

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA



Evaluación de la capacidad antimicrobiana de *Bacillus subtilis* contra *Escherichia coli* ATCC 25922

Por:

Martínez Hernández Karen Vianney

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

DICIEMBRE, 2024.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA

Evaluación de la capacidad antimicrobiana de *Bacillus subtilis* contra *Escherichia coli* ATCC 25922

Por:

KAREN VIANNEY MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

TESIS

Presentada como requisito para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por el Comité de Asesoría:



Dr. Juárez Verdayes Marco Adán
Director principal



Dra. Spezzia Mazzocco Teresita
Directora externa



Dra. Hernández Pérez Mirna
Co-Asesor externa

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Diciembre, 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
 DIVISIÓN DE INGENIERÍA
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Evaluación de la capacidad antimicrobiana de *Bacillus subtilis* contra *Escherichia coli* ATCC 25922

Por:

KAREN VIANNEY MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

TESIS

Presentada como requisito parcial obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por el Jurado Examinador:

Dr. Marco Adán Juárez Verdayes
 Presidente

Dr. Javier Israel Montalvo Arredondo
 Sinodal

Dra. Aida Isabel Leal Robles

Dr. Luis Enrique Flores Jimenes
 Sinodal suplente



M.C. Sergio Sánchez Martínez
 Coordinador de la División de Ingeniería

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Diciembre, 2024.

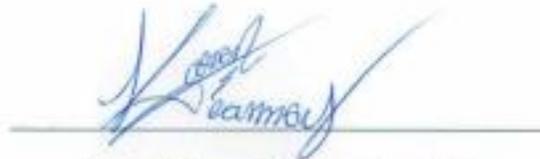
DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

El contenido presentado es original y no ha sido copiado de ninguna otra fuente. Todas las ideas, conceptos y resultados han sido obtenidos a través de nuestra propia investigación y análisis.

Declaro que soy consciente de la importancia de la honestidad académica y del respeto a la propiedad intelectual, y que hemos actuado de acuerdo con estos principios en la elaboración de este contenido.

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, gráficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente. Así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por las autoridades correspondientes.

Por lo anterior me responsabilizo de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaro que este trabajo no ha sido previamente presentado en ninguna otra institución educativa, organización, medio público o privado.



Karen Vianney Martínez Hernández

Autor Principal

AGRADECIMIENTOS

A mi ALMA TERRA MATER, la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, a la que considero mi segundo hogar, por haberme brindado la oportunidad de formarme profesionalmente.

Al Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica por proporcionarme un entorno de aprendizaje estimulante y desafiante. Ha sido invaluable para mi formación y desarrollo.

A mis asesores, Dra. Teresita Spezzia Mazzocco proveniente del INAOE, Dra. Mirna Hernández Pérez Proveniente del INIFAP y Dr. Marco Adán Juárez Verdayes procedente de la UAAAN, por su experiencia, orientación y su valioso tiempo de enseñarme sus conocimientos y sobre todo por ser parte importante durante mi formación. Los tres han contribuido en este trabajo final para terminar mi preparación académica.

A Mayra Félix Salazar Morales técnica del laboratorio de terapia fotodinámica del INAOE por su apoyo y colaboración durante mi investigación.

A M.C. Silvia Iliana Franco Pastrana por su amistad, paciencia, dedicación y esfuerzo. Su compromiso con la calidad y precisión ha sido un ejemplo a seguir.

A mi cuñado Rodrigo Adrián Gonzáles por ser un ejemplo de bondad, generosidad y ser un amigo verdadero.

A mis queridos amigos Juan Uc, Elizabeth May, David Sanches, Aylin Gutiérrez por su apoyo incondicional en mi estancia en la universidad, gracias por los momentos que pasamos juntos.

DEDICATORIAS

Esta tesis la dedico especialmente a mis padres: Damián Martínez Gómez y Mirna Hernández Pérez quienes me han sido mi fuente de inspiración y me dieron la oportunidad de prepararme profesionalmente, brindándome su apoyo incondicional, su tiempo y sus valores.

Siempre estaré agradecido por el sacrificio que hicieron por darme todo en mi estancia en la universidad y que gracias a eso culminó mi carrera, como ustedes siempre me lo dijeron “El estudio es la mejor herencia que te podemos dar”.

A mi hermana Tania Beatriz Martínez Hernández por ser mi mejor amiga, confidente, guía y sobre todo por apoyarme en toda situación que se me presentó en el transcurso de mi carrera.

A mi hermanito Damián Emir Martínez Hernández por ser mi compañero de aventuras, travesuras y por su apoyo incondicional durante mi estancia en la universidad.

A mi abuela María Teresa Gómez Aguilar su presencia en mi vida es un regalo invaluable y espero que este logro sea un pequeño reflejo de la gratitud que siento hacia ella.

A mi abuelo Estanislao Hernández Arriaga a quien no tuve la oportunidad de conocer, aunque no estuviste presente en mi vida, tu influencia y tu memoria siguen siendo una fuente de inspiración y motivación para mí.

A mis tíos Roció Sánchez, Alejandro Hernández, Marisol Villaseñor y Jairo Martínez por ser un ejemplo de amistad, apoyo constante, sabiduría y lealtad incondicional.

A mis primas Aylin Martínez, Dilenia Madrid, Naomi Altuzar, por ser una fuente de alegría, cada momento compartido es un recuerdo que guardo con mucho cariño.

A Júpiter por ser mi compañero de ensayos y cómplice de desvelos

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS V

DEDICATORIAS VI

CONTENIDO VII

ÍNDICE DE CUADROS IX

ÍNDICE DE FIGURAS X

RESUMEN XII

ABSTRACT XIII

I. INTRODUCCIÓN 1

 1.2 Objetivo general 2

 1.3 Objetivos específicos 2

 1.4 Hipótesis 2

 1.5 Justificación 3

II. REVISIÓN DE LITERATURA 4

 2.1 Patogenicidad de las bacterias 4

 2.2 *Escherichia coli* 4

 2.3 *Escherichia coli* ATCC 25922 6

 2.4 *Bacillus* spp. 7

 2.5 Ciclo de desarrollo de *Bacillus subtilis* 9

 2.6 Antibióticos 10

 2.7 Clasificación según su mecanismo de acción 10

 2.8 Metabolitos secundarios microbianos 12

 2.9 Lipopéptidos 12

 2.10 Antibiograma 13

 2.11 Método de difusión en disco 13

 2.12 Estado del arte de *Bacillus* 14

III. MATERIALES Y MÉTODOS 16

 3.1 Ubicación del experimento 16

 3.2 Equipos 17

 3.3 Materiales 17

 3.4 Reactivos 18

 3.5 Material biológico 18

 3.6 Protocolo para la selección de agar 19

 3.7 Protocolo sobre la elaboración agar Luria Bertani 19

 3.8 Protocolo sobre la elaboración del caldo Luria Bertani 20

3.9 Protocolo sobre prueba inhibidora de sobrenadante de <i>B. subtilis</i> en medio de cultivo LB contra <i>E. coli</i>	21
3.10 Protocolo para la toma de imágenes	25
3.11 Protocolo para el análisis de imágenes con ImageJ.....	25
3.12 Protocolo para la obtención de datos	29
IV. RESULTADOS.....	30
4.1 Criterios de selección de agar LB.....	30
4.2 Análisis de la inhibición del fermentado de <i>B. subtilis</i>	33
V. DISCUSIÓN	35
VI. CONCLUSIONES.....	36
VII. LITERATURA CITADA.....	37

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Comparación de la eficacia de diferentes tipos de agar, subespecies de *B. subtilis* contra diferentes microorganismos patógenos. 14

Cuadro 2. Reactivos y cantidades a usar para la elaboración de agar LB. 19

Cuadro 3. Reactivos y cantidades a usar para la elaboración de caldo LB. 21

Cuadro 4. Inhibición del crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 por parte de *B. subtilis* en diferentes tiempos de incubación. 33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 :Representación de la estructura interna y externa de E. coli.	5
Figura 2 :Observación microscópica de <i>E. coli</i> con tinción de Gram tomada en un microscopio a 100X.	6
Figura 3: Observación microscópica de <i>B. subtilis</i> en agar LB con tinción de Gram tomada en un microscopio a 100x	8
Figura 4: Representación esquemática del ciclo de desarrollo de <i>B. subtilis</i>	9
Figura 5: Mecanismos de acción de los antibióticos	11
Figura 6: Mecanismo de acción de la daptomicina.....	13
Figura 7. Fotografía tomada con la cámara THORLABS en la cual podemos observarla representación de los antibiogramas.....	14
Figura 8: Laboratorio de terapia fotodinámica dentro del INAOE	16
Figura 9 : Las instalaciones del Instituto Nacional Astrofísica, Óptica y Electrónica (INAOE).....	16
Figura 10: <i>E. coli</i> ATCC 25922 en agar azul de metileno de eosina (EMB)	18
Figura 11: <i>B. subtilis</i> en agar Man Rugosa Sharpe (MRS).....	18
Figura 12: Diagrama de representación del protocolo.....	24
Figura 13: Inicio de la aplicación ImageJ para elegir imágenes.	25
Figura 14: Fotografía de hoja milimétrica para seleccionar la escala de ImageJ.	26
Figura 15: Detalle de la selección para la configuración de escala.	26
Figura 16: Modificación de la escala en la aplicación ImageJ	27
Figura 17: Obtención de las medidas del papel filtro.....	27
Figura 18: Obtención del diámetro del halo de inhibición junto con el papel filtro.	28

Figura 19: Obtención de datos crudos..... 28

Figura 20: Crecimiento bacteriano de *B. subtilis* en agar MRS. 30

Figura 21: Observación microscópica del *B. subtilis* en agar MRS con tinción de Gram tomada en un microscopio a 100X. 30

Figura 22: Crecimiento bacteriano de *B. subtilis* en agar BHI 31

Figura 23: Observación microscópica del *B. subtilis* en agar BHI con tinción de Gram tomada en un microscopio a 100X. 31

Figura 24: Crecimiento bacteriano de *B. subtilis* en agar Soya 31

Figura 25: Observación microscópica del *B. subtilis* en agar Soya con tinción de Gram a 100X..... 31

Figura 26: Crecimiento bacteriano de *B. subtilis* en agar LB..... 32

Figura 27: Observación microscópica del *B. subtilis* en agar LB con tinción de Gram tomada en un microscopio a 100X. 32

Figura 28: Grafica con los resultados de la inhibición del crecimiento bacteriano en función del tiempo de incubación. 34

Figura 29: Observación del halo de inhibición en la prueba antagónica con *B. subtilis* a las 192 h fotografía tomada con cámara THORLABS. 34

RESUMEN

Esta investigación evaluó la capacidad antimicrobiana de metabolitos secundarios de *Bacillus subtilis* aislada de un cultivo apícola frente a *Escherichia coli*. Se seleccionó el medio de cultivo Luria-Bertani (LB) para optimizar el crecimiento y la producción de metabolitos antimicrobianos, dado que favoreció la esporulación y la formación de compuestos bioactivos. A través de pruebas de inhibición en agar, se observó que los metabolitos producidos por *B. subtilis* exhibieron actividad antimicrobiana contra *E. coli*, especialmente entre las 144 y 192 horas de incubación. Los resultados, obtenidos mediante el análisis de imágenes con ImageJ, confirmaron que la cepa de *B. subtilis* aislada del intestino de abejas tiene un potencial significativo para el biocontrol de *E. coli*. Este trabajo aporta nuevos datos sobre la producción de compuestos antimicrobianos por cepas de *B. subtilis* en ambientes especializados.

