenstephanensis* dentro del grupo *B. cereus*, porque fue en la única bacteria donde se identificaron. Tampoco se aislaron macrolactinas de *B. mycoides*, que es una especie muy próxima a *B. weihenstephanensis*.

Este resultado es muy interesante, teniendo en cuenta que las especies *B. weihenstephanensis* y *B. mycoides* son filogenéticamente muy cercanas. En este sentido, Soufiane y Cote en 2013 informaron de la similitud entre los genomas de *B. cereus*, *B. weihenstephanensis* y *B. mycoides*, son muy próximas en similitud de sus genomas. Incluso en su estudio sugirieron que algunas cepas de *B. cereus* y *B. mycoides* deberían reclasificarse como *B. weihenstephanensis*.⁴⁸ Además, Liu y colaboradores realizaron un estudio basado en el genoma de algunas cepas de *Bacillus* para analizar la relación taxonómica entre *B.*

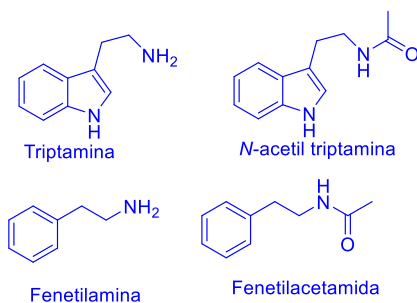
weihenstephanensis y *B. mycooides* utilizando un enfoque taxonómico polifásico, tipificación de secuencias multilocus (MLST) y análisis genómicos.⁴⁷ Afirmaron que no había justificación para mantener un estatus de especie diferente para *B. weihenstephanensis* y *B. mycooides*, proponiendo que *B. weihenstephanensis* puede ser un sinónimo heterotípico posterior de *Bacillus mycooides*.⁴⁷ Esto puede estar contrastando con su apariencia morfológica ya que *B. mycooides* tiene un crecimiento rizoide típico, mientras que *B. weihenstephanensis* es psicrotolerante y el crecimiento en placa es más similar como *B. cereus*. Los datos obtenidos en este estudio indican que el perfil químico es bastante diferente entre ambas especies, lo que sugiere que, aunque genómicamente *B. mycooides* y *B. weihenstephanensis* pueden ser indistinguibles, ambas especies deberían tratarse de forma diferente.

6. CONCLUSIONES

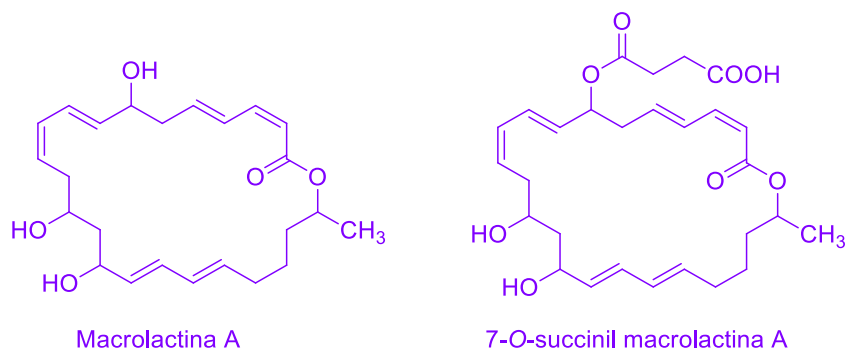
- ✓ Se trabajaron dos especies del mismo grupo de *B. cereus* como son *B. weihenstephanensis* y *B. cereus* que es la especie que le da el nombre al grupo, para completar un estudio de los compuestos aislados en cinco especies del grupo de *B. cereus*.
- ✓ De la especie *B. weihenstephanensis* se pudieron aislar diferentes compuestos que ya se habían aislado anteriormente, como son: 2 bis-*R*-(2-etilhexilo) Ftalato, el 1-Palmitilglicerol y las dicetopiperazinas L-Pro-L-Leu, L-Pro-L-Val y L-Pro-L-Phe, lipopéptidos y una bacteriocina de 3.71 KDa.
- ✓ Sin embargo, el resultado más relevante y llamativo se refiere a los compuestos de macrolactina. Dos de estos compuestos, denominados macrolactina a y 7-*O* -succinil macrolactina a, se aislaron únicamente de *B. weihenstephanensis*, pero no pudieron aislarse de ninguna otra cepa.
- ✓ De la especie de *B. cereus* no se pudo identificar ningún compuesto que no hubiera sido anteriormente aislado de las otras especies. Sólo llama la atención el bajo peso molecular de la bacteriocina aislada que es de 1.67 kDa.
- ✓ Se realizó un estudio comparativo de todos los compuestos aislado de las cinco especies *B. cereus* ELI67, *B. mycoides* ELI220, *B. thuringiensis* ELI52, *B. weihenstephanensis* ELI224 y *B. toyonensis* ELI73.
- ✓ Se observó que algunos compuestos son muy comunes en las diferentes especies, como son las dicetopiperazinas, el Ftalato de 2 bis-*R*-(2-etilhexilo) y los monoacil gliceroles.



