



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL  
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE  
PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS POR CEPAS  
MARINAS DE *BACILLUS*

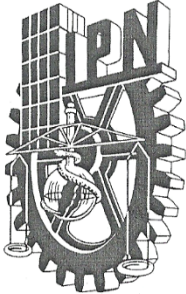
**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS  
EN  
MANEJO DE RECURSOS MARINOS

PRESENTA

ERIKA GUADALUPE RICO VIRGEN

LA PAZ, B.C.S., JULIO DEL 2020



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 02 del mes de Julio del año 2020

El (la) que suscribe BM. ERIKA GUADALUPE RICO VIRGEN Alumno (a) del Programa

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

con número de registro A180530 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:

DRA. RUTH NOEMÍ ÁGUILA RAMÍREZ Y DR. MAURICIO MUÑOZ OCHOA

y cede los derechos del trabajo titulado:

"EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS POR CEPAS MARINAS DE *Bacillus*"

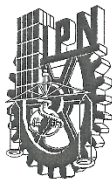
al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: erilups.rivir@gmail.com - raguilar@ipn.mx - mmunozo@ipn.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Erika Rico  
BM. ERIKA GUADALUPE RICO VIRGEN

*Nombre y firma del alumno*



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

SIP-14  
REP 2017

*ACTA DE REVISIÓN DE TESIS*

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 02 del mes de Julio del 2020 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Posgrado de: CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS para examinar la tesis titulada:

"EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS POR CEPAS MARINAS DE Bacillus"

del (la) alumno (a):

Apellido Paterno:	RICO	Apellido Materno:	VIRGEN	Nombre (s):	ERIKA GUADALUPE
-------------------	------	-------------------	--------	-------------	-----------------

Número de registro: A 1 8 0 5 3 0

Aspirante del Programa Académico de Posgrado: MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

Una vez que se realizó un análisis de similitud de texto, utilizando el software antiplagio, se encontró que el trabajo de tesis tiene 21 % de similitud. **Se adjunta reporte de software utilizado.**

Después que esta Comisión revisó exhaustivamente el contenido, estructura, intención y ubicación de los textos de la tesis identificados como coincidentes con otros documentos, concluyó que en el presente trabajo SI  NO  SE CONSTITUYE UN POSIBLE PLAGIO.

**JUSTIFICACIÓN DE LA CONCLUSIÓN:** *(Por ejemplo, el % de similitud se localiza en metodologías adecuadamente referidas a fuente original)*

Un 16% de las similitudes son en frases con menos de 10 palabras, en texto adecuadamente citado y en el listado de referencias bibliográficas

**\*\*Es responsabilidad del alumno como autor de la tesis la verificación antiplagio, y del Director o Directores de tesis el análisis del % de similitud para establecer el riesgo o la existencia de un posible plagio.**

Finalmente y posterior a la lectura, revisión individual, así como el análisis e intercambio de opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR**  **SUSPENDER**  **NO APROBAR**  la tesis por **UNANIMIDAD**  o **MAYORÍA**  en virtud de los motivos siguientes:

**"SATISFACE LOS REQUISITOS SEÑALADOS POR LAS DISPOSICIONES REGLAMENTARIAS VIGENTES"**

**COMISIÓN REVISORA DE TESIS**

**DRA. RUTH NOEMÍ ÁGUILA RAMÍREZ**  
Director de Tesis  
Nombre completo y firma

**DRA. BÁRBARA GONZÁLEZ ACOSTA**  
Nombre completo y firma

**DR. SERGIO FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ**  
Nombre completo y firma

**DR. MAURICIO MUÑOZ OCHOA**  
2º Director de Tesis (en su caso)  
Nombre completo y firma

**DR. JESÚS IVÁN MURILLO ÁLVAREZ**  
Nombre completo y firma

**DR. SERGIO HERNÁNDEZ TRUJILLO**  
Nombre completo y firma  
**PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES**



## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Instituto Politécnico Nacional por el apoyo otorgado y facilitar la realización de este trabajo, a los proyectos SIP por la beca BEIFI y la Beca Tesis. Al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (IPN-CICIMAR) por apoyarme en mi desarrollo profesional y por permitir el uso de las instalaciones para el trabajo de tesis. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada.

A mis directores de tesis y a todo el comité tutorial, a mis compañeros de laboratorio, familiares y amigos, gracias por acompañarme todo el camino y no dejarme sola.

## INDICE

GLOSARIO .....	VII
ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMEN .....	IX
ABSTRACT .....	X
INTRODUCCIÓN .....	1
ANTECEDENTES .....	4
JUSTIFICACIÓN .....	9
HIPÓTESIS .....	10
OBJETIVO .....	11
OBJETIVOS PARTICULARES.....	11
METODOLOGÍA .....	11
I. Selección preliminar de cepas productoras de compuestos antibacterianos.....	11
II. Obtención de compuestos antibacterianos .....	14
2.1 Producción de compuestos activos .....	14
2.2 Inducción de la producción de compuestos activos e inhibición del crecimiento de la cepa patógena .....	14
2.3 Productos extracelulares .....	15
2.4 Evaluación de la influencia del tamaño de inóculo, salinidad y temperatura en la producción de compuestos activos .....	16
2.5 Modificación de pH .....	16
III. Evaluación de la naturaleza del compuesto antibacteriano a través de la proteólisis de sobrenadantes activos .....	17
IV. Caracterización de la cepa de <i>Bacillus</i> productora de compuestos activos de tipo proteico. ....	17
V. Extracción de compuestos antibacterianos .....	18
5.1 Extracción con resina y solventes orgánicos .....	18
5.2 Precipitación de sobrenadante con sulfato de amonio .....	19
VI. Caracterización del extracto proteico antibacteriano.....	20
6.1 Actividad residual de la exposición del extracto crudo a diferentes factores .....	20
6.1.1 Termoestabilidad .....	20

6.1.2 Efecto de pH y luz UV.....	20
6.2 Electroforesis y bioautografía de geles de Poliacrilamida SDS-PAGE y Tricine-SDS-PAGE.....	21
6.3 Evaluación de la presencia de compuestos proteicos en Cromatografía de capa fina y bioautografía.....	22
VII. Bioactividad de la fracción peptídica.....	23
7.1 Inhibición del crecimiento de cepas patógenas.....	23
7.2 Evaluación de la inhibición en la formación de biopelículas.....	24
7.3 Evaluación de la interacción con cepas relacionadas.....	24
RESULTADOS.....	25
I. Selección preliminar de cepas productoras de compuestos antibacterianos.....	25
II. Obtención de compuestos antibacterianos.....	26
2.1 Producción de compuestos activos.....	26
2.2 Inducción de la producción de compuestos activos e inhibición del crecimiento de la cepa patógena.....	26
2.3 Productos extracelulares.....	27
2.4 Evaluación de la influencia del tamaño de inóculo, salinidad y temperatura en la producción de compuestos activos.....	28
2.5 Modificación de pH.....	30
III. Evaluación de la naturaleza del compuesto antibacteriano a través de la proteólisis de sobrenadantes activos.....	31
IV. Caracterización de la cepa de <i>Bacillus</i> productora de compuestos activos de tipo proteico.....	32
V. Extracción de compuestos antibacterianos.....	35
5.1 Extracción con resina y solventes orgánicos.....	35
5.2 Precipitación de sobrenadantes con sulfato de amonio.....	35
VI. Caracterización del extracto proteico.....	37
6.1 Actividad residual del extracto luego de la exposición a diferentes factores.....	37
6.1.1 Termoestabilidad.....	37
6.1.2 Efecto de pH y luz UV.....	38
6.2 Electroforesis y bioautografía de geles de poliacrilamida SDS-PAGE y Tricine-SDS-PAGE.....	39

6.3 Evaluación de la presencia de compuestos proteicos por Cromatografía de capa fina (CCF) y bioautografía.....	41
VII. Bioactividad de la fracción activa .....	43
7.1 Inhibición del crecimiento de patógenos.....	43
7.2 Evaluación de la inhibición en la formación de biopelículas .....	45
7.3 Interacción con cepas relacionadas.....	46
DISCUSION .....	47
CONCLUSION .....	62
BIBLIOGRAFIA .....	63



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Prueba de difusión en agar de la cepa <i>Bacillus firmus</i> 41Bf frente a <i>Streptococcus iniae</i> 527, en la que se observan los halos de inhibición alrededor del crecimiento de las células de <i>Bacillus</i> en el medio. Los círculos azules corresponden a la muestra del sobrenadante libre de células, en donde no se observa presencia de actividad.....	26
Figura 2.- Co-cultivo de la cepa <i>Bacillus firmus</i> 41Bf y la cepa patógena <i>Streptococcus iniae</i> 527 para obtención de productos celulares en membrana de celulosa, en la que se observa la zona de inhibición.....	28
Figura 3.- Prueba de difusión en agar con el sobrenadante libre de células luego del cambio a pH 6.0 y neutralizado de la cepa <i>Bacillus firmus</i> 41Bf frente a <i>Streptococcus iniae</i> 527.....	31
Figura 4.- Proteólisis del sobrenadante libre de células por proteinasa K, donde c) corresponde a la muestra sin tratar, k) al tratamiento con la enzima y c-k) al control de la solución amortiguadora y la enzima.....	32
Figura 5.- Evaluación del crecimiento celular de <i>B. firmus</i> en medio de cultivo tripticaseína de soya adicionado con NaCl 2.5% durante 60 h a 30° C en agitación constante a 160 rpm.....	34
Figura 6.- Evaluación de la producción del compuesto activo durante el cultivo celular, donde se presentan los valores del tamaño de las zonas de inhibición a diferentes horas. La estrella roja sobre las barras indica la presencia de esporas en el cultivo.....	35
Figura 7.- Diferencia en el tamaño de los halos de inhibición correspondiente a las extracciones con resina.....	36
Figura 8.- Evaluación de los diferentes porcentajes de precipitación, donde se presentan las zonas de inhibición observadas para las cepas patógenas. <i>Listonella anguillarum</i> 696 en la parte superior de la figura y <i>Streptococcus iniae</i> 527 en la parte inferior.....	37
Figura 9.- Extracción y prueba de compuestos activos. Donde A) Extracto crudo obtenido a 80% de saturación de sulfato de amonio y B) prueba de difusión en agar para evidenciar la presencia de actividad en el extracto. Los círculos grises muestran el área del sobrenadante luego de la precipitación, confirmando la precipitación total del compuesto activo.....	38
Figura 10.- Bioautografía del perfil cromatográfico de los compuestos producidos por 41Bf en gel SDS-PAGE al 12% frente a <i>Streptococcus iniae</i> 527. Donde A) corresponde al perfil cromatográfico de los compuestos y el marcador de peso molecular, y B) las zonas de inhibición observadas en la bioautografía,	

correspondientes a compuestos de peso molecular inferior a 20 kDa.....40

Figura 11.- Perfil electroforetico de la fracción F3 del extracto de *Bacillus firmus* 41Bf en gel Tricine-SDS-PAGE 20%. Donde M) marcador molecular y los correspondientes valores en kDa, F3-F3´) las réplicas de la fracción F3 y Mix) que corresponde a la proteólisis de la fracción. Las flechas rojas indican el resultado de la bioautografía donde se observa la zona de inhibición sobre la banda de bajo peso molecular en F3´ y la ausencia de zona de inhibición para la proteólisis de la fracción en Mix.....42

Figura 12.- Sobreposición de la placa teñida con el resultado de la bioautografía de la cromatografía en capa fina. Donde se observan los resultados para las fracciones 1 (3-9 kDa), 2 (10-30 kDa) y 3 (>30 kDa), en orden ascendente de derecha a izquierda.....44

Figura 13.- Porcentajes de inhibición en el crecimiento y formación de biopelículas en cepas patógenas.....47

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Lista de Patógenos empleados para evaluar la presencia de compuestos antibacterianos producidos por <i>Bacillus</i> .....	14
Tabla 2.- Cepas de <i>Bacillus</i> productoras de compuestos extracelulares activos. Donde se presentan el origen de las cepas: ventilas hidrotermales (VH), Biopelículas de placas experimentales (BPE) y biopelículas de rocas costeras (BRC); la respuesta a los métodos para la obtención de compuestos activos en sobrenadantes libres de células y la naturaleza proteica de estos.....	30
Tabla 3.- Caracterización parcial del precipitado crudo, donde se presentan los porcentajes de la actividad residual luego de los distintos tratamientos de acuerdo a los tamaños de diámetro de las zonas de inhibición.....	39
Tabla 4.- Valores de RF del perfil cromatográfico de los compuestos en placas de silica gel, donde se presentan de modo ascendente desde el punto de carga hasta el frente de corrida.....	43
Tabla 5.- Inhibición del crecimiento de los patógenos luego de pruebas de difusión en agar (medio sólido) y en medio líquido en microplacas de 96 pozos por 24 h con la fracción F3.....	45

## GLOSARIO

**BACTERICIDA:** Tiene la capacidad de destruir o matar bacterias.

**BACTERIOCINA:** Péptidos de síntesis ribosomal con actividad antimicrobiana producidos por algunas bacterias como estrategia de competencia.