Palabras claves: *B. subtilis*, *E. coli*, antibiograma, metabolitos secundarios.

ABSTRACT

This research evaluated the antimicrobial capacity of secondary metabolites of *Bacillus subtilis* isolated from a bee culture against *Escherichia coli*. The Luria-Bertani (LB) culture medium was selected to optimize growth and production of antimicrobial metabolites, since it favored sporulation and the formation of bioactive compounds. Through inhibition tests on agar, it was monitored that the metabolites produced by *B. subtilis* exhibited antimicrobial activity against *E. coli*, especially between 144 and 192 hours of incubation. The results obtained through image analysis with ImageJ confirmed that the *B. subtilis* strain isolated from the bee intestine has significant potential for biocontrol of *E. coli*. This work provides new data on the production of antimicrobial compounds by *B. subtilis* strains in specialized environments.

Keywords: *B. subtilis*, *E. coli*, antibiogram, secondary metabolites.

I. INTRODUCCIÓN

Los antimicrobianos son medicamentos que combaten las infecciones causadas por bacterias, hongos y otros microorganismos ¹. Estos pueden actuar de diferentes maneras para inhibir o eliminar las bacterias como por: síntesis de pared celular, síntesis de proteínas, interferencia con la replicación de ADN y la síntesis de ácidos nucleicos ²⁹.

Bacillus subtilis, es un bacilo Gram positivo, el cual es conocido por su habilidad para producir una variedad de compuestos antimicrobianos, incluidos antibióticos y péptidos antimicrobianos ¹⁷, que pueden inhibir el crecimiento de patógenos como *Escherichia coli*, un bacilo Gram negativo, anaerobio predominante en la flora intestinal humana, usualmente se mantiene de forma inocua y confinado al lumen intestinal, frecuentemente asociado con infecciones alimentarias y gastroenteritis ¹⁰.

La resistencia antimicrobiana es un problema creciente para la salud pública, sobre todo en bacterias como *E. coli* que han desarrollado cierta resistencia a múltiples antibióticos, esta situación ha llevado a la búsqueda de alternativas terapéuticas efectivas ^{1.20.2}.

Los antibióticos que son producidos por *B. subtilis* son compuestos químicos producidos por esta bacteria que tienen la capacidad de inhibir bacterias patógenas, ya que interfieren con la síntesis de la pared celular bacteriana, lo que impide que la bacteria se multiplique y cause daño ⁷.

1.1 Objetivos

1.2 Objetivo general

- Evaluar la capacidad de *B. subtilis* para producir metabolitos extracelulares con la capacidad de inhibir el crecimiento de *E. coli*.

1.3 Objetivos específicos

- Seleccionar el medio de cultivo adecuado para el crecimiento de *B. subtilis* y la posible producción de metabolitos secundarios.
- Obtener el sobrenadante a partir de una fermentación de *B. subtilis*
- Evaluar la capacidad antimicrobiana de *B. subtilis* contra *E. coli* a través del tiempo con la técnica de antibiograma.

1.4 Hipótesis

Se espera que *B. subtilis* inhiba el crecimiento de *E. coli* y que esta inhibición sea mediada por la producción de compuestos antimicrobianos extracelulares.

1.5 Justificación

La resistencia a los antibióticos es un problema creciente en la salud pública, pues se refiere a la capacidad de los microorganismos para resistir los efectos de los antimicrobianos, haciéndolos ineficaces para tratar infecciones; por ello se ha convertido en un problema global que requiere una respuesta, coordinada entre profesionales de la salud, investigadores y la sociedad en general. El descubrimiento de nuevos antibióticos es demasiado lento en comparación con la habilidad que están mostrando los microorganismos para desarrollar resistencia a ellos por lo que cualquier aportación en la búsqueda de nuevos metabolitos con actividad antimicrobiana podría representar una ayuda invaluable en la lucha contra los microorganismos patógenos.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Patogenicidad de las bacterias

La patogenicidad es la capacidad de un microorganismo para causar enfermedad en un huésped. En el caso de las bacterias, la patogenicidad se refiere a su capacidad para: adherirse a las células del huésped, invadir y colonizar tejidos y órganos, producir toxinas u otros compuestos dañinos y evadir el sistema inmune del huésped ⁶.

Tienen la capacidad para causar enfermedades en los seres humanos, animales o plantas. Las bacterias patógenas son microorganismos que pueden infectar y dañar a su huésped, provocando una variedad de enfermedades, desde infecciones leves hasta condiciones graves y potencialmente mortales. Comprende el comienzo del proceso infeccioso y los mecanismos que provocan la aparición de los signos y síntomas de la enfermedad. Algunas de las características de las bacterias patógenas son la transmisibilidad, adhesión a las células, hospedadoras, persistencias, invasión de las células, tejidos hospedadores y capacidad para evadir o sobrevivir al sistema inmunitario del hospedador ⁶.

2.2 *Escherichia coli*

Es una bacteria en forma de bacilo Gram negativo, mide 1 μm de longitud por 0.35 μm de ancho (esto puede variar según el tipo de cepa), es anaerobia facultativa de la familia *Enterobacteriaceae*. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea ¹¹.

E. coli consta de tres elementos: la membrana citoplasmática, la membrana externa y, entre ambas, un espacio periplásmico constituido por péptido-glucano como se puede observar en la Figura 1. Esta última estructura confiere a la bacteria su forma, rigidez, y le permite resistir presiones osmóticas ambientales relativamente elevadas 24.

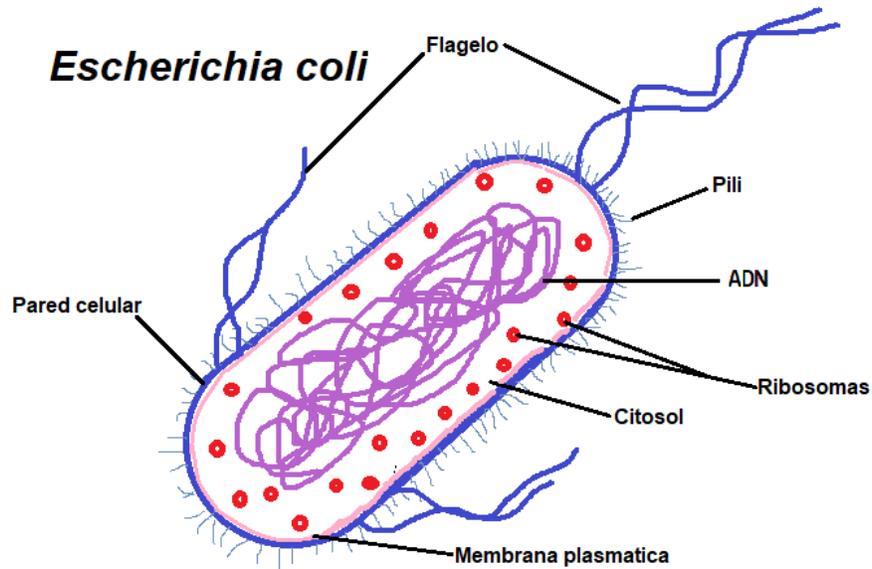


Figura 1 :Representación de la estructura interna y externa de *E. coli*.

A *E. coli* se le debe en gran medida el conocimiento de algunos de los fundamentos de la biología moderna que han merecido el reconocimiento de varios premios Nobel; pues ayudó a; revelar el funcionamiento de la replicación de ADN, en la organización y regulación de genes (operón), en la investigación del primer organismo modificado genéticamente, convirtiendo a *E. coli* en una pieza clave en biotecnología 11.

2.3 *Escherichia coli* ATCC 25922

Su clasificación taxonómica es la siguiente;

Reino: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: *Gammaproteobacteria*

Orden: *Enterobacteriales*

Familia: *Enterobacteriaceae*

Género: *Escherichia*

Especie: *E. coli*

Es una bacteria que se transmite por alimentos contaminados, asociados a la carne bovina cruda o molida (hamburguesas), leche cruda, lechuga, jugos de manzana y todo alimento que se haya contaminado con materia fecal ^{12.21}. Se observa su morfología en la Figura 2.

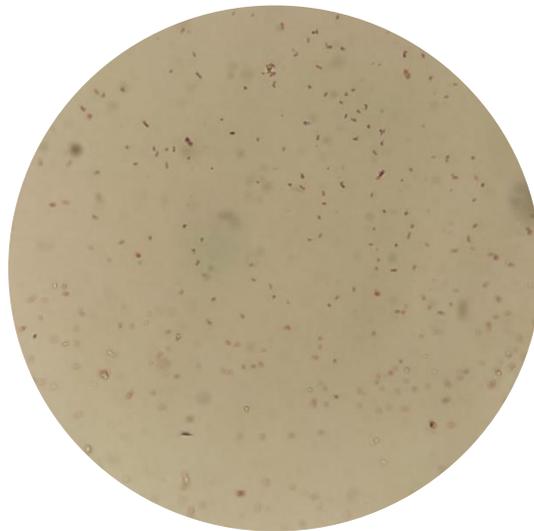


Figura 2 :Observación microscópica de *E. coli* con tinción de Gram tomada en un microscopio a 100X.

2.4 *Bacillus* spp.

El género *Bacillus*, pertenece a la familia Bacillaceae, una de las familias bacterianas con mayor actividad bioquímica dentro de las cuales se encuentra el control biológico con el uso de los productos de su metabolismo para la industria ¹⁰.

Son bacilos aerobios y anaerobios facultativos, Gram positivos, producen endosporas con morfología oval o cilíndrica como se observa en la Figura 3 y además permite restringir condiciones desfavorables en el ambiente, son móviles por la presencia de flagelos laterales, son catalasa positiva, presentando hemólisis variable y un crecimiento activo en un rango de pH entre 5.5-8.5. La propagación activa del microorganismo se produce en medios que presentan superficie húmeda ⁷.