- ✓ Los compuestos indólicos *N*-acetil triptamina, fenetilacetamida, triptamina y fenetilamina fueron aislados sólo en *B. thuringiensis* por lo que estos compuestos pueden ser específicos para poder identificar *B. thuringiensis*.



- ✓ Los compuestos macrolactina a y 7-*O* -succinil macrolactina a, se aislaron únicamente de *B. weihenstephanensis*, pero no pudieron aislarse de ninguna otra cepa, siendo muy específicos de la especie *B. weihenstephanensis*.



- ✓ No se aislaron macrolactinas de *B. mycoides*, que es una especie muy próxima a *B. weihenstephanensis*.
- ✓ Los datos obtenidos en este estudio indican que el perfil químico es bastante diferente entre ambas especies, lo que sugiere que, aunque genómicamente *B.*

mycoides y *B. weihenstephanensis* pueden ser indistinguibles, ambas especies deberían tratarse de forma diferente.

- ✓ En este estudio dos tipos de compuestos son específicos de especies, los indólicos y las macrolactinas, los cuales se relacionan con *B. thuringiensis* y *B. weihenstephanensis* respectivamente. Por lo tanto, el perfil químico de cada especie ayuda a definir qué especie tenemos en placa.

7- BIBLIOGRAFÍA

- 1- Newman D. J., Cragg G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, **2020**, 83, 1-34.
- 2- Cragg G. M., Newman DJ. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim. Biophys. Acta*, **2014**, 1830, 3670-3095.
- 3- Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, synthesis and specific functions. *Microbiol*, **2005**, 56, 845-857.
- 4- Demain AL, Fang A. The natural functions of secondary metabolites. *Adv. Biochem Eng Biotechnol*, **2000**, 69, 1-39.
- 5- Abdel-Razek, A.S., El-Naggar, M.E., Allam, A., Morsy, O.M., Othman, S.I., Microbial Natural Products in Drug Discovery. *Processes*, **2020**, 8, 470.
- 6- Gutierrez-Ravelo, A., Estevez-Braun, A. Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el S. XXI. R. *Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat. (Esp)*, **2009**, 103, 409-419.
- 7- Nabih A. Baeshen, Mohammed N. Baeshen, Abdullah Sheikh, Roop S. Bora, Mohamed Morsi M. Ahmed, Hassan A. I. Ramadan, Kulvinder Singh Saini, Elrashdy M. Redwan., Cell factories for insulin production. *Microbial Cell Factories* **2014**, 13:141, 1-9.
- 8- Newman D. J., Cragg G. M., Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010, *Journal of Natural Products*, **2012**, 75, 311–335.
- 9- Bérdy J. Bioactive microbial metabolites. *Journal of Antibiotics*, **2005**, 58, 1-26.
- 10- Liu Y., Du J., Lai Q., Zeng R., Ye D., Xu J., Shao Z.. Proposal of nine novel species of the *Bacillus cereus* group. *Int J Syst Evol Microbiol* . **2017**, 67, 2499–2508.
- 11- Atanasov, A.G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M. et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. **2021**, 20, 200–216.
- 12- Cragg G. M., Grothaus P.G., Newman D. J., New Horizons for Old Drugs and Drug Leads, *J. Nat. Prod.*, **2014**, 77, 703–723.