**BIOAUTOGRAFÍA:** Técnica conocida como la purificación guiada por bioensayos, tiene como objetivo identificar los compuestos antimicrobianos en mezclas complejas de extractos para facilitar su purificación.

**BIOPELICULA:** Estructura colectiva de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo.

**ELECTROFORESIS:** Técnica que permite separar compuestos cargados eléctricamente, como las mezclas de proteínas o ácidos nucleicos, en función de su distinta movilidad en un campo eléctrico homogéneo.

**ENZIMA PROTEOLÍTICA:** Enzimas que catalizan la degradación de las proteínas mediante la adición de una molécula de agua en los enlaces peptídicos.

**INÓCULO:** Suspensión de microorganismos viables y aptos para reproducirse.

**PATÓGENO:** Microorganismo capaz de originar y desarrolla enfermedades en un organismo hospedero.

**RESINA AMBERLITE AXD-16:** Resina polimérica no polar utilizada generalmente para la adsorción de compuestos hidrofóbicos de pequeño o mediano peso molecular en sistemas acuosos y solventes polares.

**RESINA DIADION HP20:** Resina de copolímero de estireno-divinilbenceno no polar que se emplea para la adsorción de compuestos hidrofóbicos de diversos tamaños, desde péptidos y oligonucleótidos pequeños hasta proteínas grandes.

**SUSTANCIA DE TIPO BACTERIOCINA:** Sustancia proteica inhibitoria que no se ha caracterizado completamente.

## ABREVIATURAS

CM = Caldo marino

AM = Agar Marino

TSA = Agar de tripticaseina de soya

TSB = Caldo de tripticaseina de soya

TSA-2.5% = Agar de tripticaseina de soya adicionando NaCl al 2.5%

TSB-2.5% = Caldo de tripticaseina de soya adicionando NaCl al 2.5%

TSAPyB = Co-cultivo de la cepa patógena y *Bacillus* 41Bf en agar de tripticaseina de soya adicionado con NaCl al 2.5%

AMPyB = Co-cultivo de la cepa patógena y *Bacillus* 41Bf en agar marino

DAG = Difusión en agar por gota

SLC = Sobrenadante libre de células

SC = Sobrenadante de cultivo

PBS = Solución amortiguadora de fosfatos

UFC = Unidades formadoras de colonias

PVDF = Fluoruro de polivinilideno

D.O.= Densidad óptica

SDS = Dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE = Acrónimo en inglés para electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.

CCF = Cromatografía de capa fina

HCl =Ácido clorhídrico

NaOH = Hidróxido de sodio

## RESUMEN

Las bacterias del género *Bacillus* se encuentran ampliamente distribuidas en todos los ambientes y se ha evidenciado su capacidad de producir péptidos extracelulares con actividad antimicrobiana. En este trabajo se evaluó la producción de sustancias peptídicas activas en cultivos de cepas de *Bacillus* marinos frente a patógenos. Para ello se realizó una selección a partir de 167 cepas de *Bacillus*, evaluando la actividad antimicrobiana mediante una prueba de difusión en agar. Para la obtención de los compuestos se utilizó un tratamiento a 4° C y la modificación del medio de cultivo a pH 6, evidenciando 23 sobrenadantes activos. Posteriormente se realizó la digestión enzimática, donde se seleccionó la cepa 41Bf (*Bacillus firmus*) por poseer actividad de naturaleza proteica. Los compuestos activos del sobrenadante se precipitaron adicionando sulfato de amonio al 80% y realizando fracciones de diferentes tamaños moleculares que se separaron por electroforesis en geles SDS-Tricine-PAGE y mediante autobiografía se evidenció la presencia de actividad de una banda única alrededor de los 5-7 kDa. El compuesto activo es estable luego de la exposición prolongada a diferentes temperaturas, pH y luz UV, presentando actividad frente a patógenos tanto Gram-positivos como Gram-negativos. Para corroborar la naturaleza y actividad, se realizó una cromatografía de capa fina y tinción con ninhidrina (1%), donde se observó la presencia de tres halos de actividad diferentes, demostrando la capacidad de *B. firmus* para la producción de compuestos de tipo bacteriocina por con características similares a lo reportado para otros miembros del mismo género, siendo este el primer reporte para la especie en estudio.

## ABSTRACT

*Bacillus* genus bacteria are widely distributed in all environments and its ability to produce extracellular peptides with antimicrobial activity has been demonstrated. In this work, the production of active peptide substances in cultures of strains of marine *Bacillus* against pathogens was evaluated. For this, a selection was made from 167 *Bacillus* strains, evaluating antimicrobial activity using an agar diffusion test. To obtain the compounds, a treatment at 4 ° C and modification at pH 6 were used, showing 23 active supernatants. Subsequently, enzymatic digestion was carried out, where the 41Bf strain (*Bacillus firmus*) was selected for possessing activity of a protein nature. The active compounds of the supernatant were precipitated by adding 80% ammonium sulfate and making fractions of different molecular sizes that were separated by electrophoresis in SDS-Tricine-PAGE gels and by autography the presence of a single band activity was evident around the 5 -7 kDa. The active compound is stable after prolonged exposure to different temperatures, pH and UV light, showing activity against Gram-positive and Gram-negative pathogens. To corroborate the nature and activity, a thin layer chromatography and ninhydrin staining (1%) were performed, where the presence of 3 different activity halos was observed, demonstrating the ability to produce bacteriocin-like compounds by *Bacillus firmus* with characteristics similar to that reported for other members of the same genus, this being the first report for the species under study.





## INTRODUCCIÓN

El metabolismo secundario representa un papel muy importante para el organismo productor desempeñando funciones, principalmente ecológicas, que aseguren su supervivencia (Bu'lock en Demain y Fang, 2000; Galbis-Pérez, 2004). En el medio natural, los compuestos producidos por los organismos pueden detener el crecimiento de los competidores. Entre ellos, los mejor conocidos son los antibióticos (Demain y Fang, 2000), que son compuestos de bajo peso molecular y de naturaleza química diversa que han sido utilizados, desde su descubrimiento, para el tratamiento de diversos padecimientos que anteriormente no tenían cura. Estas moléculas, biológicamente activas, con diferentes estructuras tienen modos de acción sobre los agentes infecciosos ya que pueden inhibir la formación de la pared celular, estimular la liberación de autolisinas, inhibir la síntesis de proteínas, interferir con la síntesis de ADN o interrumpir la función de la membrana plasmática (Muñoz *et al.*, 2004). No obstante, el uso inadecuado de éstos y sus derivados sintéticos ha generado resistencia y/o multiresistencia de patógenos de importancia clínica e industrial, lo que representa un problema a nivel mundial (Asha Devi *et al.*, 2011; Abdel *et al.*, 2019). Cabe destacar, que los antibióticos no inducen la resistencia de cepas patógenas, simplemente participan en la selección de esta (FAO, 2004).

Entre las estrategias de resistencia que presentan los patógenos se encuentra la inactivación del antibiótico por medio de la producción de enzimas, evitando el acceso del antibiótico a los puntos diana o alterando la unión con los receptores (Muñoz *et al.*, 2004). Ante este panorama, la búsqueda de nuevos metabolitos secundarios continúa para combatir la resistencia natural de microorganismos, mejorar las propiedades farmacológicas de los antibióticos, y para descubrir nuevas moléculas que sean seguras, más potentes y con un espectro de acción más amplio (Demain y Fang, 2000).

Los metabolitos secundarios producidos por microorganismos constituyen una fuente inagotable para la obtención de nuevos compuestos activos, debido

principalmente a las interacciones que se pueden presentar (antagónicas, sinérgicas, etc.) entre los microorganismos y otros sistemas vivos. Entre los compuestos producidos y secretados por bacterias, los péptidos antimicrobianos son de especial interés, debido a su modo de acción y sus propiedades, por lo que se les considera una opción factible (Brizuela *et al.*, 1998).

Las bacterias son capaces de producir una gran variedad de péptidos, principalmente como resultado de la competencia con otros microorganismos, con quienes puede o no, mantener una estrecha relación filogenética (Lee y Kim, 2011; Lim *et al.*, 2016). Sin embargo, pueden tener otros propósitos además de la competencia, tales como facilitar la señalización individual entre cepas y la promoción de la biodiversidad (García-Gutiérrez *et al.*, 2018).

Existen dos tipos de péptidos antimicrobianos, los cuales son clasificados de acuerdo con su mecanismo de síntesis: los péptidos que son sintetizados por el ribosoma, mejor conocidos como bacteriocinas y los péptidos que no son sintetizados por el ribosoma o lipopéptidos (Abriouel *et al.*, 2010).

El término “bacteriocinas”, que se empleó para referirse a aquellas sustancias proteicas de origen bacteriano con actividad antimicrobiana, fue propuesto por Jacob *et al.* (1953). Las bacteriocinas son péptidos producidos por algunas bacterias como una estrategia de competencia por nutrientes y espacio, además de participar en la comunicación celular. Son altamente específicas ya que sus mecanismos de acción son diferentes a los antibióticos convencionales (Cotter *et al.*, 2005; López *et al.*, 2008).

Las bacteriocinas se clasifican en tres clases: clase I, péptidos con modificaciones post-traduccionales; clase II, péptidos no modificados; clase III, otros péptidos lineales (Abriouel *et al.*, 2010) las cuales poseen diferentes modos de acción, ya sea formando poros en la membrana celular y permitiendo la pérdida de moléculas esenciales (Moll *et al.*, 1999); inhibiendo la actividad de enzimas como la fosfolipasa A2, que participa en la reparación de membranas (Wiedemann *et al.*, 2001); interfieren en la división celular (Lopetuso *et al.*, 2019), o pueden también

inhibir la síntesis de la pared celular, a través de su unión al lípido II que es el principal transportador de las subunidades de peptidoglicano. Por ello, podrían ser utilizadas en la inhibición de crecimiento de bacterias patógenas de humanos y animales, incluyendo a aquellas bacterias resistentes a la acción de los antibióticos (López *et al.*, 2008).

Entre las principales características de las bacteriocinas se destaca que pueden ser termoestables y resistentes a la influencia del pH, propiedades que se encuentran estrechamente relacionadas ya que el incremento de pH reduce la termoestabilidad (Chen y Hoover, 2003). Las bacteriocinas de menor tamaño presentan una alta termorresistencia, con lo cual pueden mantener su actividad aún después de tratamientos equivalentes a la pasteurización, pero suelen ser parcialmente destruidas a temperaturas superiores a los 100° C. Esta estabilidad puede deberse a la formación de estructuras globulares, y a la presencia de regiones hidrofóbicas, así como a la formación de enlaces cruzados estables (Alquicira, 2006).

Actualmente, de acuerdo con la base de datos de péptidos antimicrobianos (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) hay un total de 3202 péptidos antimicrobianos de los cuales 357 corresponden a bacteriocinas. Las bacteriocinas más importantes son producidas por bacterias ácido-lácticas (BAL) que han sido ampliamente estudiadas para su uso en la industria de alimentos principalmente, seguidas por las bacterias del género *Bacillus*, que pueden ser consideradas las segundas más importantes, demostrando ser fuentes prometedoras en la producción de bacteriocinas o sustancias tipo bacteriocina con diversas actividades biológicas (Torkar y Matijasic 2003; Cherif *et al.*, 2001; Cladera-Olivera *et al.*, 2004; Alday-Aguilera, 2008; De la Fuente-Salcido, 2009; Xie *et al.*, 2009; Abriouel *et al.*, 2010; Benítez *et al.*, 2010; Asha Devi *et al.*, 2011; Lee y Kim, 2011; Smitha y Bhat, 2013; Kong *et al.*, 2016; Lim *et al.*, 2016; Brock *et al.*, 2018; Su *et al.*, 2019; Shayesteh *et al.*, 2020).