Las células en crecimiento no tienen una propagación fácil en medios líquidos, estos microorganismos por lo general crecen mejor en agar sangre, produciendo colonias blanquecinas, grandes, extendidas e irregulares.

Dentro de las especies más representativas de este género con propiedades de antagonismos celular contra fitopatógenos encontramos a *Bacillus brevis* y *B. subtilis*.

B. subtilis fue reportado por primera vez por un botánico y microbiólogo llamado Ferdinand Cohn en 1876, quien los descubrió como una bacteria productora de endosporas resistentes al calor ³.

Su clasificación taxonómica es la siguiente ⁶; Su clasificación taxonómica⁶⁶ es la siguiente:

Reino: Bacteria

Filo: *Firmicutes*

Clase: *Bacilli*

Orden: *Bacillales*

Familia: *Bacillaceae*

Género: *Bacillus*

Especie: *B. subtilis*.

Es un microorganismo ampliamente distribuido en el ambiente que suele encontrarse en el suelo, agua dulce y salada, materia; vegetal en descomposición, desiertos y la Antártida. Igualmente *B. subtilis* se ha aislado en alimentos, incluidas las especias, cacao, legumbres, semillas, y pan. Se encuentra principalmente en suelos agrícolas, raíces de las plantas y en el tracto gastrointestinal de los animales.

Particularmente, *B. subtilis* es una especie que produce diferentes metabolitos secundarios en la forma de lipopéptidos con buena actividad antifúngica, antibacteriana y frente algunas levaduras, como consecuencia son de alto valor biotecnológico, farmacéutico y otros productos industriales 29.32.

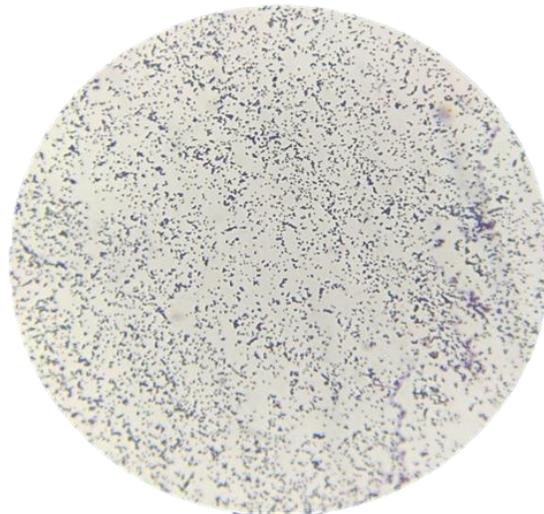


Figura 3: Observación microscópica de *B. subtilis* en agar LB con tinción de Gram tomada en un microscopio a 100x .

2.5 Ciclo de desarrollo de *Bacillus subtilis*

El desarrollo bacteriano de *B. subtilis* es dividido en dos fases el cual es el crecimiento vegetativo y la esporulación:

En el crecimiento vegetativo las células se dividen rápidamente y producen metabolitos. Sin embargo, son sensibles al calor, la desecación y a los productos químicos agresivos; en el caso de esporulación es por estar bajo estrés por estar en condiciones desfavorables lo cual forman las endosporas, que son termoestables y permiten la supervivencia de la bacteria, esto se puede observar mejor en la Figura 4 10.

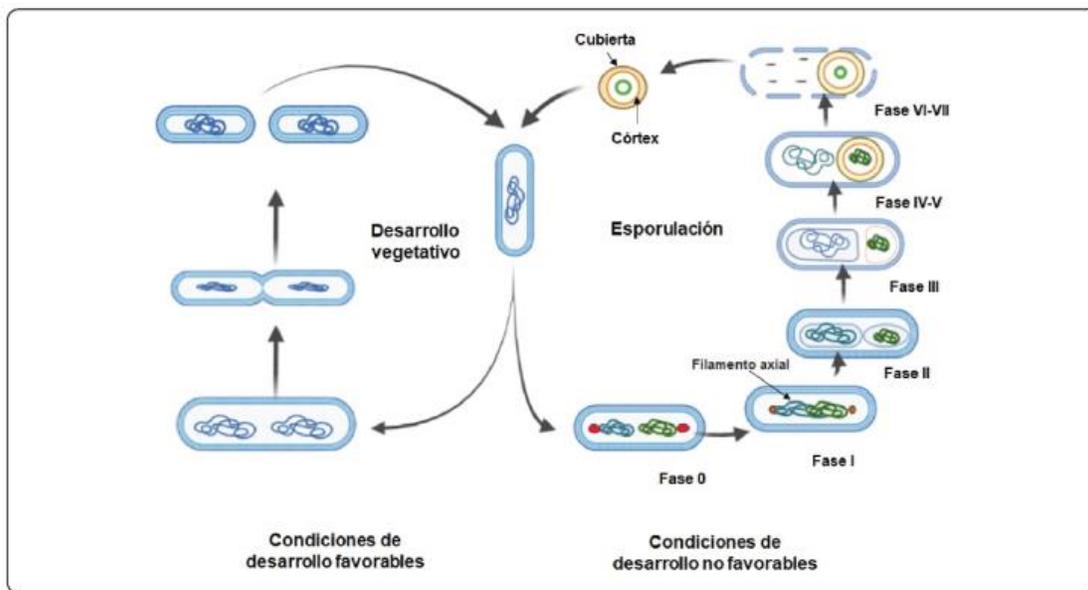


Figura 4: Representación esquemática del ciclo de desarrollo de *B. subtilis* 10.

2.6 Antibióticos

Los antibióticos son un elemento clave para combatir las enfermedades infecciosas, y desde su aparición han permitido disminuir la morbimortalidad asociada a estas patologías de forma muy significativa ¹.

En los últimos tiempos, el uso del término se ha ampliado para incluir compuestos sintéticos, como las sulfonamidas y las quinolonas, que presentan también actividad antibacteriana ^{16.28}.

Los antibióticos están conformados por diversos compuestos, a menudo se clasifican en diferentes grupos. Las múltiples clasificaciones presentan diferentes características y han sido realizadas en distintos criterios, por tal motivo es difícil determinar cuál es la idea ¹³.

2.7 Clasificación según su mecanismo de acción

Los antibióticos están conformados por diversos compuestos, y a menudo se clasifican por el mecanismo como se explica más a detalle en la Figura 5 ¹³.

- Agentes que inhiben la construcción de la pared celular bacteriana, impidiendo la formación del peptidoglicano, un componente esencial de la estructura celular (ejemplos: penicilinas, cefalosporinas, vancomicina, bacitracina y cicloserina) ¹⁴.
- Agentes que interfieren con la síntesis de proteínas en los ribosomas, impidiendo la producción de proteínas esenciales para la supervivencia bacteriana (ejemplos: aminoglucósidos, tetraciclinas, macrólidos y lincosamidas) ¹⁴.
- Agentes que afectan el metabolismo de los ácidos nucleicos, impidiendo la replicación y transcripción del ADN (ejemplos: quinolonas, rifamicinas y antivirales)¹⁴.

- Agentes antimetabolitos que bloquean la síntesis de ácido fólico, un nutriente esencial para el crecimiento bacteriano (ejemplos: sulfonamidas y trimetoprima) 14.
- Agentes que actúan directamente sobre la membrana celular, alterando su estructura y función (ejemplos: polimixina B, colistina, detergentes y antimicóticos poliénicos como nistatina y anfotericina B) 14.

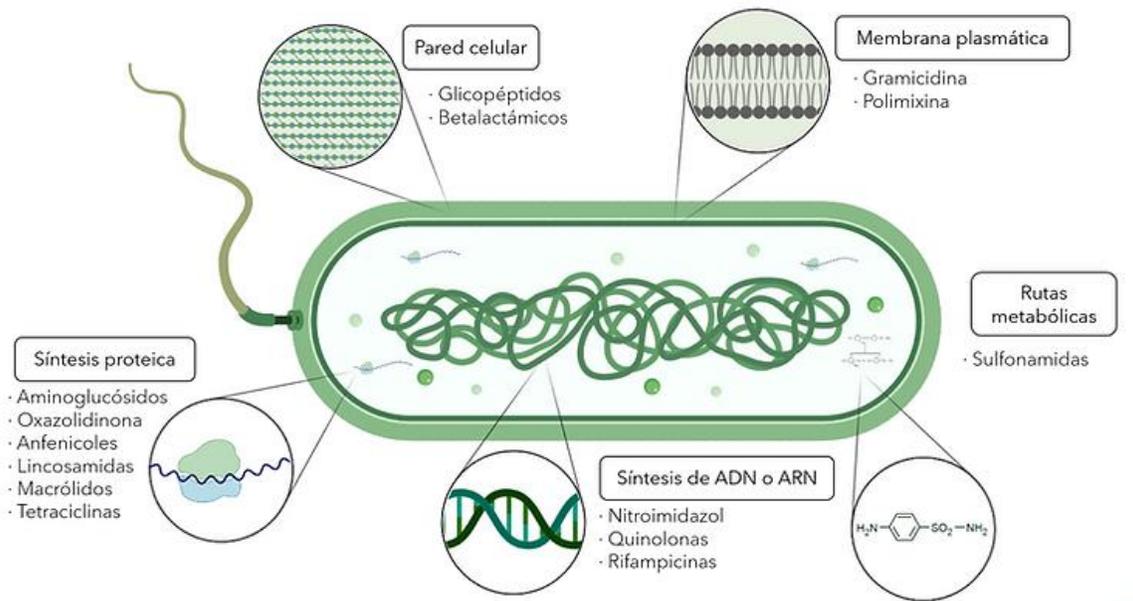


Figura 5: Mecanismos de acción de los antibióticos 13.

2.8 Metabolitos secundarios microbianos

Se define como metabolito secundario aquellos compuestos que no tienen una función reconocida en el mantenimiento de los procesos fisiológicos fundamentales de los organismos que los sintetizan, aunque estos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos entre los microorganismos y les pueden conferir ventajas adaptativas ¹⁸.

Estos compuestos no tienen una aparente importancia, sin embargo, juegan un papel ecológico importante ya que muchos de los compuestos sirven como mecanismo de defensa contra, virus, bacterias y hongos ¹⁸.

B. subtilis produce metabolitos secundarios como citoquininas, sideróforos, auxinas, antibióticos, entre otros. En cuanto a los antibióticos, *B. subtilis* es capaz de producir más de una docena de antibióticos con una gran diversidad de estructuras químicas, entre ellos surfactina, iturina A, lipopéptidos y bacillibactina ²⁹. Los cuales son capaces de controlar el crecimiento de patógenos.