- 13- Dewick P. M., Secondary Metabolism: The Building Blocks and Construction Mechanisms. In Dewick P. M., Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach (pp. 7-38). **2009**. John Wiley & Sons, Ltd.
- 14- Zhou F., Pichersky E., More is better: the diversity of terpene metabolism in plants, *Current Opinion in Plant Biology*, **2020**, 55:1–10.
- 15- Aniszewski T. Definition, Tipology and Ocurrence of Alkaloids, In Alkaloids – Secrets Of Life – Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role, **2007**. Elsevier, 1-57.
- 16- Tyc O., Song C., Dickschat J. S., Vos M., Garbeva P., The Ecological Role of Volatile and Soluble Secondary Metabolites Produced by Soil Bacteria, *Trends in Microbiology*, **2017**, 25, 280-292.
- 17- Koehn F. E., Carter G. T., The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, **2005**, 4 206–220.
- 18- Stanforth D. S., Properties and purpose of secondary metabolites. In D. S. Stanforth, Natural product chemistry at a glance (147). **2006** Blackwell Publishing Ltd.
- 19- Toledo-Marante F. J., Química Orgánica y Sustancias Bioactivas, Cuadernillo de Clases Prácticas. Editorial de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, **2015**, pp. 3-25.
- 20- Zadeh N. S., Zeppa G., Recovery and Concentration of Polyphenols from Roasted Hazelnut Skin Extract Using Macroporous Resins, *Foods*, **2022**, 11, 1969, 1-12.
- 21- Ahmad A., Siddique J. A., Laskar M. A., Kumar R, Mohd-Setapar S. H., Khatoon A., Shiekh R. A., New generation Amberlite XAD resin for the removal of metal ions: A review. *Journal of environmental sciences (China)*, **2015**. 31, 104–123.
- 22- Hou M., Zhang L., Adsorption/desorption characteristics and chromatographic purification of polyphenols from *Vernonia patula* (Dryand.) Merr. using macroporous adsorption resin., *Industrial Crops & Products*, **2021**, 170, 113729, 1-9.
- 23- Wang Z., Peng S., Peng M., She Z., Yang Q., Huang T., Adsorption and desorption characteristics of polyphenols from *Eucommia ulmoides* Oliv. leaves with macroporous

- resin and its inhibitory effect on α -amylase and α -glucosidase, *Ann Transl Med* **2020**, *8*, 1004, 1-16.
- 24- Sunil K. T., Bani T. Natural Products Chemistry: A General Treatment. In Chemistry Of Plant Natural Products, **2015**, 243-316, Berlin Heidelberg, Springer.
- 25- Sansinenea E., Ortiz A., Secondary metabolites of soil *Bacillus* Sp *Biotechnol Lett*, **2011**, *33*, 1523-1538.
- 26- Ortiz A., Sansinenea E., Chemical Compounds Produced by *Bacillus* Sp Factories and Their Role in Nature, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **2019**, *19*, 373-380.
- 27- Sansinenea E., Salazar F., Jiménez J., Mendoza Á., Ortiz A., Diketopiperazines derivatives isolated from *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus endophyticus*, establishment of their configuration by X-ray and their synthesis. *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 2604-2607.
- 28- Castro M., Jimenez J., Ortiz A., Sansinenea E., Di[(R)-2-ethylhexyl] Phthalate, a Bioactive Metabolite First Isolated from Three Different *Bacillus* Species, and its Synthesis. *Lett. Org. Chem.* **2020**, *17*, 90-95.
- 29- Sansinenea E., Salazar F., Ramirez M., Ortiz A., An Ultra-Violet Tolerant Wild-Type Strain of Melanin-Producing *Bacillus thuringiensis*. *Jundishapur J Microbiol*, **2015**, *8*, e20910.
- 30- Vaca J., Salazar F., Ortiz A., Sansinenea E., Indole alkaloid derivatives as building blocks of natural products from *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus velezensis* and their antibacterial and antifungal activity study. *J. Antibiot*, **2020**, *73*, 798-802.
- 31- Gustafson K., Rohman M., Fenical W., The macrolactins, a novel class of antiviral and cytotoxic macrolides from a deep-sea marine bacterium. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 7519-7525.
- 32- Jaruchoktaweetchai C., Suwanborirux K., Tanasupawatt S., Kittakoop P., Menasveta P., New macrolactins from a marine *Bacillus* Sp Sc026P. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 984-986.
- 33- Salazar F., Ortiz A., Sansinenea E., A strong antifungal activity of 7-O-Succinyl Macrolactin A vs Macrolactin A from *Bacillus amyloliquefaciens* ELI 149. *Curr. Microbiol*, **2020**, *77*, 3409-3413.