En el caso de *Bacillus*, es importante corroborar la síntesis ribosómica de bacteriocinas, ya que este grupo de bacterias es prolífico en la producción de

péptidos antimicrobianos (Abriouel *et al.*, 2011). Es un género de bacterias Gram-positivas, capaces de formar endosporas. Son aeróbicas y anaeróbicas facultativas, poseen forma de bastón (entre 2.5 y 10 mm de largo), pertenecen al Filo firmicutes del orden bacillales y pueden encontrarse fácilmente en diversos ambientes (Soltani *et al.*, 2019). Actualmente son además una fuente importante de compuestos activos, antibióticos e insecticidas.

A pesar de que los metabolitos producidos por microorganismos terrestres han sido reconocidos como unos de los más importantes por su uso médico (Kelecom, 2002), los organismos marinos han demostrado ser fuentes potenciales en la producción de nuevos metabolitos secundarios, que no se han encontrado en organismos terrestres y que pueden ser resultado de la adaptación de estas especies a cambios hostiles en el medio marino (Jensen y Fenical, 1994; Ireland *et al.*, 1993 en Asha Devi *et al.*, 2011). Los microorganismos marinos que se han aislado de diferentes entornos marinos son capaces de producir diversos compuestos activos de interés para la industria (Jensen y Fenical, 1994; Fenical, 1997; Proksch *et al.*, 2002; Asha Devi *et al.*, 2011; Shayesten *et al.*, 2014). En cuanto a la producción de bacteriocinas por microorganismos marinos, en su mayoría no se han descrito en su totalidad, clasificándose principalmente como sustancias de tipo bacteriocina (Abriouel *et al.*, 2010; Desriac *et al.*, 2010). Bacterias del género *Bacillus* que han sido aisladas de diversas fuentes marinas, han demostrado su capacidad de producción de compuestos proteicos con actividades importantes frente a diversos patógenos (Zheng, 1997; Bizani y Brandelli, 2002; Cladera-Olivera *et al.*, 2004; De la Fuente-Salcido, 2009; Asha Devi *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2011; Touraki *et al.*, 2012; Smitha y Bhat, 2013; Lim *et al.*, 2016).

## **ANTECEDENTES**

Las bacteriocinas pueden ser sintetizadas tanto por bacterias Gram-positivas como por Gram-negativas (Jeevaratnam *et al.*, 2005). Sin embargo, las que son

producidas por bacterias Gram-positivas han sido de interés en diversas industrias ya que poseen carga positiva neta que les permite interactuar con los lipopéptidos de las membranas celulares de bacterias Gram-negativas, así como con los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de las paredes de bacterias Gram-positivas (Jensen *et al.*, 2006), además son un grupo mucho más heterogéneo que las bacteriocinas de bacterias Gram-negativas (Riley y Werts, 2002). De acuerdo con la recopilación de Chen y Hoover (2003) los metabolitos secundarios conocidos como bacteriocinas, son definidos como productos de la síntesis ribosómica, los cuales están conformados por péptidos de entre 20 y 60 aminoácidos (lactococinas, lactacina B y helveticina J, entre otras). Estos metabolitos pueden encontrarse extra- e intracelularmente y presentan una alta actividad bactericida o bacteriostática sobre cepas o especies relacionadas a la bacteria productora y sobre microorganismos patógenos (Cotter *et al.*, 2005).

Las bacteriocinas pueden presentar un amplio espectro antimicrobiano, siendo activas en concentraciones pequeñas frente a bacterias Gram-positivas patógenas. Se ha demostrado que dicha actividad, aunque de manera menos efectiva, también se presenta frente a bacterias Gram-negativas sensibilizadas por tratamientos térmicos o por agentes quelantes. Se ha evidenciado el potencial inhibitorio de las bacteriocinas frente a patógenos como *Clostridium botulinum*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y algunas especies de *Bacillus* (Wu *et al.*, 2005; Jeevaratnam *et al.*, 2005; Asha Devi *et al.*, 2011).

Hasta ahora se ha descrito el potencial de algunas especies de *Bacillus* como productores de compuestos extracelulares de tipo peptídico de interés industrial y médico, como es el caso de *B. thuringensis* (De la Fuente-Salcido, 2009), *B. subtilis* (Xie *et al.*, 2009), *B. polyfermenticus* (Lee y Kim, 2011), *B. amyloliquefaciens* (Kong *et al.*, 2016), entre otros.

Las bacteriocinas se clasifican principalmente en clases o tipos. Aunque la clasificación puede variar de acuerdo a los autores, una de las más aceptadas es la

propuesta por Klaenhamer en 1993 y que ha sido modificada a través del tiempo de acuerdo a las características de las nuevas bacteriocinas (van Belkum y Stiles, 2000; Nes *et al.* 2007), siendo enfocada principalmente a bacterias ácido lácticas. No obstante, Abriouel *et al.* (2010), propone una clasificación para las bacteriocinas producidas por bacterias del género *Bacillus*, en la que consideran tres clases subdivididas en grupos de acuerdo con las características específicas:

Clase I: péptidos modificados post-traduccionalmente (péptidos pequeños <4 kDa)

Subclase I.1.- Tipo de modificación A, poseen una estructura alargada como la subtilina, ericina S y ericina A.

Subclase I.2.- Tipo de modificación B, lantibióticos globulares como mersacidina, sublancina 168 y paenibacillina.

Subclase I.3.- Lantibióticos de dos componentes, como la haloduracina y la liquenidina.

Subclase I.4.- Péptido aniónico, cíclico como subtilosina A que posee un enlace peptídico de cabeza a cola, así como puentes de sulfuro formados entre grupos de cisteína y residuos de aminoácidos deshidratados.

Clase II: Péptidos no modificados (bacteriocinas pequeñas 0.77-10 kDa, estables al calor y al pH).

Subclase II.1.- Péptidos similares a la pediocina con una región conservada YGNGVXC cerca de N-terminal.

Subclase II.2.- Péptidos similares a la turicina con una región conservada DWTXWSXL cerca del extremo N-terminal.

Subclase II.3.- Otros péptidos lineales como la liquenina.

Clase III: Otros péptidos lineales (proteínas grandes 430 kDa con actividad fosfolipasa).

Muchos otros péptidos antimicrobianos de tamaño intermedio 10-30 kDa y otras proteínas antimicrobianas de mayor tamaño, no se incluyen en esta clasificación debido a que no se cuenta con las secuencias de los genes. Por esta razón suelen clasificarse como sustancias de tipo bacteriocina sin asignar una clase específica (Abriouel *et al.*, 2010).

El género *Bacillus* comprende actualmente 377 especies (<http://www.bacterio.net/bacillus.html>). Muchas de las cuales poseen características que las hacen buenos candidatos como agentes de control biológico (Wulff *et al.*, 2002). Es bien conocido que son especies productoras de sustancias antibióticas (Cherif *et al.*, 2001; Lisboa *et al.*, 2006; Sansinenea y Ortiz, 2011) con actividad antagónica frente a hongos y bacterias, tienen una alta variabilidad y son conspicuas (Sansinenea y Ortiz, 2011). Algunos miembros de este grupo son considerados como “bacterias generalmente reconocidas como seguras” (GRAS, por sus siglas en inglés), es decir que no son tóxicas y no tienen actividad hemolítica (Lajis, 2020). Se conoce que *Bacillus subtilis*, puede producir más de 24 tipos de antibióticos con variedad de estructuras (Stein, 2005). Dentro de estos compuestos se encuentran péptidos antimicrobianos, como bacteriocinas o sustancias de tipo bacteriocina (Torkar y Matijasic 2003; Cherif *et al.*, 2001; Cladera-Olivera *et al.*, 2004; Asha Devi *et al.*, 2011; Smitha y Bhat, 2013).

Los primeros reportes de la producción de bacteriocinas como sustancia extracelular con actividad inhibitoria por bacterias marinas fueron con la cepa *Alteromonas* P-31 (Barja *et al.*, 1989), y ya como proteína antimicrobiana con la bacteria marina *Pseudoalteromonas* sp. cepa X153 (Longeon *et al.*, 2004). Hasta 2010 había sólo un escaso número de publicaciones en las que describen sustancias de tipo bacteriocina producidas por bacterias marinas, nada comparable con el esfuerzo realizado para el estudio de bacterias ácido-lácticas. Actualmente es cada vez más estudiado el potencial de las bacterias marinas como productoras

de bacteriocinas y de sustancias de tipo bacteriocina (Desriac *et al.*, 2010).

Cepas marinas del género *Bacillus* ha demostrado su potencial de producción de bacteriocinas. Estas se han aislado de diversos ambientes como por ejemplo de la microbiota intestinal de organismos marinos (Cladera-Olivera *et al.*, 2004), de sedimentos marinos (Smitha y Bhat, 2013), de agua de mar (Asha Devi *et al.*, 2011), entre otros, mostrando diversas actividades entre las que se encuentran: amebicida (Benítez *et al.*, 2010), inhibición de biopelículas (Alday-Aguilera, 2008; Shayesteh *et al.*, 2020), bactericidas en la industria alimentaria, farmacéutica y en acuicultura (Zheng, 1997; Bizani y Brandelli, 2002; de la Fuente-Salcido, 2009; Sharma *et al.*, 2011; Touraki *et al.*, 2012, Lim *et al.*, 2016).

Diversas especies han sido estudiadas para la producción de compuestos activos de origen proteico, tal es el caso de *Bacillus licheniformis*, bacteria aislada de sedimentos marinos, que es capaz de producir la bacteriocina BL8 termoestable hasta los 100° C y con actividad antimicrobiana frente a patógenos Gram-positivos en un rango amplio de pH y con un peso molecular de 1.4 kDa similar a las bacteriocinas reportadas para otras especies de *Bacillus* como la Bacillocina 490 de 2 kDa producida por *Bacillus licheniformis* o la Pumilicina 4 de 1.9 kDa producida por *Bacillus pumilus* (Martirani *et al.*, 2002; Aunpad y Na-Bangchang, 2007 en Smitha y Bhat, 2013). Se ha establecido que ésta puede ser útil como conservador en el procesamiento de alimentos así también como agente terapéutico (Smitha y Bhat, 2013).

Pacheco *et al.* (2018) obtuvieron péptidos mediante la precipitación con sales en el sobrenadante del cultivo de *Bacillus* sp. aislado del intestino de tilapias, utilizando sulfato de amonio al 50%. Estos péptidos fueron activos frente a patógenos de importancia acuícola y clínica, y su actividad tuvo un periodo de eficacia de 22 días, con lo que se evidenció que el uso de extractos bacterianos de tipo peptídico, podrían ofrecer una alternativa eficaz en menor número de aplicaciones para mantener la dosis terapéutica, reduciendo de esta manera los costos de producción.



De acuerdo con la investigación de Nayak *et al.* (2017), la cepa B2 de *B. pumilus*, produce un compuesto de tipo proteico que tolera temperaturas de hasta 90° C con un peso molecular aproximado de 17 kDa que es capaz de inhibir eficientemente el crecimiento de bacterias patógenas de importancia acuícola, específicamente *Vibrio* que fueron aislados de camarones, en un espectro de pH entre 6.0 y 10.0 y en concentraciones inferiores al 8% de NaCl.

Bacteriocinas producidas por *Bacillus* sp. aislada de la almeja de alfombra (*Paphia textile*) poseen actividad antibacteriana, Shayesten *et al.* (2014) evidencian que la producción del compuesto activo se encuentra estrechamente relacionada con la composición del medio de cultivo y la fase de crecimiento, siendo mayor durante la mitad de la fase estacionaria (30 h). A pesar de ser un *Bacillus* aislado de una fuente marina, la bacteriocina que produce no es activa a concentraciones mayores a 5% de NaCl. Presenta un máximo de actividad a 30° C y es lábil a partir de los 45° C. La clasifican como bacteriocina por mostrar proteólisis con tripsina.

Prieto *et al.* (2012) enfatizan en el potencial que poseen las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* aisladas de algas marinas, para la producción de bacteriocinas ya que logran identificar por primera vez la lichenicidina producida por tres cepas de *Bacillus licheniformis*. Plantean, además, la posibilidad de encontrar nuevas bacteriocinas en bacterias marinas productoras de compuestos activos de tipo proteico al no encontrar los genes que codifican para bacteriocinas conocidas.