2.9 Lipopéptidos

Los lipopéptidos son un tipo de bactericida que tienen un efecto inhibitorio sobre las bacterias Gram-negativas, actuando específicamente sobre la pared celular bacteriana. Su mecanismo de acción consiste en que la cola lipofílica se une a la membrana bacteriana (dependientes del calcio), lo que causa una apertura en el canal de la membrana como se observa en la Figura 6 ¹⁹.

En particular, los lipopéptidos, alteran la integridad de la membrana celular, provocando la pérdida de potasio y la despolarización de la membrana. Esto conduce a una inhibición de la síntesis de proteínas celulares y, eventualmente, a la muerte de la bacteria ^{15,19}.

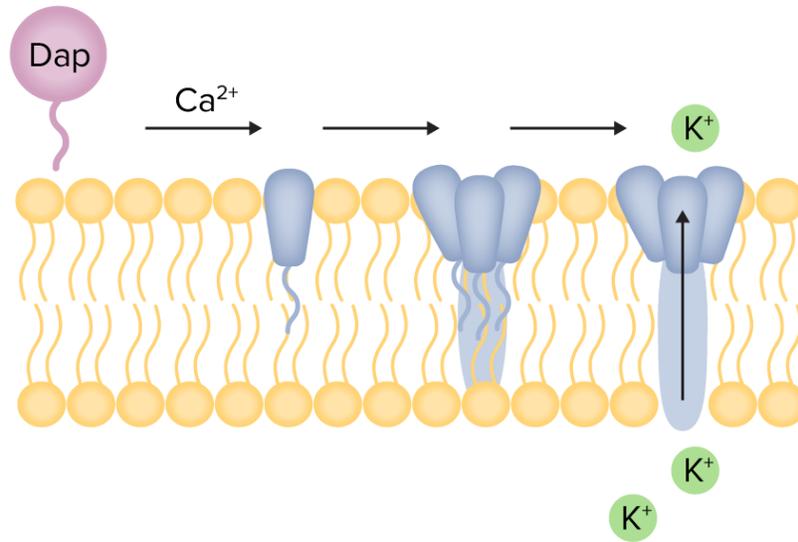


Figura 6: Mecanismo de acción de la daptomicina 15.

2.10 Antibiograma

Los antibiogramas, también conocidos como prueba de sensibilidad, son pruebas de resistencia a fármacos 22.

Se trata de un análisis fundamental para guiar el tratamiento de infecciones bacterianas o fúngicas, ya que, permiten determinar la probabilidad de que el agente antimicrobiano/fúngico sea capaz de contrarrestar el crecimiento que causa la infección, permitiendo elegir el antibiótico adecuado 22.

2.11 Método de difusión en disco

Es comúnmente usado (también conocido como prueba de Kirby-Bauer) es adecuado para los microorganismos de crecimiento rápido. Se basa en la colocación de discos impregnados con antibióticos en placas de agar inoculadas con el microorganismo que está probándose 26,28. Después de la incubación (por lo general de 16 a 18 h), se mide el

diámetro de la zona de inhibición que rodea a cada disco. La prueba de Kirby-Bauer se muestra en la Figura 7.

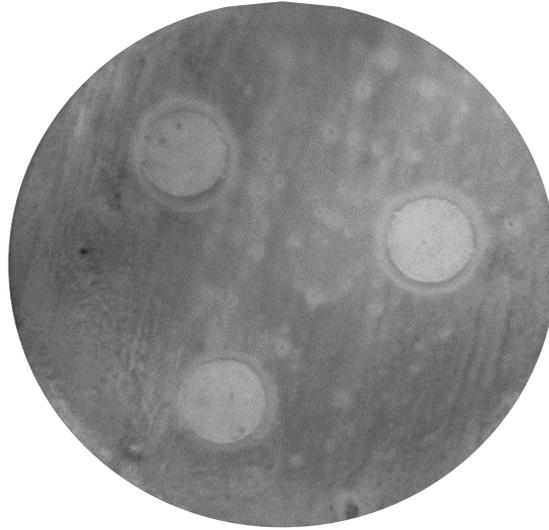


Figura 7. Fotografía tomada con la cámara THORLABS en la cual podemos observar la representación de los antibiogramas.

2.12 Estado del arte de *Bacillus*

Ya se han reportado que subespecies de *Bacillus* tienen actividad antimicrobiana contra diferentes microorganismos patógenos como se puede observar en el Cuadro 1

8.16.23.25.27.30.

Cuadro 1. Comparación de la eficacia de diferentes tipos de agar, subespecies de *B. subtilis* contra diferentes microorganismos patógenos.

Titulo	Autor y año	Antagonista	Cultivo	Agonista
Extracción e identificación de productos naturales a partir de la bacteria <i>Bacillus mycoides</i>	Yharely Herrera Nuñez (2023)	<i>mycoides</i> Aca 5 Eli 220	Caldo de cultivo LB	<i>Fusarium solani</i> , <i>Mucor</i> sp. y <i>Aspergillus flavus</i>
Extracción de dicetopiperazinas a partir de una cepa de <i>Bacillus endophyticus</i> y su síntesis orgánica	Francisco Fidel Salazar de la Luz (2016)	<i>endophyticus</i> ELI 149.	medio líquido caldo de tripticaseína de soya	<i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas</i> sp, <i>Salmonella cholerasuis</i> , <i>Serratia marcescens</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>

<p>(R)-2-etil-1-hexanol a partir de la hidrólisis del Ftalato de bis-R-(2-etilhexilo) (DEHP) aislado de <i>Bacillus megaterium</i></p>	<p>Samaria Alejandra Pérez Pérez</p>	<p><i>megaterium</i> Eli 24</p>	<p>Medio sólido Luria Bertani</p>	<p><i>Listeria monocytogenes</i>, <i>B. cereus</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Staphylococcus saprophyticus</i> y <i>Streptococcus agalactiae</i>, <i>E. coli</i>, <i>Klebsiella pneumoniae</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Salmonella</i> sp., <i>Serratia</i> sp., <i>Shigella</i> sp. y <i>Vibrio parahaemolyticus</i>.</p>
<p>Análisis del potencial antimicrobiano de compuestos producidos por <i>Bacillus velezensis</i> LEM1054 contra <i>Staphylococcus</i> spp. multidrogresistentes.</p>	<p>Jearim Betzai Tapia Rivera</p>	<p><i>B.velezensis</i> LEM1054</p>	<p>Medio liquido YM</p>	<p><i>Staphylococcus</i> spp</p>
<p>Determinación de la actividad antimicrobiana e insecticida de extractos producidos por bacterias aisladas del suelo.</p>	<p>Sierra-García, I. N., Romero-Tabarez, M., & Orduz-Peralta, S. (2017)</p>	<p><i>Bacillus</i></p>	<p>Agar Luria Bertani</p>	<p><i>Alternaria</i> sp., <i>Colletotrichum</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Pestalotia</i> sp., y <i>Verticillium</i> sp</p>
<p>Selección de cepas de <i>Bacillus</i> spp. productoras de antibióticos aisladas de frutos tropicales</p>	<p>Ragazzo-Sánchez, J. A., Robles-Cabrera, A., Lomelí-González, L., Luna-Solano, G., & Calderón-Santoyo, M. (2011).</p>	<p><i>Bacillus</i> spp.</p>	<p>Caldo LB</p>	<p><i>Colletotrichum gloeosporioides</i>, <i>Colletotrichum</i> sp., <i>Colletotrichum</i> sp.y <i>Fusarium</i> sp.</p>

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del experimento

El presente experimento se elaboró en el laboratorio de terapia fotodinámica (Figura 8), que se encuentra en las instalaciones del Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica (INAOE), como se observa en la Figura 9, cuya localización geográfica es: 19°01'53"N 98°18'55"O / 19.031488, -98.315348 y su dirección es la siguiente: Luis Enrique Erro #1, Sta María Tonanzintla, 72840 San Andrés Cholula, Puebla.



Figura 8: Laboratorio de terapia fotodinámica dentro del INAOE



Figura 9 : Las instalaciones del Instituto Nacional Astrofísica, Óptica y Electrónica (INAOE)

3.2 Equipos

- iMARK lector de placas BIO RAD
- Cámara THORLABS versión 4.82
- Incubadora Riossa Serie E-41
- Incubadora compacta con agitación LUZEREN
- Spectrafuge™ 24D Microcentrifuge Labnet C2400-230V
- **Agitador magnético con calentamiento MS-H280-Pro de DLAB**
- Balanza Analítica Serie 520 PB

3.3 Materiales

- Filtro para jeringa con membrana de nailon (poliamida) de 0.45 μm de la marca Syringe Filters
- Papel filtro Whatman
- Placa Petri de 60 x 15 mm de plástico de la marca SYM.
- Puntas para micropipetas
- Tubo Eppendorf
- Tubo Falcon
- Asa bacteriológica
- Probeta
- Vaso de precipitado
- Matraz Erlenmeyer
- Microplacas
- Mecheros de alcohol

3.4 Reactivos

- Extracto de levadura de la marca MCD LAB, No. Cat: 9031
- Peptona bacteriológica de la marca MCD LAB, No. Cat: 9221
- Agar bacteriológico de la marca MCD LAB, No. Cat: 9011
- Cloruro de sodio (NaCl) de la marca Omnicherri, No. Cat: 17581
- Agua destilada
- Phosphate Buffered Saline (PBS)

3.5 Material biológico

Se uso la cepa de *B. subtilis* (Figura 10) la cual fue donada por el Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada (CIBA) – IPN Tlaxcala, esta fue obtenida de un cultivo apícola. La cepa de *E. coli* ATCC 25922 (Figura 11).



Figura 10: *E. coli* ATCC 25922 en agar azul de metileno de eosina (EMB)



Figura 11: *B. subtilis* en agar Man Rugosa Sharpe (MRS).

3.6 Protocolo para la selección de agar

- 1) Preparar los diferentes tipos de agar: Man Rugosa Sharpe (MRS), Brain Heart Infusion (BHI), Caldo Soya Trypticaseina (soya) y Luria-Bertani (LB), según las instrucciones del fabricante.
- 2) Inocular el microorganismo (*B. subtilis*) en cada tipo de agar
- 3) Incubar los agares inoculados a una temperatura de 37°C por 48 h para el crecimiento del microorganismo.
- 4) Observar y registrar el crecimiento de los microorganismos en cada tipo de agar después del periodo de incubación determinado anteriormente.
- 5) Analizar los resultados para determinar cuál es el agar más adecuado para el crecimiento de los microorganismos.