- 34- Salazar F., Ortiz A., Sansinenea E., Characterisation of two novel bacteriocin-like substances produced by *Bacillus amyloliquefaciens* ELI149 with broad-spectrum antimicrobial. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, **2017**, *11*, 177-182.
- 35- Duncan E., Ashton L., Abdulai A. R., *et al.* Connecting the food and agriculture sector to nutrition interventions for improved health outcomes. *Food Sec.* **2022**, *14*, 657–675.
- 36- Kaur R., Choudhary D., Bali S., Bandral S. S., Singh V., Ahmad M.A., Rani N., Singh T. G., Chandrasekaran B., Pesticides: An alarming detrimental to health and environment. *Sci Total Environ.* **2024**, *915*, 170113.
- 37- Sun L., Wang W., Zhang X., Gao Z., Cai S., Wang S., Li Y., *Bacillus velezensis* BVE7 as a promising agent for biocontrol of soybean root rot caused by *Fusarium oxysporum*. *Front. Microbiol.* **2023**, *14*, 1275986.
- 38- Bailey B. A., Evans H. C., Mora W. P., Ali S. S., Meinhart L. W., *Moniliophthora roreri*, causal agent of cacao frosty pod rot, *Molecular Plant Pathology*, **2018**, *19*, 1580–1594.
- 39- Ávila-Miranda M. E., López-Zazueta J. G., Arias-Castro C., Rodríguez-Mendiola M. A., Guzmán de Peña D. A., Vera-Núñez J. A., Peña-Cabriaes J. J., Vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* in agave (*Agave tequilana* Weber var. azul). *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, **2010**, *12*, 166-180.
- 40- Cuervo-Parra J. A., Sanchez-Lopez V., Ramirez-Suero M., Ramirez-Lepe M., Morphological and Molecular Characterization of *Moniliophthora roreri* Causal Agent of Frosty Pod Rot of Cocoa Tree in Tabasco, Mexico. *Plant Pathology Journal*, **2011**, *10*, 122-127.
- 41- Aslam B., Khurshid M., Arshad M. I., Muzammil S., Rasool M., Yasmeen N., Shah T., Chaudhry T. H., Rasool M. H., Shahid A., Xueshan X., Baloch Z., Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2021**, *11*, 771510.
- 42- Vaca J., Ortiz A., Sansinenea E., *Bacillus* Sp Bacteriocins: Natural Weapons against Bacterial Enemies. *Current Medicinal Chemistry*, **2022**, *29*, 2093-2108.

- 43-Torres Manno M. A., Repizo G. D., Magni C., Dunlap C. A., Espariz M. The assessment of leading traits in the taxonomy of the *Bacillus cereus* group. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **2020**, 3, 2223-2242.
- 44-Logan N. A., Vos P. D., *Bacillus*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. **2015**. 1-163. Wiley & Sons, Inc., Bergey's Manual Trust.
- 45-Ehling-Schulz M., Lereclus D., Koehler T. M., The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic Potential. *Microbiol Spectr*. **2019**, 7, GPP3-0032-2018, 1-60.
- 46-Sánchez J., Correa M., Castañeda-Sandoval L. M., *Bacillus cereus* un patógeno importante en el control microbiológico de los alimentos. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública*, **2016**, 34, 230-242.
- 47-Liu Y., Lai Q., Shao Z., Genome analysis-based reclassification of *Bacillus weihenstephanensis* as a later heterotypic synonym of *Bacillus mycoides*. *Int J Syst Evol Microbiol*, **2018**, 68, 106-112.
- 48-Soufiane B., Cote J. C., *Bacillus weihenstephanensis* characteristics are present in *Bacillus cereus* and *Bacillus mycoides* strains. *FEMS Microbiol Lett.*, **2013**, 341, 127-137.
- 49-Nakamura L., Jackson M., Clarification of the taxonomy of *Bacillus mycoides*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. **1995**, 45, 46-49.
- 50-Thorsen L., Hansen B. M., Nielsen K. F., Hendriksen N. B., Phipps R. K., Budde B. B., Characterization of emetic *Bacillus weihenstephanensis*, a new cereulide-producing bacterium. *Applied and environmental microbiology*, **2006**, 72, 5118-5121.
- 51-Didelot X., Barker M., Falush D., Priest F. G., Evolution of pathogenicity in the *Bacillus cereus* group. *Syst Appl Microbiol*. **2009**, 32, 81-90.
- 52-Lechner S., Mayr R., Francis K. P., Prüss B. M., Kaplan T., Wiessner-Gunkel E., Stewart G.S., Scherer S., *Bacillus weihenstephanensis* Sp nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Int J Syst Bacteriol*. **1998**, 48, 1373-82.
- 53-Ortiz A., Sansinenea E., Chapter 1, *Bacillus thuringiensis* based biopesticides for integrated crop management, In: *Biopesticides Volume 2: Advances in Bio-inoculants* (Eds, Rakshit A., Singh Meena V., Abhilash P. C., Sarma B.K., Singh H. B., Fraceto L.,