## JUSTIFICACIÓN

La resistencia adquirida o intrínseca es un proceso natural de los microorganismos que se genera a partir de la exposición prolongada a ciertas dosis de antibiótico (Xue *et al.*, 2005) y que no puede detenerse, por lo que mejorar las propiedades farmacológicas de los antibióticos y descubrir nuevas moléculas que sean seguras,

más potentes y con un espectro de acción más amplio es imperativo (Juneja y Davidson, 1993; Demain y Fang, 2000).

Los microorganismos marinos han demostrado ser fuentes potenciales en la producción de nuevos compuestos que pueden ser resultado de la adaptación de estas especies a cambios hostiles en el medio marino, entre ellos, las especies del género *Bacillus* se han destacado como prolíferos productores de compuestos antimicrobianos (Abriouel *et al.*, 2010).

Entre los compuestos producidos por bacterias, los péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal, por sus características como la resistencia a altas temperaturas, estabilidad a diferentes pH (Chen y Hoover, 2003), espectros de acción amplios (Wu *et al.*, 2005; Jeevaratnam *et al.*, 2005; Asha Devi *et al.*, 2011), además del sistema de inmunidad que posee la cepa productora (Nes *et al.*, 1996) los convierte en una atractiva alternativa a los antibióticos convencionales, con los cuales ya se generaron problemas de resistencia.

Por ello se hace necesario evaluar si los compuestos antimicrobianos que producen estas bacterias marinas pudieran ser péptidos de síntesis ribosomal y presenten las características que los definen como alternativas.

## **HIPÓTESIS**

Los compuestos bioactivos producidos por cepas de *Bacillus* aisladas de diferentes ambientes marinos, serán péptidos de tipo bacteriocina.

## **OBJETIVO**

Aislar y caracterizar compuestos bioactivos de naturaleza peptídica a partir de cepas marinas del género *Bacillus*.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Evaluar la presencia de compuestos extracelulares bioactivos producidos por cepas del género *Bacillus*.

- Corroborar la naturaleza peptídica de los compuestos activos mediante proteólisis.

- Purificar parcialmente los compuestos peptídicos a partir de los sobrenadantes bioactivos.

- Caracterizar las fracciones peptídicas bioactivas.

## **METODOLOGÍA**

I. Selección preliminar de cepas productoras de compuestos antibacterianos.

Para verificar la producción de compuestos con actividad bactericida, se realizó una prueba preliminar de actividad con las cepas del género *Bacillus* de la colección bacteriana del Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular del CICIMAR-IPN, que fueron aisladas de diversos sustratos y bajo diferentes

condiciones. Se probaron un total de 167 cepas conocidas de *Bacillus* frente a microorganismos patógenos (Tabla 1), utilizando la técnica de difusión en pozo (NCCLS, 1993 y modificado por Aguila-Ramírez, 2012). Todas las cepas *Bacillus* fueron reactivadas en Agar Marino (AM), para corroborar su viabilidad y pureza, posteriormente fueron inoculadas e incubadas en microtubos con 2 mL de caldo marino, durante 48 h a 35° C por duplicado. Posteriormente el cultivo fue centrifugado a 13500 rpm por 20 min (Microcentrífuga refrigerante Prism R) y se recuperó el sobrenadante de cultivo (SC).

Se realizó una siembra masiva con hisopo estéril en agar tripticaseina de soya adicionado con NaCl al 2.5% (TSA-2.5%) con 100 µL de cada una de las cepas patógenas previamente suspendidas en 10 mL de solución salina a una densidad óptica a una longitud de onda de 585 nm (D.O<sub>585</sub>) con valor de 1.0 (Espectrofotómetro portátil Merck SQ 118). Se realizaron perforaciones de 6 mm de diámetro en donde se depositaron 40 µL del SC de las cepas de *Bacillus*. Las cajas se mantuvieron por 30 minutos a 4° C y posteriormente, se incubaron a 25 o 35° C (de acuerdo con los requerimientos de la cepa patógena) por 48 h (De la Fuente-Salcido, 2008). Estos ensayos se realizaron por triplicado.

Tabla 1.- Lista de cepas patógenas empleadas para evaluar la presencia de compuestos antibacterianos producidos por *Bacillus*.

#### CEPAS PATÓGENAS

Patógeno	Clave	T° de incubación	Gram	Origen	Medio de cultivo utilizado
<i>Aeromonas caviae</i> <sup>1</sup>	Ac	35° C	-	Aislado clínico	TSA
<i>Aeromonas hydrophyla</i>	Ah	30° C	-	Peces dulce-acuícolas	TSA-2.5%
<i>Aliivibrio fischeri</i> *	329	25° C	-	Calamar	TSA-2.5%
<i>Aliivibrio salmonicida</i> *	321	25-30° C	-	Salmón	TSA-2.5%

<i>Candida albicans</i> <sup>1</sup>	Ca	35° C	+	Cepa de Referencia	TSA
<i>Citrobacter freundii</i>	Cf	30° C	-	Peces dulce- acuícolas	TSA
<i>Edwardsiella tarda</i> *	1875	25-30° C	-	Peces dulce- acuícolas	TSA
<i>Enterobacter</i> sp	Es	30° C	-	Peces dulce- acuícolas	TSA
<i>Escherichia coli</i> ATCC <sup>1</sup>	BAA-196	35° C	-	Cepa de Referencia	TSA
<i>Listonella anguillarum</i> *	696	25-30° C	-	Peces marinos	TSA-2.5%
<i>Photobacterium damsela</i> *	331	25-30° C	-	Peces marinos	TSA-2.5%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC <sup>1</sup>	27853	35° C	-	Cepa de Referencia	TSA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <sup>1</sup>	Pa	35° C	-	Aislado clínico	TSA
<i>Salmonella entérica</i> ATCC <sup>1</sup>	14028	35° C	-	Cepa de Referencia	TSA
<i>Salmonella</i> sp <sup>1</sup>	Sal	35° C	-	Cepa de Referencia	TSA
<i>Shewanella xiamanensis</i>	Sx	30° C	-	Peces dulce- acuícolas	TSA
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC <sup>1</sup>	BAA-42	35° C	+	Cepa de Referencia	TSA
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC <sup>1</sup>	14990	35° C	+	Cepa de Referencia	TSA
<i>Streptococcus iniae</i> *	527	37° C	+	Peces marinos	TSA-2.5%
<i>Streptococcus</i> sp*	1838	30° C	+	Peces dulce- acuícolas	TSA-2.5%
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC <sup>1</sup>	17802 y CVP2	35° C	-	Cepa de Referencia	TSA-2.5%
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> <sup>1</sup>	M1, M8, G4, G6, G7, G9, G10	35° C	-	Camarones	TSA-2.5%
<i>Vibrio peneicida</i> <sup>1</sup>	Vp	35° C	-	Camarones	TSA-2.5%

\*) Cepas obtenidas de la colección del centro de investigación en Alimentos y Desarrollo, A.C., <sup>1</sup>) Cepas proporcionadas por el laboratorio de Microbiología y Biología molecular, CICIMAR-IPN.

Simultáneamente, se realizó la prueba de actividad con los cultivos de *Bacillus*, pero por difusión en agar en gota (DAG), para lo cual se colocó una gota de 15 µL por triplicado de SC sobre la caja de Petri con agar previamente inoculada con la suspensión de la cepa patógena, dejando secar completamente la gota a temperatura ambiente para posteriormente incubarse durante 24 y 48 h a la temperatura requerida para cada cepa patógena (Tabla 1).

Se seleccionó a la cepa *Bacillus firmus* (41Bf) que mostró los mejores halos de inhibición para tomarla como modelo en las pruebas de producción de compuestos. Así mismo, se seleccionó al patógeno *Streptococcus iniae* (527) que fue sensible a la mayor cantidad de cepas de *Bacillus*.

## II. Obtención de compuestos antibacterianos

### 2.1 Producción de compuestos activos

Se consideraron dos medios de cultivo para evaluar la producción de compuestos: 1) el caldo marino (CM) que es un medio limitante para probar la producción de compuestos como respuesta al estrés, y 2) un medio rico en nutrientes como lo es el caldo de tripticaseína de soya adicionado con NaCl 2.5% (TSB 2.5%). Se prepararon cultivos de 10 mL que se mantuvieron en agitación constante a 160 rpm en una incubadora de agitación (Incu-Shaker 10L, Benchmark) por 24 y 48 h a 35° C. Posteriormente se centrifugaron a 13500 rpm por 20 min en alícuotas de 1 mL, se filtraron con una membrana de 0.45 µm para obtener el sobrenadante libre de células (SLC) y se realizó una DAG para corroborar la presencia de los compuestos activos (a partir de este punto todas las pruebas DAG, se realizaron con SLC).

### 2.2 Inducción de la producción de compuestos activos e inhibición del crecimiento de la cepa patógena

Se probó la inducción para la producción de compuestos activos en la cepa *B. firmus* 41Bf utilizando el sobrenadante del cultivo del patógeno *Streptococcus iniae* 527. Para ello se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 125 mL, 10 mL de SLC de un cultivo de 24 h de *S. iniae* 527 y 10 mL de TSB-2.5% donde se inoculó la cepa *B. firmus* 41Bf. Se incubó a 35° C a 160 rpm durante 48 h y posteriormente se realizó una prueba DAG.

La inhibición del crecimiento de la cepa patógena a través de los compuestos secretados por la cepa *B. firmus* 41Bf, se verificó utilizando el SLC de esta última en un cultivo de *S. iniae* 527. Se adicionaron 10 mL de SLC de un cultivo de *B. firmus* 41Bf de 24 h en 10 mL de TSB-2.5% y se inoculó la cepa patógena *S. iniae*

527. Se incubó por 48 h a 35° C en agitación constante a 160 rpm. Posteriormente el cultivo se centrifugó a 3500 rpm durante 20 min y se realizó una prueba de DAG.

Finalmente, para evaluar tanto la inhibición de la cepa patógena, como la producción de compuestos activos se realizó un co-cultivo de la cepa *B. firmus* 41Bf y *S. iniae* 527. En proporción 1:1 se agregó una alícuota de 1 mL de cada cepa a 18 mL de TSB 2.5%, se incubó a 35° C en agitación constante a 160 rpm durante 48 h. De este cultivo se tomaron tres muestras de 100 µL para diluciones decimales y estimación del número de unidades formadoras de colonias (UFC). El cultivo restante se centrifugó a 13500 rpm por 20 min y con el SLC se realizó una prueba de DAG.

### 2.3 Productos extracelulares

Se prepararon cajas de Petri con TSA-2.5% y AM en las que se colocó uniformemente una membrana de celulosa previamente hidratada en agua estéril y sobre la que se inocularon con hisopo 100 µL de una suspensión ajustada a D.O<sub>585</sub> de 1.0 de la cepa *B. firmus* 41Bf evitando los bordes. Las placas se incubaron durante 48 h a 35° C. Posteriormente se recuperaron las células y los productos extracelulares de la membrana de celulosa en un microtubo de 2 mL. Se resuspendieron en 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 0.01 M pH 7.0 (0.0754M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O y 0.0246 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O) y se homogenizaron vigorosamente. La suspensión se centrifugó a 13500 rpm por 20 min y se filtró con una membrana PVDF de 0.22 µm para realizar una prueba DAG.

Utilizando esta misma técnica, se realizó una prueba antagónica con las cepas *B. firmus* 41Bf y *S. iniae* 527. Para ello, en cajas de Petri con TSA-2.5% y AM fueron previamente inoculados con hisopo 100 µL de una suspensión a D.O<sub>585</sub> de 1.0 de 527. Sobre éste se colocó la membrana de celulosa previamente hidratada y se inoculó la cepa *B. firmus* 41Bf. Se incubaron las cajas de Petri y se recuperaron los productos extracelulares como se mencionó anteriormente y se realizó una prueba de DAG.

## 2.4 Evaluación de la influencia del tamaño de inóculo, salinidad y temperatura en la producción de compuestos activos

Se probó la preparación de inóculos de 1, 5 y 20 mL para inducir y acelerar el periodo de producción de compuestos activos en *B. firmus* 41Bf, incubando estos inóculos durante 24 h a 30° C en agitación constante a 160 rpm. Los inóculos se agregaron a 100 mL de caldo tripticaseína de soya adicionado con 40, 35 y 25 ppm de NaCl, a diferente tiempo: 0, 24, 48 y 72 h (los inóculos de 20 mL se almacenaron a 4° C entre cada periodo). Se incubaron a 35° C por 48 h en agitación constante a 160 rpm. Se recuperó una alícuota de 2 mL por duplicado que se centrifugó a 13500 rpm durante 20 min, se filtró y con el SLC se realizó una prueba de DAG.