3.7 Protocolo sobre la elaboración agar Luria Bertani

- 1) Hacer los cálculos para determinar cuánto se va a necesitar, dependiendo del experimento, sus repeticiones y cuanto se utilizaría a la semana.
- 2) Pesar los reactivos para preparar medio Luria Bertani (LB) para ello se usan los reactivos que se encuentran en la Cuadro 2. (tomar en cuenta que las cantidades son para 1 L de agua destilada), por lo que dependiendo del volumen a preparar se pesa el equivalente de cada reactivo.

Cuadro 2.Reactivos y cantidades a usar para la elaboración de agar LB.

Reactivo	Cantidad
Extracto de levadura	5 g

Peptona	10 g
Cloruro de sodio	10 g
Agar Bacteriológico	25 g

- 3) Colocar los reactivos en un matraz con el volumen de agua destilada correspondiente.
- 4) Colocar el matraz Erlenmeyer en una parrilla eléctrica con un magneto para agitar lentamente, hasta homogenizar y dejar hervir por 1 minuto.
- 5) Colocar un pedazo de papel aluminio lo suficientemente grande para tapar la boca del matraz Erlenmeyer.
- 6) Llevar el matraz Erlenmeyer a la autoclave para poder esterilizarla por 15 min a 121°C
- 7) Dejar enfriar el medio y vertir en las placas Petri estériles por la técnica de torre.

3.8 Protocolo sobre la elaboración del caldo Luria Bertani

- 1) Hacer los cálculos para determinar cuánto se va a necesitar, dependiendo del experimento, sus repeticiones y cuanto se utilizaría a la semana.
- 2) Pesar los reactivos para preparar el caldo LB para ello se usan los reactivos que se encuentran en la Cuadro 3 (tomar en cuenta que estas cantidades son para 1 L de agua destilada), por lo que dependiendo del volumen a preparar se pesa el equivalente de cada reactivo.

Cuadro 3.Reactivos y cantidades a usar para la elaboración de caldo LB.

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

- 3) Colocar los reactivos en un Frasco para laboratorio graduados con rosca Deutsches Institut für Normung, tapa a rosca y anillo de vertido de polipropileno en color azul con el volumen de agua destilada correspondiente.
- 4) Llevar el frasco a la autoclave para poder esterilizarla por 15 min a 121°C
- 5) Dejar enfriar el medio y vertir en Tubos Falcon de 15 ml.

3.9 Protocolo sobre prueba inhibidora de sobrenadante de *B. subtilis* en medio de cultivo LB contra *E. coli*.

- 1) Descongelar los microorganismos (*B. subtilis* y *E. coli*) y sembrar en una placa con agar LB para activar los microorganismos, para esto es necesario hacer de 2 a 3 paces.
- 2) Sembrar en una placa Petri *B. subtilis* para ello tomar una muestra de *B. subtilis* activo con un asa bacteriológica.
- 3) Estriar de forma masiva en la placa con agar LB e incubar por 24 h a 30°C.

- 4) Resuspender el estriado de *B. subtilis*, esto se realizó colocando en la caja Petri 4 ml de solución salina amortiguadora de fosfato (PBS). Con un asa bacteriológica se raspó con cuidado la caja Petri para levantar el microorganismo y situar en un frasco falcón a esta solución concentrada del microorganismo con PBS el cual se le llamó solución stock.
- 5) Agregar 50 μ L de solución stock en tres pocillos diferentes de una microplaca y realizar una lectura a 595 nm para obtener una Densidad Óptica (DO) de 1 en 1 ml para *B. subtilis*.
- 6) En un Tubo Falcon de 15 ml, agregar 9 ml del caldo nutritivo LB y añadir 1 ml de la solución stock de *B. subtilis* a una DO de 1.
- 7) Colocar el tubo Falcon en la incubadora por 48 h a 37°C (Este es el fermentado).
- 8) Sembrar en una placa Petri *E. coli* para ello tomar una muestra de *E. coli* activo con un asa bacteriológica.
- 9) Estriar de forma cruzada en la placa con agar LB e incubar por 24 h a 30°C.
- 10) Añadir 500 μ L de PBS en un tubo Eppendorf.
- 11) Tomar una a dos colonias de *E. coli* aisladas con un asa bacteriológica y agregarlo al tubo Eppendorf este será la solución stock para *E. coli*.
- 12) Agregar 50 μ L de solución stock de *E. coli* en tres pocillos diferentes de una microplaca y realizar una lectura a 595 nm para obtener una DO de 0.1.
- 13) Tomar 500 μ L del caldo fermentado por *B. subtilis* ya cumplidas las 48 h de incubación y agregarlo en un tubo Eppendorf.
- 14) Centrifugar a 6800 rpm/10 min para recuperar el sobrenadante y filtrarlo empleando un filtro para jeringa para que el sobrenadante quede libre de células.

- 15) Colocar el filtrado en otro tubo Eppendorf esterilizado.
- 16) Sembrar *E. coli* que tiene DO de 0.1 en agar LB y estriar de forma masiva.
- 17) Tomar 8 μ L del sobrenadante con una micropipeta y agregarla a un disco de papel filtro.
- 18) Añadir el papel filtro con el sobrenadante en la caja Petri que ya contiene el patógeno *E. coli*; se colocaron 3 discos descritos anteriormente por cada caja.
- 19) Colocar las cajas Petri con los patógenos en la incubadora a 30°C durante 48 h para observar y medir el halo de inhibición que se formó por la acción del sobrenadante.
- 20) Repetir los pasos 8 en adelante cada 48 h para evaluar la producción de posibles metabolitos antimicrobianos como se observa en la Figura 12 hasta llegar a las 336 h.
- 21) Sembrar *E. coli* en agar LB en estriado cruzado e incubar a 37°C durante 48 h para mantenimiento de la cepa durante el experimento.

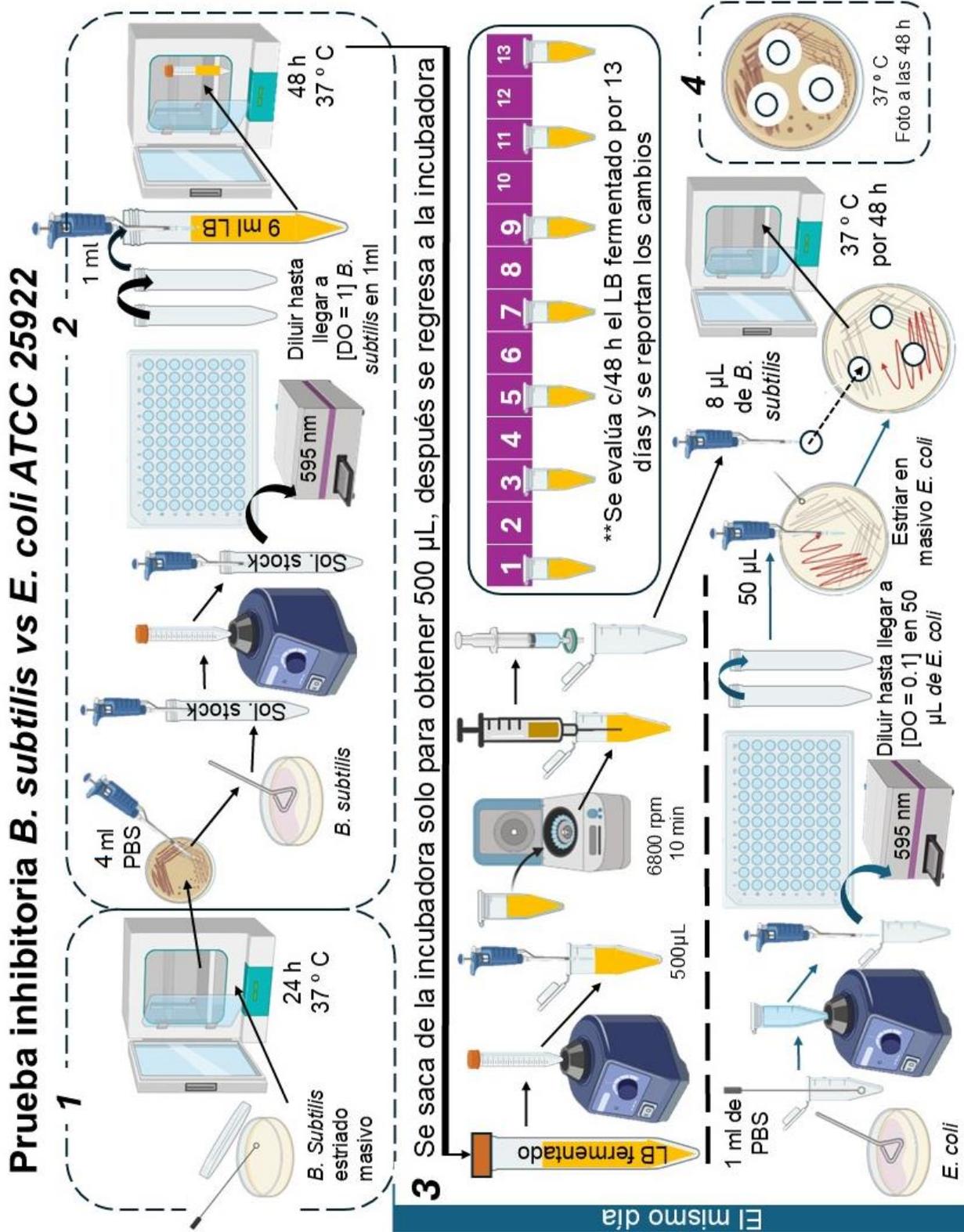


Figura 12: Diagrama de representación del protocolo.

3.10 Protocolo para la toma de imágenes

- 1) Esperar a que pasen las 48 h para dejar crecer el halo de inhibición.
- 2) Colocar la placa Petri en el arreglo para tomar las fotografías (es importante quitarle la tapa de la caja Petri para que se vean mejor las fotografías).
- 3) Tomar las fotos con la cámara THORLABS versión 4.82
- 4) Distanciar la cámara del arreglo a 30 cm aproximadamente.
- 5) Tomar varias fotos en contraluz y contrapicado, esto para que al momento de hacer el análisis de datos fuera más sencillo.
- 6) Tomar una foto de una hoja milimétrica (será la escala para el análisis de datos).