- Parihar M., Singh A. K.) **2022**, Elsevier Woodhead Publishing, ISBN: 978-0-12-823355-9
- 54- Sansinenea-Royano E., Vaca-Calderon J. Capítulo 2. *Bacillus*. En una mirada hacia el mundo bacteriano. (eds Villagran-Padilla C. L, Ruiz-Tagle A. C.) **2019**. BUAP. ISBN: 978-607-525-629-0
- 55- Nakamura L. K. *Bacillus pseudomycooides* Sp nov. *International journal of systematic bacteriology*, **1998**, 48, 1031–1035.
- 56- Cairo J., Gherman I., Day A., Cook P. E., *Bacillus cytotoxicus*-A potentially virulent food-associated microbe. *Journal of applied microbiology*, **2022**, 132, 31–40.
- 57- Jiménez G., Urdiain M., Cifuentes A., López-López A., Blanch A. R., Tamames J., Kämpfer P., Kolstø A. B., Ramón D., Martínez J. F., Codoñer F. M., Rosselló-Móra R., Description of *Bacillus toyonensis* Sp nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Systematic and applied microbiology*, **2013**, 36, 383–391.
- 58- Moreno-Peña C. J., García-García J. H., Hernández-Vásquez C. I., Galán-Wong L. J., Pereyra-Alfárez B., Draft Genome Sequence of *Bacillus toyonensis* Strain GM18, Isolated from Agricultural Soil. *Microbiology resource announcements*, **2021**, 10, e00008-21.
- 59- Marrollo R., Microbiology of *Bacillus cereus*. In: The diverse Faces of *Bacillus cereus*. Savini V (Ed). **2016**. Elsevier. Pp 1-13.
- 60- Liu Y., Štefanič P., Miao Y., Xue Y., Xun W., Zhang N., Shen Q., Zhang R., Xu Z., Mandić-Mulec I., Housekeeping gene *gyrA*, a potential molecular marker for *Bacillus* ecology study. *AMB Express*. **2022**, 12, 133.
- 61- Xu X., Nielsen L. J. D., Song L., Maroti G., Strube M. L., Kovacs A., Enhanced specificity of *Bacillus* metataxonomics using a tuf-targeted amplicon sequencing approach. *ISME Commun*. **2023**, 3, 126.
- 62- Salazar B., Ortiz A., Keswani C., Minkina T., Mandzhieva S., Pratap Singh S., Rekadwad B., Borriss R., Jain A., Singh H. B., Sansinenea E., *Bacillus* Spp as Bio-factories for Antifungal Secondary Metabolites: Innovation Beyond Whole Organism Formulations. *Microb. Ecol*. **2023**, 86, 1–24.

- 63- Ortiz A., Sansinenea E., Recent advancements for microorganisms and their natural compounds useful in agriculture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2021**, *105*, 891–897.
- 64- Vaca J., Ortiz A., Sansinenea E., A study of bacteriocin like substances comparison produced by different species of *Bacillus* related to *B. cereus* group with specific antibacterial activity against foodborne pathogens. *Arch. Microbiol.* **2023**, *205*, 13, 2093–2108