Cultivos de 100 mL con inóculo de 20/72 (inoculo de 20 mL almacenado a 4° C durante 72 h), se evaluaron a tres temperaturas de incubación 30, 35 y 37° C, durante 48 h en agitación constante a 160 rpm. Posteriormente se tomaron alícuotas de 2 mL que se centrifugaron a 13500 rpm durante 20 min, se filtró y con el SLC se realizó una prueba de DAG para determinar la temperatura optima de producción de compuestos activos.

Una vez seleccionadas las condiciones de producción de compuestos activos, se evaluó la eficiencia en la recuperación de compuestos a través del filtrado del cultivo con diferentes membranas de 0.22 y 0.45 µm, de PVDF (Millipore) y acetato de celulosa (Termo y VWR). El SLC se evaluó con una prueba DAG.

## 2.5 Modificación de pH

Cultivos de 48 h de incubación de *B. firmus* 41Bf en TSB-2.5%, se ajustaron a pH 5.0 y 6.0 con ácido clorhídrico (HCl) 1 M, se colocaron en agitación constante por 15 min a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugaron en tubos de 50 mL a 4000 rpm, se recuperó el sobrenadante y fueron neutralizados (pH 7.0) con hidróxido de sodio (NaOH) 1 M. Se realizó una prueba de actividad DAG frente a la cepa indicadora.



Se seleccionaron los métodos de cultivo y obtención de compuestos activos con mejores resultados para la cepa *B. firmus* 41Bf y se realizó con las 57 cepas restantes que presentaron actividad en la selección preliminar.

### III. Evaluación de la naturaleza del compuesto antibacteriano a través de la proteólisis de sobrenadantes activos

Los sobrenadantes que presentaron actividad luego del tratamiento con inóculo 20/72 y/o con modificación del pH se trataron con diferentes enzimas proteolíticas: tripsina (comercial), papaína (comercial) y proteinasa K (Thermo); todas a una concentración final de 1 mg/mL en 100 µL de SLC durante 2 h a 37° C. Se utilizaron como controles la solución de enzima (enzima + PBS 0.01 M pH 7.0. Para proteinasa K se utilizó como solución amortiguadora Tris-HCl 0.01 M pH 7.5), el sobrenadante con la solución amortiguadora y la solución amortiguadora (Xie *et al.*, 2009). Luego del periodo de incubación, las enzimas fueron inactivadas a 95° C por 5 min, posteriormente se realizó una prueba de DAG para verificar la presencia o ausencia de halos de inhibición luego de la digestión enzimática.

### IV. Caracterización de la cepa de *Bacillus* productora de compuestos activos de tipo proteico.

Con la cepa a partir de la cual se obtuvo el SLC que presentó pérdida de la actividad luego de la digestión enzimática, se evaluó la producción de compuestos antibacterianos durante el crecimiento en medio líquido, para lo cual se agregaron 100 µL del inóculo 20/72, en un matraz Erlenmeyer con 100 mL de medio TSB-2.5% por triplicado, incubado a 30° C en agitación constante a 160 rpm en una incubadora de agitación. El crecimiento bacteriano se determinó a las 0, 6, 12, 14, 16, 18, 19, 20, 24, 36, 40, 44, 48 y 60 h mediante el incremento en la D.O<sub>585</sub> del cultivo, la estimación del número de células viables y la presencia de esporas en UFC con diluciones decimales.

Para evaluar la D.O. del cultivo bacteriano, se utilizó una alícuota de 4 mL del cultivo y se realizó la lectura en un espectrofotómetro portátil a una longitud de onda de 585 nm. Para determinar la cantidad de UFC presentes durante el

crecimiento, se tomó 1 mL del cultivo que se utilizó para medir la D.O<sub>585</sub>. De estas alícuotas se tomaron 100 µL para realizar diluciones decimales ( $1 \times 10^{-1}$  a  $1 \times 10^{-6}$ ) en microtubos con 900 µL de solución salina estéril al 2.5% de NaCl. Posteriormente se tomaron 10 µL de cada dilución decimal a probar y se colocaron en cajas Petri con TSA 2.5% y se realizó el conteo de UFC luego de 12 y 24 h de incubación a 30° C. Se tomaron adicionalmente 400 µL para determinar el estado de esporulación en cada hora de prueba luego de la exposición de la muestra durante 20 min a 80° C, para lo cual se realizaron diluciones decimales y conteos de UFC de la misma forma en que se describe anteriormente. Finalmente, se utilizaron 500 µL que fueron filtrados con una membrana PVDF de 0.45 µm para la obtención del SLC que se evaluó con una prueba de actividad DAG, todo ello se realizó por triplicado.

## V. Extracción de compuestos antibacterianos

### 5.1 Extracción con resina y solventes orgánicos

La cepa *B. firmus* 41Bf se cultivó en dos matraces Erlenmeyer con 100 mL de medio TSB-2.5% incubados a 30° C durante 48 h en agitación constante a 160 rpm y se obtuvo el SLC de cada cultivo, que se colocó en matraces estériles. Para la adsorción del compuesto activo, a uno de los SLC se le agregó resina Amberlite XAD-16 (Sigma-aldrich) al 2%, mientras que, en el otro, se agregó resina Diadion HP-20 (Sigma-aldrich) al 2%, y se mantuvieron en agitación constante a 160 rpm a temperatura ambiente durante 2 h. Al finalizar el periodo, se filtraron las resinas con un filtro whatman #1 y se desechó el sobrenadante. Las resinas se lavaron con 10 mL de agua destilada. Los compuestos activos se eluyeron con 10 mL de una mezcla de isopropanol al 70% y 0.1% de ácido trifluoroacético, ajustado a pH 6 con NaOH 1M. El eluyente se evaporó por completo en un rotaevaporador (Yamato RE300) a 38-40° C, (Amersham Phamacia Biotech, Tokio en Pilasombut *et al.*, 2005). Para realizar la prueba de DAG frente a *S. iniae* 527, se probaron dos concentraciones de cada extracto, 1 mg/mL y 30 mg/mL resuspendidos en PBS 0.01M pH 7.

## 5.2 Precipitación de sobrenadante con sulfato de amonio

Se procedió a la obtención de los péptidos responsables de la actividad en el SLC de un cultivo de la cepa *B. firmus* 41Bf para realizar la caracterización de los péptidos y determinar los límites de acción de la actividad, evaluando diferentes condiciones.

A 250 mL de SLC de *B. firmus* 41Bf, se agregaron diferentes cantidades de sulfato de amonio (de acuerdo con los cálculos en la plataforma <https://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>) para obtener 20, 40, 60 y 80% de saturación respectivamente, realizando una precipitación seriada y manteniéndose a 4° C por 36 h para cada porcentaje. Simultáneamente, se realizó una segunda precipitación partiendo de 250 mL de SLC a 80% de saturación para comprobar la efectividad de la precipitación seriada. La muestra se obtuvo por centrifugación a 4000 rpm durante 30 min en tubos cónicos de 50 mL y se conservó el precipitado. Se tomó una muestra de 2 mL del sobrenadante para realizar la detección de los compuestos activos en cada una de las fracciones precipitadas. El precipitado se resuspendió en una centésima parte del volumen inicial del cultivo de producción de 41Bf, con PBS 0.01M a pH 7.0. La solución del precipitado y la muestra del sobrenadante, se dializaron con una membrana de 2 kDa (Dialysis tubing 10ft, 9mm, SIGMA-ALDRICH) previamente hidratada, en la que se depositó el total de la muestra resuspendida de cada precipitación. Esta fue sumergida en 1800 mL de la misma solución amortiguadora y se mantuvo a 4° C por 48 h con 4 recambios. El extracto crudo se almacenó a -20° C para su posterior análisis (Xie *et al.*, 2009). Se realizó además una prueba de DAG para confirmar la actividad de cada una de las precipitaciones.

Una tercera precipitación se realizó de un volumen de 1000 mL de SLC de un cultivo de *B. firmus* 41Bf, con 80% de saturación de sulfato de amonio bajo las condiciones antes mencionadas. Este se resuspendió en 6 mL de PBS 0.01M pH 7.0 para obtener una mayor concentración de compuestos activos.

Se cuantificó la cantidad de proteína total del extracto crudo con un kit

comercial (Pierce BCA protein assay kit, THERMO).

## VI. Caracterización del extracto proteico antibacteriano

### 6.1 Actividad residual de la exposición del extracto crudo a diferentes factores

Para la evaluación de la actividad residual, luego de la exposición a los tratamientos se empleó la siguiente formula:

$$\% \text{ ACT} = \frac{\sum ZT \times 100}{\sum ZC} = X$$

$$\% \text{ AR} = \sum ZC - X$$

Donde:

%ACT es el porcentaje de actividad del extracto crudo con tratamiento

$\sum ZT$  es el promedio del tamaño de las zonas de inhibición del tratamiento

$\sum ZC$  es el promedio del tamaño de las zonas de inhibición del control

X es el valor del porcentaje de actividad del extracto crudo con tratamiento

%AR es el porcentaje de actividad residual respecto al control

#### 6.1.1 Termoestabilidad

Para el análisis de la estabilidad térmica, una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  del extracto crudo de *B. firmus* 41Bf, se expuso a diferentes temperaturas de 37, 60 y 100° C por 2 h, a 121° C por 15 min y a 4° C por 30 días. Posteriormente se realizó una prueba de DAG para verificar la permanencia o ausencia de la actividad luego de la exposición a las temperaturas (Xie *et al.*, 2009).

#### 6.1.2 Efecto de pH y luz UV

Se determinó el efecto de los cambios de pH sobre la actividad antimicrobiana del extracto crudo de *B. firmus* 41Bf. Para ello se preparó una solución amortiguadora universal o Britton-Robinson (0.01M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.01M Na-citrate y 0.01M  $\text{H}_3\text{BO}_4$ ) que se ajustó a diferentes pH (3.0, 4.0, 7.0, 8.0, 11.0) con

HCl y NaOH, utilizando como controles las soluciones amortiguadoras a los diferentes pH. En cada caso se incubaron durante 2 h a 37° C. Posteriormente, el 50% del volumen de cada muestra se utilizó para la prueba de actividad sin la modificación de la condición del pH, mientras que el resto fue neutralizado a pH 7.0. Se realizó una prueba DAG para verificar la presencia o ausencia de actividad residual (Hernández-Saldaña *et al.*, 2020).

El tratamiento con luz UV consistió en la exposición directa de 100 µL del extracto crudo de *B. firmus* 41Bf a 254 nm durante 30 min en una campana de flujo laminar. Posteriormente las muestras se evaluaron con una prueba de DAG para corroborar la actividad (Zaghian *et al.*, 2012).

## 6.2 Electroforesis y bioautografía de geles de Poliacrilamida SDS-PAGE y Tricine-SDS-PAGE.

Muestras de 10 µL del extracto crudo de *B. firmus* 41Bf más 10 µL de solución amortiguadora de carga (Tris pH 6.8, SDS 10%, glicerol, azul de bromofenol y dicloro difenil tricloroetano) y los marcadores de peso molecular, se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 15% y 20%, usando dodecilsulfato sódico (SDS) y Tricina respectivamente como ion de arrastre (Laemmli, 1970; Haider *et al.*, 2012). La electroforesis con SDS se realizó durante aproximadamente 90 min a 100 V o hasta que el frente de corrida llegara al borde inferior del gel. Posteriormente el gel se enjuagó con agua corriente y se cortó verticalmente por la mitad. La primera parte del gel, que contenía las muestras y el marcador molecular (Lot specific MW, 120-20 kDa) fue teñida con una solución de azul de Coomassie (azul de Coomassie, isopropanol y ácido acético) durante 10 min y posteriormente se destiñó con varios enjuagues de agua corriente (Barboza-Corona *et al.*, 2007). En cada lavado se calentó el gel en un contenedor con agua corriente en microondas durante 1 min, se colocó un trozo de papel absorbente y se dejó agitar por 15 min (4 o 5 lavados fueron necesarios), una vez desteñido el gel se visualizó en un fotodocumentador (Gel Doc, XR+, BIO-RAD). La otra mitad del gel no fue teñida y se utilizó para la determinación directa de actividad de los compuestos proteicos, para lo cual se colocó en un contenedor estéril y se le dieron 4 baños con agua destilada estéril

durante 15 min cada uno. El gel se colocó sobre una caja de Petri estéril y fue cubierto con 20 mL de agar suave (12% agar) de TSA-2.5% previamente inoculado con 200 µL de la cepa patógena *S. iniae* 527 y se dejó solidificar a temperatura ambiente. La caja de Petri con el gel se incubó a 35° C por 24 h, para posteriormente determinar el peso molecular aproximado correspondiente a la zona de inhibición que formó el compuesto activo (Xie *et al.*, 2009). Una vez corroborado el peso aproximado del compuesto activo, se procedió a realizar el fraccionamiento del precipitado crudo, el cual se llevó a cabo mediante dos métodos. El primero a través de un sistema de ultrafiltración por desplazamiento con gas, utilizando membranas de 30 y 10 kDa (Millipore) y el segundo, por centrifugación utilizando tubos cónicos de 50 mL con membrana (Merck) de 30, 10 y 3 kDa con capacidad de 15 mL. Posteriormente con las fracciones se realizó el mismo procedimiento del gel SDS, pero con Tricina como amortiguador catiónico y un marcador de bajo peso molecular diferente (Thermo Scientific, Multicolor Low Range Protein Ladder, 40-1.7 kDa).