3.11 Protocolo para el análisis de imágenes con ImageJ

- 1) Descargar la aplicación de ImageJ en la computadora.
- 2) Abrir la aplicación, seleccionar FILE y OPEN Ctrl+O como se ve en la Figura 13 (Esto para elegir primero la escala)

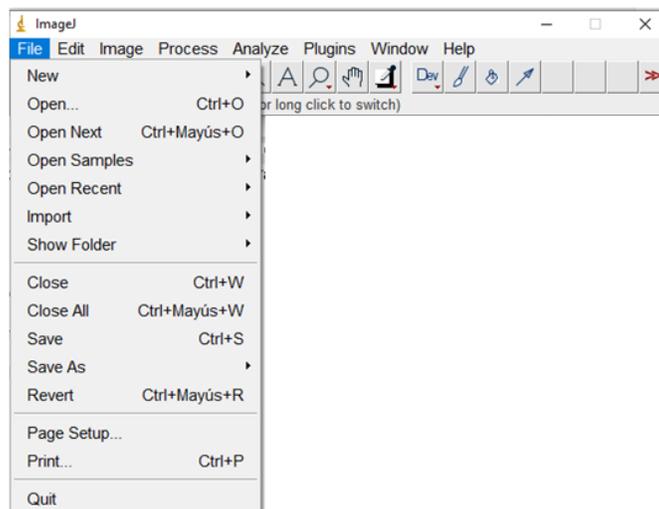


Figura 13: Inicio de la aplicación ImageJ para elegir imágenes.

Evaluación de la capacidad antimicrobiana de *Bacillus subtilis* contra la cepa *Escherichia coli*

- 3) Obtener la fotografía de una hoja milimétrica, seleccionar “/” y tomar uno de los cuadros de la hoja milimétrica como se observa en la Figura 14.

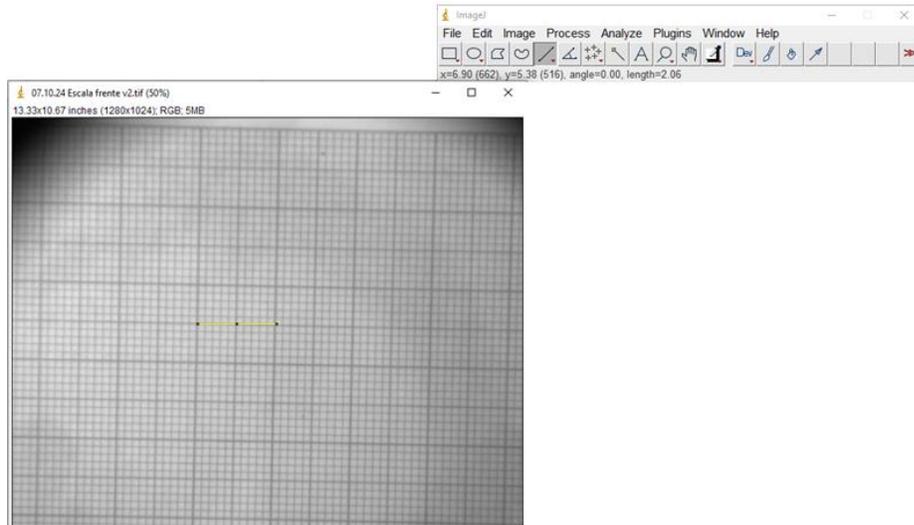


Figura 14: Fotografía de hoja milimétrica para seleccionar la escala de ImageJ.

- 4) Seleccionar ANALIZE y luego SET SCALE como se muestra en la Figura 15.

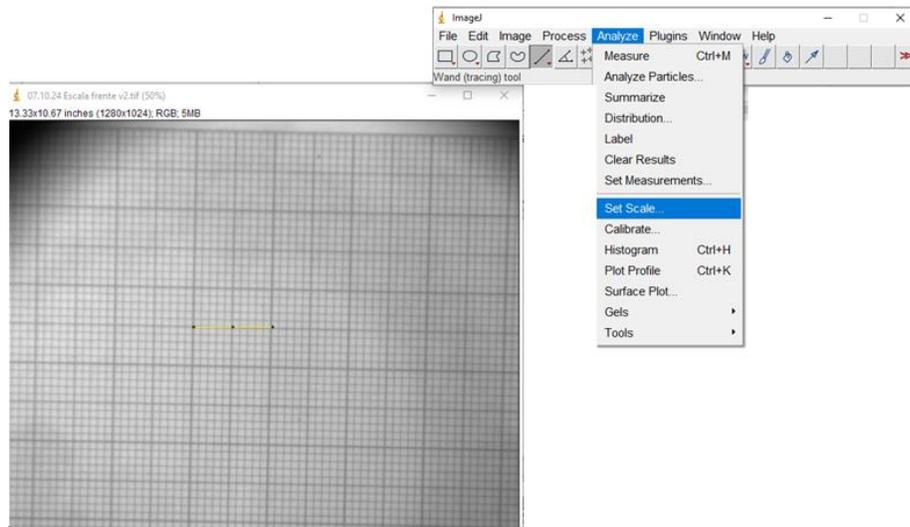


Figura 15: Detalle de la selección para la configuración de escala.

- 5) Seleccionar en la venta KNOWN DISTANCE y modificar como en la Figura 16 y seleccionar OK para configurar la aplicación de ImageJ.

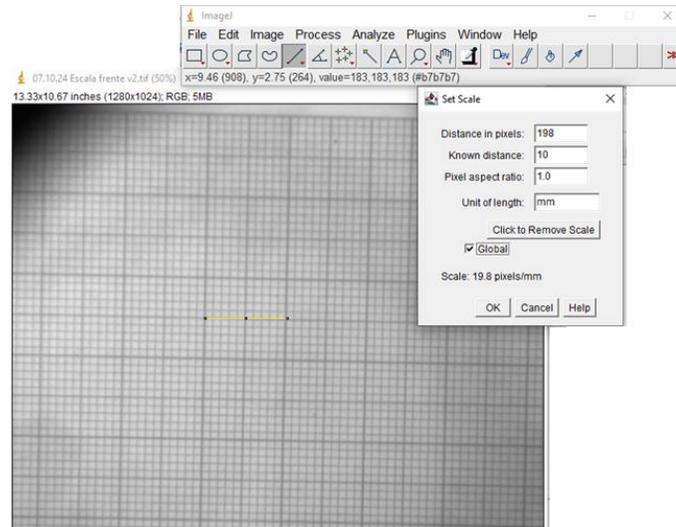


Figura 16: Modificación de la escala en la aplicación ImageJ

- 6) Seleccionar los elementos que se encuentran en la Figura 13 (para ir eligiendo las imágenes de las placas Petri).
- 7) Tomar las medidas del diámetro para papel filtro es importante capturar las medidas de 4 puntos diferentes como se ve en la Figura 17.

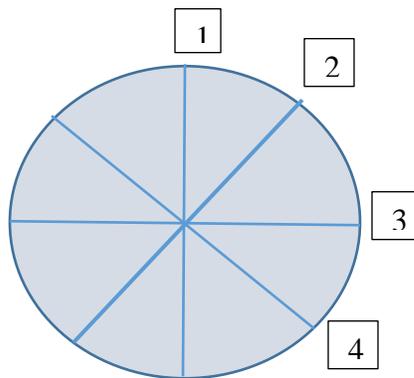


Figura 17: Obtención de las medidas del papel filtro.

- 8) Tomar las medidas del diámetro para el halo de inhibición es importante capturar las medidas de 4 puntos diferentes como se ve en la Figura 18.

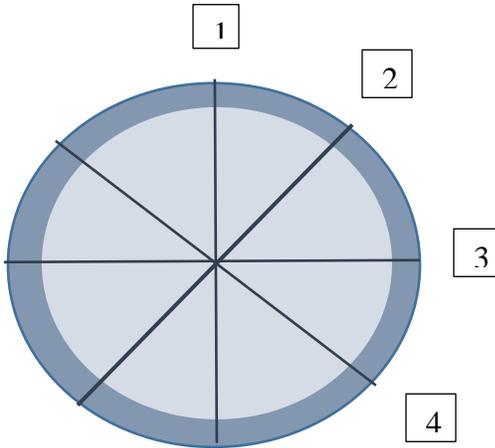


Figura 18: Obtención del diámetro del halo de inhibición junto con el papel filtro.

- 9) Realizar los pasos 7 y 8 en cada uno del papel filtro y para poder guardarlo seleccionar ctrl+M en el teclado y aparecerá una pestaña con las medias que se obtuvieron como se observa en la imagen 19.

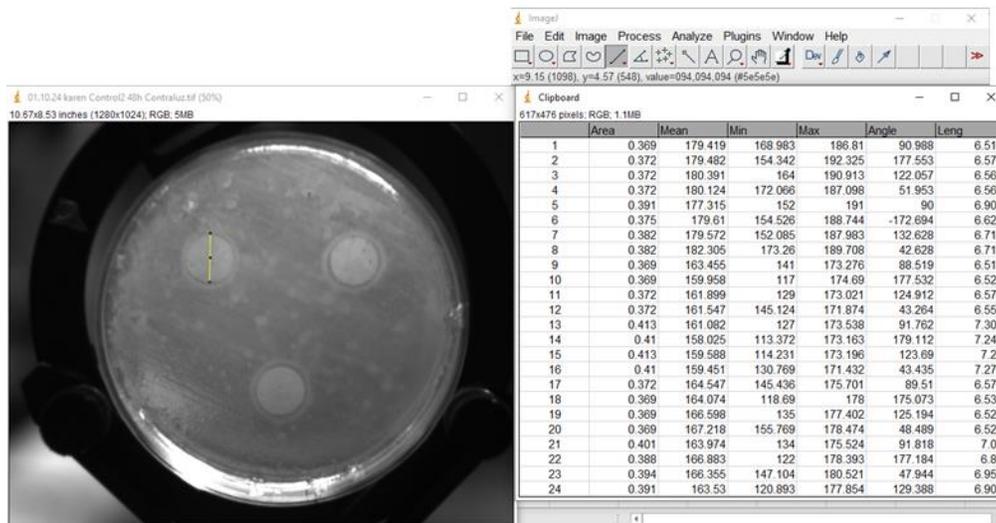


Figura 19: Obtención de datos crudos.

3.12 Protocolo para la obtención de datos

- 1) Obtener los diámetros con ImageJ; $D = X$
- 2) Adquirir el radio a partir del diámetro obtenido; $r = \frac{D}{2}$
- 3) Realizar los pasos 1 y 2 con el diámetro del filtro de papel y el halo de inhibición.
- 4) Conseguir el área del filtro de papel y el halo de inhibición $A = \pi * r^2$.
- 5) Obtener solo el área el halo con la resta del área del papel filtro menos el halo de inhibición junto con el papel filtro y así obtener los resultados que se muestran en la Cuadro 4.