6.3 Evaluación de la presencia de compuestos proteicos en Cromatografía de capa fina y bioautografía.

Para verificar la presencia de aminoácidos en las fracciones proteicas, se utilizaron placas de sílica gel para cromatografía de capa fina (CCF) (4 x 5 cm). Se depositaron cuidadosamente aproximadamente 20 µL de extracto en la placa y se dejó secar. Posteriormente fueron colocadas en cámaras con 10 mL de una mezcla de 2-propanol y agua destilada en proporción 7:3 para un tratamiento (S1), 2-propanol, metanol y agua (7:2:1) como segundo tratamiento (S2), como tercer tratamiento (S3), butanol, acetona, agua y ácido acético (4:2:2:1) y como cuarto tratamiento (S4) acetonitrilo, agua y ácido trifluoroacético (7:3:0.1%), se utilizó una placa sin extracto como control. Una vez terminado el proceso de la fase móvil de aproximadamente 4 cm, la placa se dejó secar y se embebió en una solución de ninhidrina al 1%, se retiró el exceso y se dejó secar nuevamente. Finalmente, la placa fue revelada con calor en una plancha térmica a 100° C por aproximadamente por 5 min. Se probaron además variantes del sistema que mejor funcionó.

Una vez comprobada la presencia de compuestos revelados con la

ninhidrina, es decir, que correspondían a la presencia de aminoácidos, se procedió a evaluar que los compuestos teñidos evidenciaran la actividad antimicrobiana. El proceso de corrida se replicó, pero la placa de sílica gel no fue revelada con el colorante. Ésta se dejó secar totalmente, se aplicó luz UV por 20 min como medida de esterilidad y posteriormente se colocó con ayuda de unas pinzas estériles, sobre agar suave TSA-2.5% sólido, previamente inoculado con 200 µL de una suspensión de 527, entrando en contacto directo la superficie del agar con la sílica gel. Se incubó por 2 h a 4° C, se retiró la placa de la caja de Petri con unas pinzas estériles y se procedió a incubar por 24 h a 35° C.

Empleando placas de sílica gel de cristal, se repitió el procedimiento de tinción y bioautografía. Se utilizó el sistema 1 y, placas de 2 x 10 cm (Pruebas individuales) y 6 x 10 cm (pruebas comparativas).

## VII. Bioactividad de la fracción peptídica

### 7.1 Inhibición del crecimiento de cepas patógenas

Las pruebas de inhibición de cepas patógenas se realizaron en microplacas de 96 pozos, para ello se prepararon suspensiones de las cepas patógenas (Tabla 1) en 10 mL de solución salina estéril a una D.O<sub>585</sub> de 1. Se tomaron 500 µL de esta suspensión y se diluyeron en 9.5 mL de medio de cultivo TSB o TSB-2.5% (de acuerdo con los requerimientos de la cepa patógena) agitando vigorosamente para homogenizar. Se depositó un volumen final de 175 µL de la dilución en cada pozo de la microplaca y se agregaron 25 µL de la fracción peptídica como tratamiento, se prepararon un blanco (200 µL medio de cultivo sin inocular), un control de corrección de color (175 µL medio de cultivo sin inocular con 25 µL de la fracción peptídica) y un control positivo (200 µL de la dilución de la cepa patógena). Se probó una concentración final de 25 y 100 µg de la fracción peptídica. Todas las muestras se prepararon por triplicado. Se incubaron a 30° C en un lector de microplacas (Infinite M1000 PRO, Tecan) por 24 h, tomando lecturas múltiples de absorbancia a 600 nm en intervalos de 1 h.

Para determinar la concentración mínima inhibitoria de la fracción peptídica,

se probaron 50, 10, 1, 0.1 y 0.01 µg de concentración total frente a *S. iniae* 527 en una prueba de microplaca como se menciona anteriormente. Las concentraciones se probaron por triplicado.

## 7.2 Evaluación de la inhibición en la formación de biopelículas

Para evaluar la capacidad del extracto en la inhibición de la formación de biopelículas en el caso de patógenos de humanos y bacterias marinas formadoras de biopelículas del cepario del Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular del CICIMAR-IPN, se siguió el mismo procedimiento que en el apartado 7.1. Posterior al periodo de incubación, se siguió la metodología de tinción de biopelículas propuesta por Álvarez *et al.*, (2006) y se procedió a estimar el porcentaje de inhibición.

## 7.3 Evaluación de la interacción con cepas relacionadas

Se probó la actividad de la fracción F3 frente a diez bacterias pertenecientes al género *Bacillus* y la cepa *B. firmus* 41Bf mediante una prueba de DAG, para determinar el efecto antagonista del extracto con las bacterias relacionadas y frente a la bacteria productora.



## RESULTADOS

### I. Selección preliminar de cepas productoras de compuestos antibacterianos

En las pruebas de difusión en pozo, a pesar de que, si se observan halos de inhibición, no exhibieron el potencial de producción de algunas de las cepas, como se pudo observar en la prueba con DAG, por lo que solo se tomaron en consideración los resultados obtenidos con esta última prueba, la cual se utilizó para corroborar la presencia de actividad durante todo el proceso de experimentación.

De las 167 cepas de *Bacillus* probadas, 58 cepas fueron consideradas como potenciales productoras de compuestos con actividad antibacteriana, evidenciando la formación de halos de inhibición frente a por lo menos uno de los diferentes patógenos probados. Sin embargo, al probar los SLC sólo la cepa 16 (*Bacillus* sp) mantuvo la actividad antibacteriana. En el resto de los casos no se observó la formación de zonas de inhibición en las pruebas de DAG (Figura 1), por lo cual se probaron diferentes metodologías para la recuperación de los compuestos responsables de la actividad.

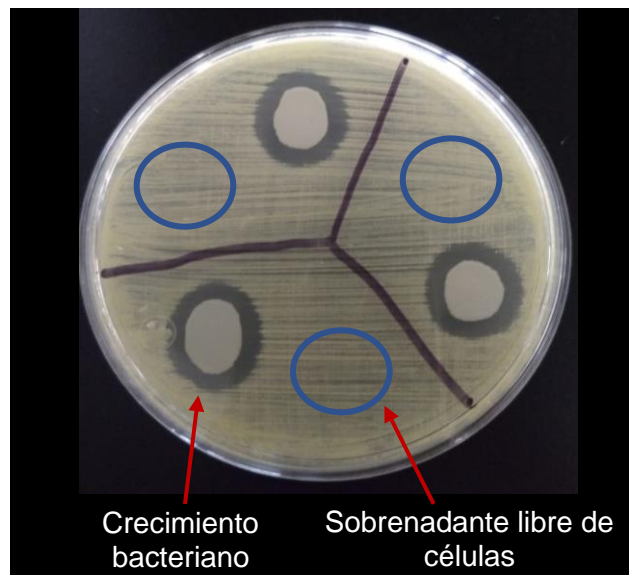


Figura 1.- Prueba de difusión en agar de la cepa *Bacillus firmus* (41Bf) frente a *Streptococcus iniae* (527), en la que se observan los halos de inhibición alrededor del crecimiento de las células de *Bacillus* en el medio. Los círculos azules corresponden a la muestra del sobrenadante libre de células, en donde no se observa presencia de actividad.

De las cepas con las que se evidenció la presencia de halos de inhibición con el crecimiento de las bacterias, es decir, antes de la filtración, se seleccionó aquella que presentaba mejor inhibición para realizar las pruebas preliminares antes de la elección del método de cultivo y obtención de compuestos activos. Finalmente, la cepa 41Bf (*Bacillus firmus*), fue la candidata para estas pruebas (Figura 1). Lo mismo se realizó para los patógenos, seleccionando aquel que fue sensible frente a la mayor cantidad de cepas de *Bacillus*, siendo el patógeno 527 (*Streptococcus iniae*) el utilizado como cepa indicadora.

## II. Obtención de compuestos antibacterianos

### 2.1 Producción de compuestos activos

No se observó la presencia de zonas de inhibición en las pruebas de DAG con los SLC de los medios de cultivos evaluados a 24 o 48 h. Sin embargo, se decidió realizar todos los cultivos y pruebas posteriores en medio tripticaseína de soya ya que es el medio de cultivo más utilizado reportado en la literatura.

### 2.2 Inducción de la producción de compuestos activos e inhibición del crecimiento de la cepa patógena

La prueba de inducción de actividad empleando el SLC de un cultivo de la cepa patógena, que fue adicionado en el cultivo celular de *B. firmus* 41Bf, no exhibió la presencia de compuestos extracelulares activos en el SLC luego del periodo de incubación, ya que no se observaron zonas de inhibición en la prueba de DAG.

El SLC de *B. firmus* 41Bf que se adicionó en el cultivo celular de la cepa patógena *S. iniae* 527, no evidenció la formación de zonas de inhibición en la prueba DAG. Demostrando de esta manera que la sustancia activa no era producida por el patógeno influenciado por el *Bacillus* y que además no se encontraba el compuesto activo como producto extracelular en el SLC de *B. firmus* 41Bf.

En el co-cultivo de la cepa *B. firmus* 41Bf y *S. iniae* 527, se evidenció la inhibición total de la cepa patógena, ya que no se observó la presencia de UFC de éste en el cultivo en ninguna de las diluciones de la muestra (colonias fáciles de

identificar por el color y morfología de cocos en tinción Gram), sin embargo, el SLC del co-cultivo de ambas bacterias, no evidenció la presencia de los compuestos activos.

### 2.3 Productos extracelulares

Se obtuvieron los productos extracelulares utilizando diferentes medios de cultivo para evaluar la estimulación de la producción. Se recuperaron para AM 0.02 g, para TSA-2.5% 0.25 g, para TSAPyB (co-cultivo de 41Bf y 696 en TSA-2.5%) 0.14 g y para AMPyB (co-cultivo de 41Bf y 696 en AM) 0.01 g. Se obtuvo mayor biomasa en un medio de cultivo más rico, como lo es el TSA, pero en la prueba antagónica, la producción de biomasa disminuyó poco más del 50% en el mismo medio de cultivo. En todos los casos, la biomasa recuperada se resuspendió en 1 mL de PBS. Sin embargo, no se observaron zonas de inhibición con el SLC. En el caso del co-cultivo en la caja de Petri, puede observarse la formación de una zona de inhibición (Figura 2), aunque no se recuperaron los compuestos activos mediante este método. Por lo anterior, se consideró un método no efectivo para la recuperación de los compuestos activos en este trabajo.

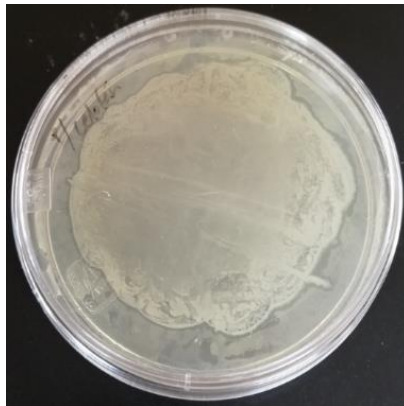


Figura 2.- Co-cultivo de la cepa *B. firmus* (41Bf) y la cepa patógena *S. iniae* (527) para obtención de productos celulares en membrana de celulosa, en la que se observa el halo de inhibición.

#### 2.4 Evaluación de la influencia del tamaño de inóculo, salinidad y temperatura en la producción de compuestos activos

No se observó actividad antimicrobiana en el SLC de los cultivos realizados a partir de volúmenes del inóculo de 1 y 5 mL a ningún tiempo de evaluación (0, 24, 48 y 72 h), en ninguna temperatura de incubación, ni bajo diferentes concentraciones de NaCl. Lo mismo se observó para los inóculos de 20 mL que se mantuvieron a 4° C entre los periodos de prueba a las 0, 24 y 48 h. La única condición que fue efectiva para recuperar los compuestos activos en el SLC fue en el caso del cultivo con inóculo de 20 mL almacenado a 4° C durante 72 h (Tabla 2), manteniendo la actividad en todas las concentraciones de NaCl evaluadas e incubadas a las diferentes temperaturas, presentando zonas de actividad de mayor tamaño a 30° C. A pesar de que la cepa *B. firmus* 41Bf es capaz de producir el compuesto activo en un amplio rango de salinidad, se decidió continuar con 2.5% de concentración de NaCl en el medio de cultivo por el origen marino de las cepas a evaluar.

El uso de membranas de acetato de celulosa disminuyó ligeramente la zona de inhibición que genera el SLC, por lo que todos los filtrados a partir de este punto se realizaron con membranas PVDF de 0.45 µm, por la eficiencia en el filtrado y debido a que poseen una baja afinidad a proteínas de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

Tabla 2.- Cepas de *Bacillus* productoras de compuestos extracelulares activos. Donde se presentan el origen de las cepas: ventilas hidrotermales (VH), Biopelículas de placas experimentales (BPE) y biopelículas de rocas costeras (BRC); la respuesta a los métodos para la obtención de compuestos activos en sobrenadantes libres de células y la naturaleza proteica del compuesto activo.

PRUEBA DE MÉTODOS PARA LA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS ACTIVOS					
Cepa	Clave	Origen de aislamiento	Cambio de pH	Inóculo 20/72	Proteólisis
<i>B. paralicheniformis</i>	85	VH-EI Sargento, BCS	+	+	-
<i>B. paralicheniformis</i>	108	VH-Santispac, BCS	+	+	-
<i>B. licheniformis</i>	117	VH-EI Sargento, BCS	+	+	-
<i>B. licheniformis</i>	51	VH-Mapachitos BCS	+	+	-
<i>B. oceanisedimenis</i>	55	VH-Mapachitos BCS	+	-	-
<i>B. licheniformis</i>	89	VH-Mapachitos, BCS	+	+	-
<i>B. aerius</i>	101	VH-Santispac, BCS	+	-	-
<i>B. licheniformis</i>	83	VH-EI Sargento, BCS	+	-	-
<i>Bacillus sp.</i>	39K	VH-Mapachitos, BCS	+	-	-
<i>B. licheniformis</i>	114	VH-EI Sargento, BCS	+	+	-
<i>B. licheniformis</i>	82	VH-Mapachitos, BCS	+	+	-
<i>Brevibacillus thermoruber</i>	119	VH-EI Sargento, BCS	+	+	-
<i>B. firmus</i>	40K	VH-Mapachitos, BCS	+	+	-
<i>B. licheniformis</i>	86	VH-EI Sargento, BCS	+	-	-
<i>B. subtilis</i>	20BS	BPE-La Paz, BCS	+	-	-/+
<i>B. firmus</i>	41Bf	BRC-Campeche, CAM	+	+	+
<i>Bacillus sp.</i>	11E	BPE-La Paz, BCS	+	-	-
<i>Bacillus sp.</i>	18E	BPE-La Paz, BCS	+	+	-/+
<i>Bacillus sp.</i>	8E	BPE-La Paz, BCS	+	-	-

## 2.5 Modificación de pH

Luego de la modificación del pH al finalizar el cultivo, pudo observarse la presencia de actividad frente a la cepa patógena, teniendo una actividad mayor a pH 6.0, con una zona de inhibición promedio de 2.18 cm de diámetro (Figura 3), mientras que a pH 5.0, el diámetro de la zona de inhibición es de 1.31 cm. Se estableció utilizar el pH 6.0 para realizar las pruebas con las otras 57 cepas activas.



Figura 3.- Prueba de difusión en agar con el sobrenadante libre de células luego del cambio a pH a 6.0 y neutralizado de la cepa *B. firmus* (41Bf) frente a *S. iniae* (527).

De acuerdo con los resultados, para el cultivo y obtención de compuestos con actividad antibacteriana en los SLC de las 57 cepas de *Bacillus* restantes de las 58 identificadas como productoras de compuestos activos por la formación de halos de inhibición en la selección preliminar, se probaron las condiciones en las que se recuperaron eficientemente los compuestos activos en el SLC de la cepa modelo *B. firmus* 41Bf, que fue el inóculo 20/72 y el ajuste a pH 6.0 al finalizar el cultivo. Se probaron ambos tratamientos con cada una de las cepas restantes, de las cuales sólo 19 cepas presentaron actividad en el SLC con uno o ambos tratamientos. Once cepas presentaron actividad en ambas condiciones y ocho cepas exclusivamente con el cambio de pH (Tabla 2).

### III. Evaluación de la naturaleza del compuesto antibacteriano a través de la proteólisis de sobrenadantes activos

Los 19 SLC de las cepas que mostraron actividad fueron tratados con enzimas proteolíticas (Tabla 2). La actividad antimicrobiana luego del tratamiento resultó nula para dos cepas de *Bacillus* (41Bf y 20Bs) y con pérdida de actividad evidente para 18E, dejando de manifiesto el carácter proteico de las sustancias antibacterianas producidas por ellas (Figura 4).

De las enzimas proteolíticas ensayadas, con la proteinasa K, la tripsina y el Mix, se evidenció la pérdida de actividad total, mientras que con la papaína fue una pérdida de actividad parcial.

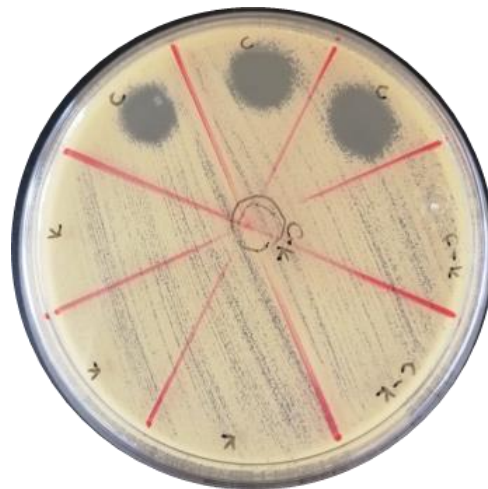


Figura 4.- Proteólisis del sobrenadante libre de células por proteinasa K, donde c) corresponde a la muestra sin tratar, k) al tratamiento con la enzima y c-k) al control de la solución amortiguadora y la enzima.

Debido a la variabilidad en la producción de compuestos por parte de las cepas 20Bs y 18E, y ya que los mejores resultados se obtuvieron con la cepa *B. firmus* 41Bf, se decidió continuar únicamente con la caracterización del compuesto activo producido por esta última cepa.

IV. Caracterización de la cepa de *Bacillus* productora de compuestos activos de tipo proteico.

La cepa 41Bf identificada como *Bacillus firmus* (strain GA512, 16S ribosomal ARN gene, 100% identity, access: MT214139.1, E value 0.0) y que corresponde a la cepa aislada de las rocas de la zona intermareal de la costa de Campeche, México (MC3B-22), presentó una curva bifásica de crecimiento durante el periodo de experimentación, es decir, entre las 0 y 60 h (Figura 5), la primera curva entre las 0 y 40 h, y la segunda a partir de las 40 h. El cultivo se inició con una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  del inóculo tratado a 4° C por 72 h, con una densidad de  $4.78 \times 10^3$  UFC (hora cero) y alcanzando la fase estacionaria del crecimiento entre las 12 y 20 h, con un valor promedio aproximado de  $4.5 \times 10^8$  UFC/mL.



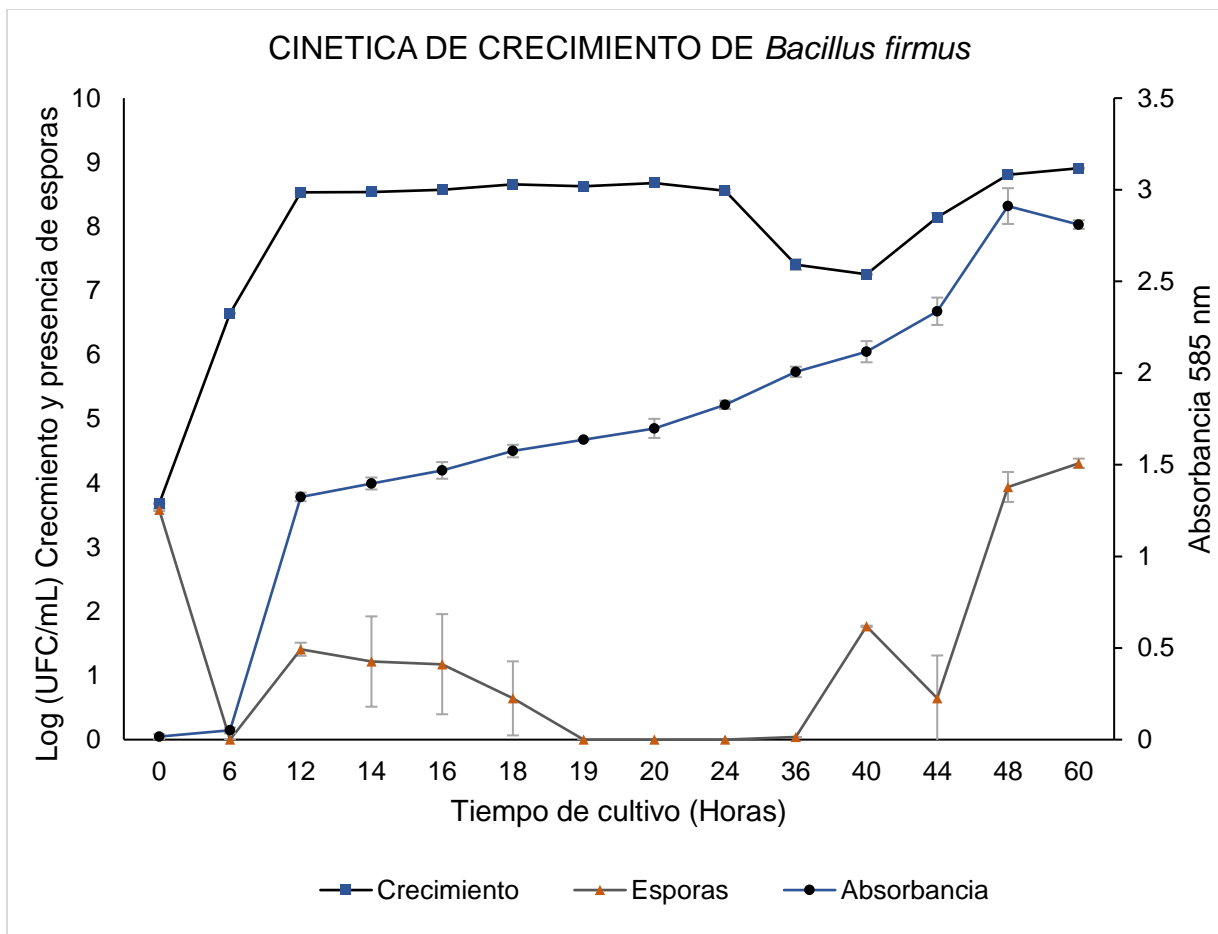


Figura 5.- Evaluación del crecimiento celular de *Bacillus firmus* en medio de cultivo tripticaseína de soya adicionado con 2.5% de NaCl durante 60 h a 30° C en agitación constante a 160 rpm.

En cuanto a la producción del compuesto activo por la cepa *B. firmus* 41Bf, se identificó que la producción comienza durante la fase estacionaria e incrementa conforme decrece la población en la fase de muerte, teniendo la mayor concentración evidente en una densidad promedio de  $7.9 \times 10^7$  entre las 40 y 44 h. Las zonas de inhibición se evidencian a partir de las 19 h de cultivo, presentando la mayor actividad entre las 40 y 44 h y la disminución documentada a partir de las 60 h de cultivo, esto basado en el tamaño del diámetro de los halos de inhibición (Figura 7). La esporulación en el tiempo de cultivo se observó luego de la inactivación a 80° C en las primeras 18 h de cultivo, con una densidad decreciente de entre 3800 y 4

UFC/mL, y posteriormente en las horas 36 a 60, alcanzando una densidad máxima de hasta 20,000 UFC/mL.