IV. RESULTADOS

4.1 Criterios de selección de agar LB

Para la selección del medio agaroso se realizó una comparación con cuatro agares diferentes, los cuales fueron MRS, BHI, Soya y LB; y para determinar cuál era el mejor medio para este experimento, se tomó en cuenta el crecimiento microbiano, la pureza de la colonia, la facilidad de su manipulación y comportamiento del microorganismo.

Con MRS se observó un crecimiento rápido y abundante, tanto en la placa Petri como se ve en la Figura 20, como de manera microscópica, como se ve en la Figura 21.



Figura 20: Crecimiento bacteriano de *B. subtilis* en agar MRS.

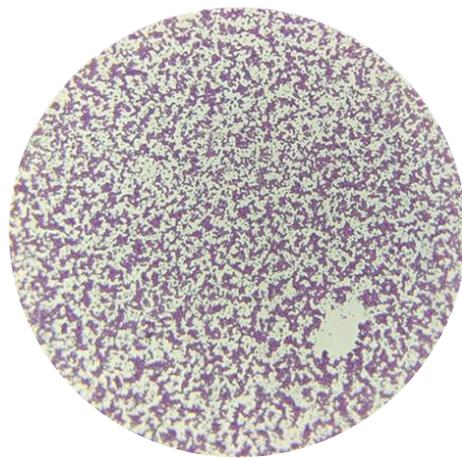


Figura 21: Observación microscópica del *B. subtilis* en agar MRS con tinción de Gram tomada en un microscopio a 100X.

Con el medio de cultivo BHI, *B. subtilis* mostró una morfología macroscópica muy buena con abundante crecimiento (Figura 22) que se pudo confirmar microscópicamente con una gran cantidad de bastones (Figura 23). Este medio fue visiblemente el que permitió un mejor crecimiento de la bacteria.



Figura 22: Crecimiento bacteriano de *B. subtilis* en agar BHI

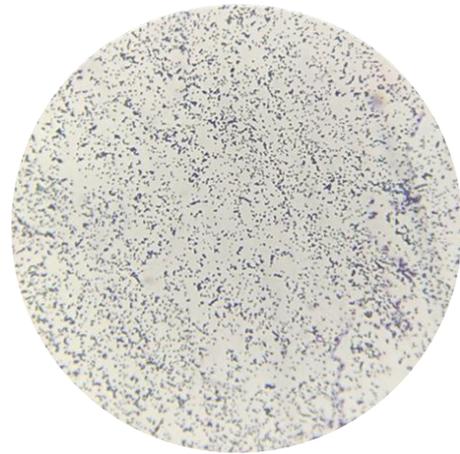


Figura 23: Observación microscópica del *B. subtilis* en agar BHI con tinción de Gram tomada en un microscopio a 100X.

Empleando el agar de Soya pudimos observar, como se muestra en la Figura 24, que hubo crecimiento. Sin embargo, sí hay colonias aisladas, por lo que el medio fue más restrictivo en comparación a los anteriores. Las micrografías, también mostraron un crecimiento con menor número de bastones y más de estructuras circulares (Figura 25).



Figura 24: Crecimiento bacteriano de *B. subtilis* en agar Soya

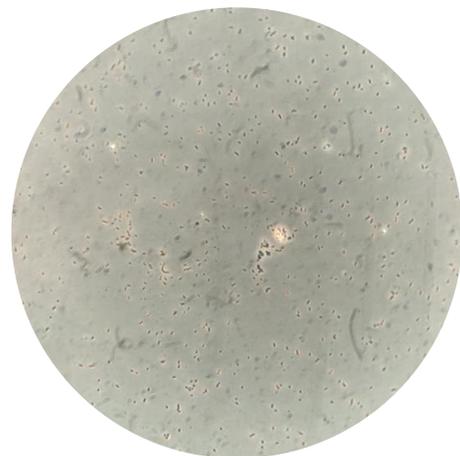


Figura 25: Observación microscópica del *B. subtilis* en agar Soya con tinción de Gram a 100X

Finalmente, el crecimiento de *B. subtilis* en el medio de cultivo LB fue relativamente bueno pero limitado, observándose colonias aisladas, como se observa en la Figura 26, en cuanto a su crecimiento microscópico Figura 27 podemos observar que tienen mayoritariamente formas circulares, es decir, el crecimiento está predominantemente en la etapa de esporulación. Dado que el objetivo de este trabajo es encontrar posibles nuevos metabolitos secundarios antimicrobianos, y sabiendo que los medios pobres o restrictivos inducen con mayor facilidad la producción de esporas y de metabolitos secundarios se seleccionó al medio de cultivo LB como el adecuado para los experimentos siguientes.



Figura 26: Crecimiento bacteriano de *B. subtilis* en agar LB

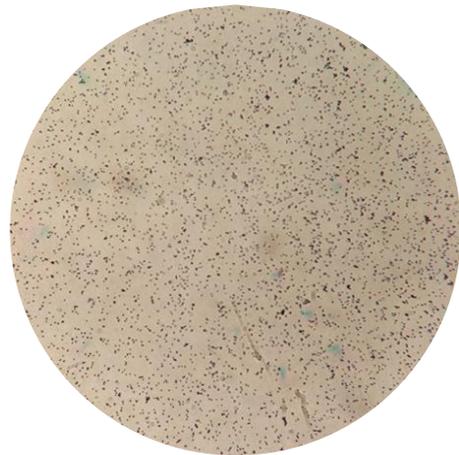


Figura 27: Observación microscópica del *B. subtilis* en agar LB con tinción de Gram tomada en un microscopio a 100X.

4.2 Análisis de la inhibición del fermentado de *B. subtilis*

En este estudio se analizaron los halos de inhibición de *B. subtilis*, en diferentes tiempos hasta llegar a las 336 h y se logró observar que, efectivamente la cepa de *B. subtilis* estudiada produjo metabolitos secundarios extracelulares con actividad inhibitoria sobre *E. coli*.

Cuadro 4. Inhibición del crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 por parte de *B. subtilis* en diferentes tiempos de incubación.

Prueba inhibitoria de <i>B. subtilis</i>							
Horas	48	96	144	192	240	288	336
Promedio (mm ²)	1.92	2.97	4.77	5.06	1.61	1.66	0.55
Desviación estándar	0.46	0.51	3.03	2.64	0.19	0.36	0.11
Error	0.27	0.29	1.75	1.52	0.11	0.21	0.06

En la Cuadro 4 se encuentran los datos del área de los halos de inhibición, que muestran la cinética de producción de metabolitos secundarios de *B. subtilis* con actividad inhibitoria sobre el crecimiento de *E. coli*. A partir de las 96 h de incubación se empieza a notar el efecto inhibitorio, aunque la mejor producción se observó entre las 144 y 192 h. Y a partir de las 240 h la producción es decreciente (Figura 28 y Figura 29).

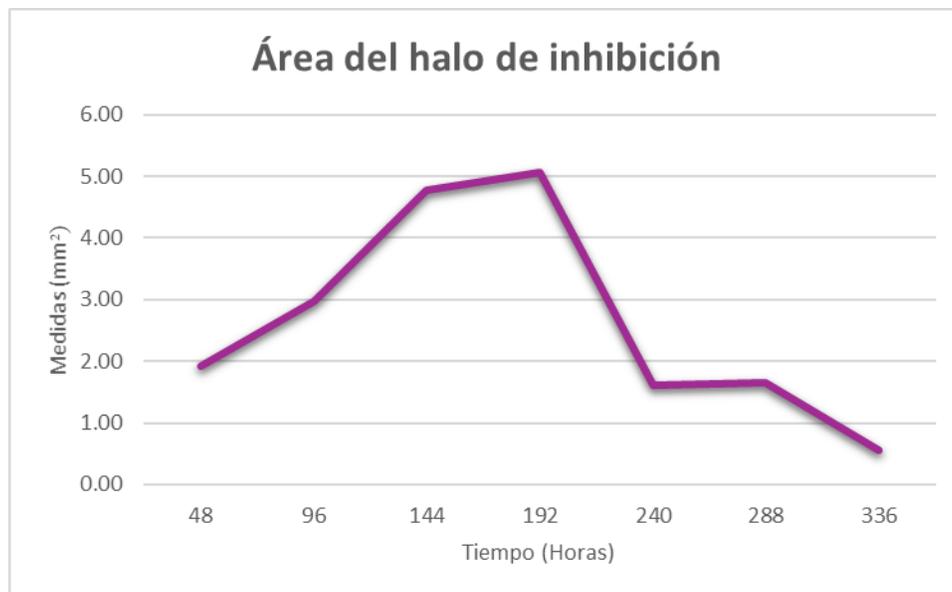


Figura 28: Grafica con los resultados de la inhibición del crecimiento bacteriano en función del tiempo de incubación.

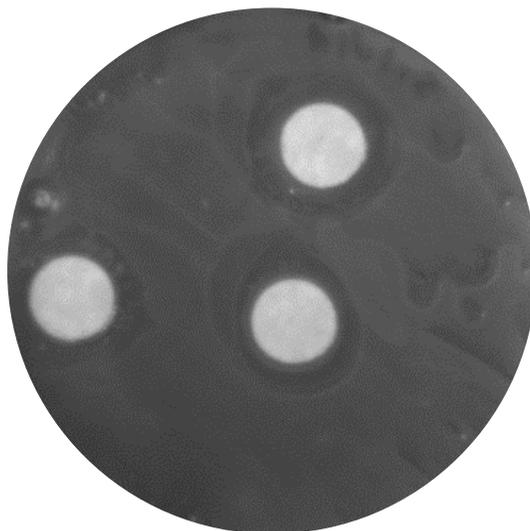


Figura 29: Observación del halo de inhibición en la prueba antagonica con *B. subtilis* a las 192 h fotografía tomada con cámara THORLABS.

V. DISCUSIÓN

La selección del medio LB para las pruebas antagónicas se realizó basado en el hecho de que los medios de cultivo más nutritivamente restrictivos inducen mejor la formación de metabolitos secundarios como ya ha sido descrita por Volpon en 2008 ³³, así como la esporulación, la cual está relacionada con la supervivencia, en 2010 Calvo P. y Zuñiga D. trabajaron con cepas de *Bacillus* spp. Aisladas de la rizosfera de papa, ellas usaron agar Triptona Glucosa Extracto de levadura con el cual *B. subtilis* a temperaturas bajas tuvieron modificaciones estructurales induciendo a factores de transcripción involucrando el proceso de esporulación, lo que favorece en el proceso de adaptación ⁵. Dado que el medio LB indujo un crecimiento microscópico alto en esporas, se esperaba que fuera el más adecuado en la producción de metabolitos secundarios.

Estos resultados son confortantes si se toma en cuenta los resultados obtenidos por Herrera Y. en 2023, Pérez S, Romero-Tabarez, M., & Orduz-Peralta, S. (2017) y Ragazzo J, Robles A. y Luna G. en 2011 ^{8.23.27}. Quienes usaron el mismo agar para cultivar *Bacillus* spp aunque estos estudios también usaron agar LB, es importante destacar que la elección de este medio de cultivo se basó en la literatura científica y en la experiencia previa en el laboratorio.

La capacidad inhibitoria *Bacillus*, se probó frente a *E. coli* obteniendo halos de inhibición de hasta 4.7 mm² (Figura 29). Estos resultados son alentadores considerando resultados similares por Ragazzo J, Robles A. y Luna G. en 2011, quienes obtuvieron halos de hasta 26 ± 0.3 mm al utilizar 50 cepas distintas de *Bacillus* las cuales fueron extraídas de frutas tropicales para control biológico en enfermedades pre y postcosecha de las cuales 23 presentaron esporulación a las 96 h ²³.

La producción de compuestos antimicrobianos ya ha sido ampliamente descrita para cepas de *Bacillus*, siendo los antibióticos de naturaleza lipopeptídica los más estudiados. Herrera Y. en 2023 reportó la producción de lipopéptidos por cepas de *B. subtilis* como la manifestación de competitividad por espacio y nutrientes ⁸.

En 2017 Sierra I, Romer M. & Orduz S. estudiaron a *B. subtilis* el cual demostró que puede reducir significativamente la población de *E. coli* en cultivos mixtos, lo que sugiere que estos metabolitos pueden ser utilizados como agentes de biocontrol ²⁷. Sin embargo, la efectividad puede variar según factores como la concentración de metabolitos, el medio de cultivo y las cepas específicas de ambos microorganismos. La investigación continua en este ámbito, busca optimizar estas interacciones y explorar aplicaciones prácticas. Por lo que el presente trabajo aporta conocimiento nuevo sobre la capacidad antimicrobiana de cepas de *B. subtilis* aisladas de ambientes especiales como el intestino de abejas.

VI. CONCLUSIONES

Se seleccionó un medio de cultivo para el crecimiento de *B. subtilis*, lo que permitió optimizar las condiciones para la producción de compuestos antimicrobianos.

La cepa de *B. subtilis* proveniente de intestino de abeja mostró capacidad para producir metabolitos secundarios extracelulares con actividad antimicrobiana en el crecimiento de *E. coli*.

VII. LITERATURA CITADA.

1. Alvo, A., V., G, V. T., M, C. S., & C, A. F. (2016). Conceptos básicos para el uso racional de antibióticos en otorrinolaringología. *Revista de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello*, 76(1), 136-147. <https://doi.org/10.4067/s0718-48162016000100019>
2. Andrea, N. A. A., Daniela, N. o. I., Carolina, N. S. S., Fernando, N. V., & José, N. V. A. (2022). Determinación de la actividad de ceftolozane/tazobactam en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Ecuatoriana de Ciencia Tecnología E Innovación En Salud Pública*, 9-18. <https://doi.org/10.31790/inspilip.v6i1.263>
3. Akinsemolu, A. A., Onyeaka, H., Odion, S. & Adebajo, I. (2024). Exploring *Bacillus subtilis*: Ecology, biotechnological applications, and future prospects. *Journal of Basic Microbiolog.*
4. Benítez, E. M. S., & Pérez, M. Q. L. (2019). Terapia antibacteriana: origen y evolución en el tiempo. *Revista Médica Electrónica*, 41(5), 1300-1308. <http://scielo.sld.cu/pdf/rme/v41n5/1684-1824-rme-41-05-1300.pdf>
5. Calvo, P., & Zúñiga, D. (2010). CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE CEPAS de *Bacillus* spp. AISLADAS DE LA RIZÓSFERA DE PAPA (*Solanum tuberosum*). *Ecología Aplicada*, 9(1-2), 31. <https://doi.org/10.21704/rea.v9i1-2.393>
6. Earl, A. M., Losick, R. & Kolter, R. (2008). Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*, 16, 269c275. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2008.03.004>
7. Cárdenas-Perea, M. E., López, O. R. C. Y., Gándara-Ramírez, J. L., & Pérez-Hernández, M. A. (2014). Factores de virulencia bacteriana: la. Elementos BUAP. <http://elementos.buap.mx/num94/htm/35.htm>

8. Herrera Núñez, Y. (2023). Extracción e identificación de productos naturales a partir de la bacteria *Bacillus mycoides*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla <https://hdl.handle.net/20.500.12371/19391>
9. Giraldo-Hoyos, N. (2021). Historia de la penicilina: más allá de los héroes, una construcción social. *IATREIA*, 34(2), 172-179. <https://doi.org/10.17533/udea.iatreina.79>
10. González-León, y; Ortega-Bernal. J; Anducho-Reyes, M. A & Mercado Flores, Y. (2002). *Bacillus subtilis* y *Trichoderma*: Características generales y su aplicación en la agricultura. *Deled Jornal*, 25. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2022.520>
11. Guadalupe, R. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. DOAJ (DOAJ: Directory Of Open Access Journals). <https://doaj.org/article/9ffb61d2311f42e6aeb3c41015243efc>
12. J, V. P., & SM, F. C. (2008). Síndrome hemolítico urémico asociado a infección intestinal por *Escherichia coli* productora de shigatoxina (STEC) en pacientes chilenos: aspectos clínicos y epidemiológicos. *Revista Chilena de Infectología*, 25(6). <https://doi.org/10.4067/s0716-10182008000600003>
13. Jiménez A, González C, González A y Iglesias L. (2021). Antibióticos según diana de acción. El descubrimiento del siglo. <https://microbiologysociety.org/>.
14. Macias B. C., & García, M. M. (1998). Antibacterianos de acción sistémica: Parte I. Antibióticos betalactámicos. DOAJ (DOAJ: Directory Of Open Access Journals). <https://doaj.org/article/896e36e3de334ef99dc0d96b37e24238>

15. Oiseth S, Jones J, Maza E. (2022). Mecanismo de acción de la dapotomicina. Imagen por Lecturio <https://www.lecturio.com/es/concepts/lipopeptidos-y-lipoglucopeptidos/>
16. Pérez S. (2023). (R)-2-etil-1-hexanol a partir de la hidrólisis del Ftalato de bis-R-(2-etilhexilo) (DEHP) aislado de *Bacillus megaterium*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. <https://repositorioinstitucional.buap.mx/server/api/core/bitstreams/bc3249d9-bedb-44c9-abf8-c67f3c09ac68/content>
17. Paredes, F., & Roca, J. J. (2004). Acción de los antibióticos: perspectiva de la medicación antimicrobiana. *Offarm: Farmacia y Sociedad*, 23(3), 116-124. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5325104>
18. Pérez A, Jiménez E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Bioteología Vegetal*. 11(4).195-211. ISSN 2074-8647.
19. Pirri, G., Giuliani, A., Nicoletto, S., Pizzuto, L., & Rinaldi, A. (2009). Lipopeptides as anti-infectives: a practical perspective. *Open Life Sciences*, 4(3), 258-273. <https://doi.org/10.2478/s11535-009-0031-3>
20. Quimioterapia antimicrobiana. En: Jawetz E, Melnick JL, Alderberg EA. *Manual de Microbiología Médica*, 12a ed. México DF: El Manual Moderno, 1988:110-35.
21. Quino, W., Mestanza, O., Caro-Castro, J., Hurtado, C. V., & Gavilán, R. G. (2020). Resistoma y genómica comparativa de aislados clínicos de *Escherichia coli* diarreogénica en Lima, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 37(4), 705-710. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2020.374.5240>

22. Rafael, C., Hernández, N., & Soto, L. D. (2013). Lectura interpretada del antibiograma Construed reading of the antibiogram. Revista de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello. <http://scielo.sld.cu/pdf/mil/v42n4/mil12413.pdf>
23. Ragazzo-Sánchez, J. A., Robles-Cabrera, A., Lomelí-González, L., Luna-Solano, G., & Calderón-Santoyo, M. (2011). Selección de cepas de *Bacillus* spp. productoras de antibióticos aisladas de frutos tropicales. Revista Chapingo. Serie Horticultura, 17(1), 5-11. <https://www.redalyc.org/pdf/609/60920104001.pdf>
24. Rodríguez-Angeles, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Pública de México, 44(5). <https://doi.org/10.1590/s0036-36342002000500011>
25. Salazar de la Luz, F. (2016). Extracción de dicetopiperazinas a partir de una cepa de *Bacillus endophyticus* y su síntesis orgánica. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla <https://hdl.handle.net/20.500.12371/2299>
26. Sande MA, Kapusnik-Uner JE, Mandell GL. Agentes antimicrobianos. Consideraciones generales. En: Goodman A, Rall TW, Nies AS, Taylor P. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 8a ed. Parte XI, Capítulo 44. México DF: Editorial Médica Panamericana, 1993: part 11, cap 44:991-1017.
27. Sierra-García, I. N., Romero-Tabarez, M., & Orduz-Peralta, S. (2017). Determinación de la actividad antimicrobiana e insecticida de extractos producidos por bacterias aisladas de suelo. *Deleted Journal*, 34(96), 5-19. <https://doi.org/10.17533/96>.

28. Stark, M., Liu, L., & Deber, C. M. (2002). Cationic Hydrophobic Peptides with Antimicrobial Activity. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 46(11), 3585-3590. <https://doi.org/10.1128/aac.46.11.3585-3590.2002>
29. Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular microbiology*, 56(4): 845-857. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587>
30. Tapia Rivera, J. (2024). Análisis del potencial antimicrobiano de compuestos producidos por *Bacillus velezensis* LEM1054 contra *Staphylococcus* spp. multidrogorresistentes. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla <https://hdl.handle.net/20.500.12371/20919>
31. Vanegas-Múnera, J. M., & Jiménez-Quiceno, J. N. (2020). Resistencia antimicrobiana en el siglo XXI: ¿hacia una era postantibiótica? *Revista de la Escuela Nacional de Salud Pública*, 38(1), 1-6. <https://doi.org/10.17533/udea.rfnsp.v38n1e337759>
32. Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & De los Santos-Villalobos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología*. (En Línea)/*Revista Mexicana de Fitopatología*, 36(1). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>
33. Volpon, L., Besson, F., & Lancelin, J. (2000). NMR structure of antibiotics plipastatins A and B from *Bacillus subtilis* inhibitors of phospholipase A2. *FEBS Letters*, 485(1), 76-80. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)02182-7](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)02182-7)