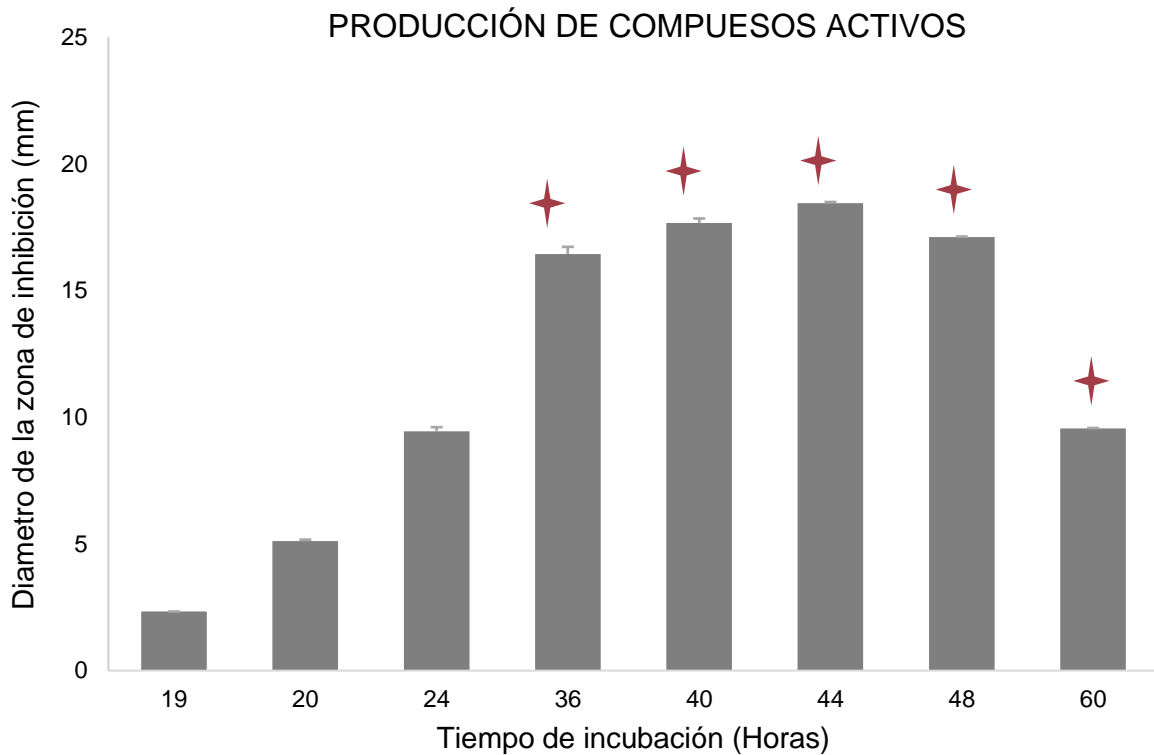
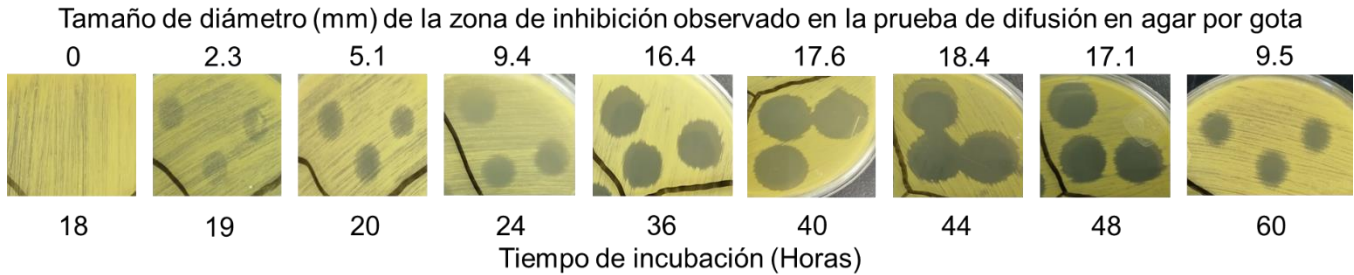


Figura 6.- Evaluación de la producción del compuesto activo durante el cultivo celular, donde se presentan los valores del tamaño de las zonas de inhibición a diferentes horas. La estrella roja sobre las barras indica la presencia de esporas en el cultivo.

Las horas de cultivo en las que se corroboró la mayor producción de compuestos activos en el SLC, fueron aquellas que se encontraban al final de la primera parte de la curva bifásica de crecimiento de la cepa *B. firmus* 41Bf y en las

que se observó esporulación. Sin embargo, en las horas de no esporulación, tal es el caso de la hora 19, 20 y 24 también se evidenció la presencia del compuesto activo, aunque las zonas de inhibición eran difusas y pequeñas.

## V. Extracción de compuestos antibacterianos

### 5.1 Extracción con resina y solventes orgánicos

La extracción de los compuestos extracelulares utilizando las resinas Amberlite XAD-16 y Diaion Hp-20 fue un proceso rápido y con rendimientos de 1085 y 695.2 mg respectivamente.

En el caso de la extracción con resina Amberlite XAD-16, no se observó la formación de halos de inhibición a una concentración de 1 mg/mL, pero sí exhibió actividad con la concentración de 30 mg/mL. Se observó el mismo comportamiento con el extracto de resina Diaion Hp-20, donde se presentaron halos de inhibición únicamente en la concentración de 30 mg/mL.

Se observaron halos de inhibición de mayor tamaño con el extracto obtenido con la resina Diaion Hp-20 en comparación con el extracto con la resina Amberlite XAD-16 (Figura 7) a pesar de que se recuperó una menor cantidad de extracto.

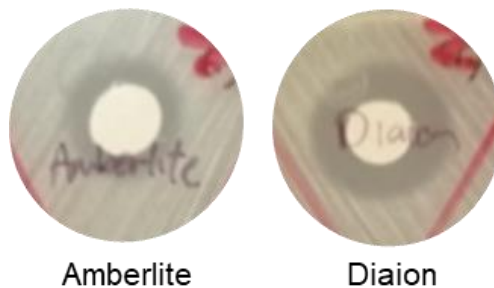


Figura 7.- Diferencia en el tamaño de los halos de inhibición correspondiente a las extracciones con resina.

### 5.2 Precipitación de sobrenadantes con sulfato de amonio

Se corroboró que el método es adecuado para la extracción de los compuestos responsables de la actividad en el SLC de la cepa *B. firmus* 41Bf, por lo cual, se continuó con el fraccionamiento por la adición seriada e individual de los porcentajes de sulfato de amonio.

En la precipitación seriada establecida (20-80%), las cuatro fracciones presentaron actividad frente a las dos cepas patógenas seleccionadas (Figura 8). Se probaron también los sobrenadantes dializados de todas las fracciones para verificar la presencia o ausencia de la actividad y se determinó que únicamente a partir del 80% ya no se observa la presencia de compuestos activos, por lo que se decidió trabajar con 80% como porcentaje final de precipitación para recuperar la mayor cantidad de compuestos activos.

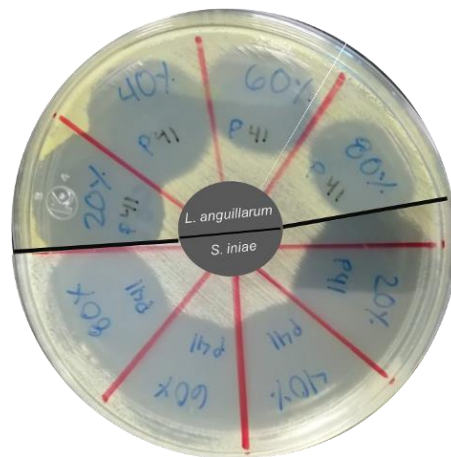


Figura 8.- Evaluación de los diferentes porcentajes de precipitación, donde se presentan las zonas de inhibición observadas para *Listonella anguillarum* (696) en la parte superior de la figura y *Streptococcus iniae* (527) en la parte inferior.

Del tratamiento con sulfato de amonio, se obtuvo una solución color ámbar claro, con precipitado grisáceo evidente luego de la diálisis y con una cantidad de compuestos proteicos superior a los 20 mg/mL a partir de un volumen de 500 mL de SLC (Figura 9). Se probó el proceso de precipitación en dos condiciones, la primera en agitación constante a 70 rpm manteniéndose a 12° C y la segunda, en la que no se empleó agitación y se mantuvo a 4° C. Se observaron zonas de inhibición ligeramente más grandes con el precipitado de la segunda condición, por lo que se utilizó para el resto de las precipitaciones.

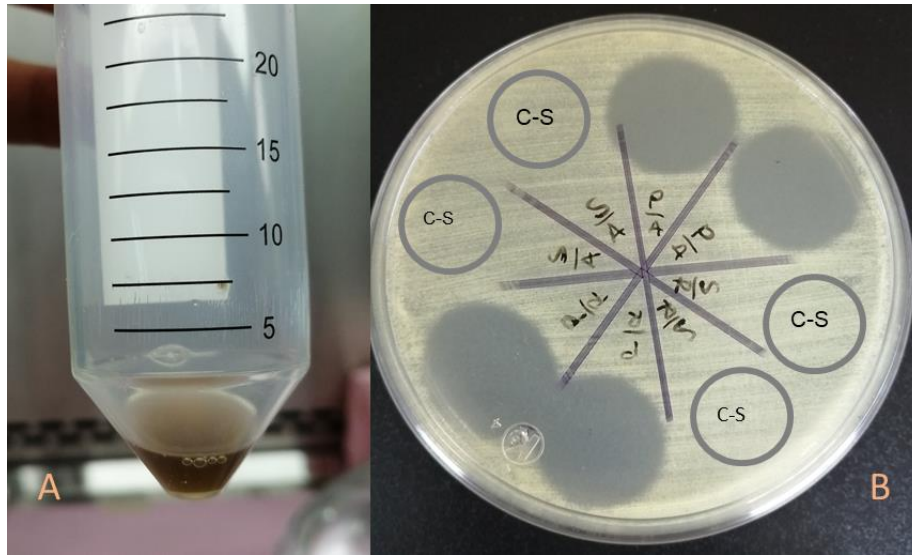


Figura 9.- Extracción y prueba de compuestos activos. Donde A) Extracto crudo obtenido a 80% de saturación de sulfato de amonio y B) prueba de difusión en agar para evidenciar la presencia de actividad en el extracto. Los círculos grises muestran el área del sobrenadante luego de la precipitación, confirmando la precipitación total del compuesto activo.

## VI. Caracterización del extracto proteico

### 6.1 Actividad residual del extracto luego de la exposición a diferentes factores

#### 6.1.1 Termoestabilidad

El compuesto activo es termorresistente, ya que luego de las exposiciones a las diferentes temperaturas por un periodo prolongado no perdió la actividad. Sin embargo, se observa una ligera disminución en la exposición a 100° C luego de las 2 h de exposición. En el caso de las muestras que se trataron a 121° C, después del tiempo de exposición de 15 min, no se observó una pérdida importante de actividad, manteniendo una actividad residual de 96.63% (Tabla 3).

Tabla 3.- Caracterización parcial del extracto crudo, donde se presentan los porcentajes de la actividad residual luego de los distintos tratamientos de acuerdo con los tamaños de diámetro de las zonas de inhibición.

#### CARACTERIZACIÓN DEL PRECIPITADO

Tratamiento	Actividad Residual			
		30° C/ 120 min	60° C/ 120 min	100° C/ 120 min
Térmico	100%	95.19% ± 2.68	79.16% ± 5.0	96.47% ± 3.92
	3.0 / 120 min	4.0 / 120 min	8.0 / 120 min	11.0 / 120 min
pH	98.3% ± 4.79	93.25% ± 2.57	109.74% ± 4.03	85% ± 1.30
	Incidencia de luz UV 254 nm / 30 min			
UV	98.10% ± 0.48			

#### 6.1.2 Efecto de pH y luz UV

La modificación de pH en las muestras no interfirió en la formación de zonas de inhibición, sin importar que mantuviera la influencia directa de pH o que fuera neutralizado antes de realizar las pruebas de DAG (Tabla 3). Se pudo observar la presencia de zonas de inhibición en todos los pH probados luego de las 2 h de prueba, donde se observa el menor porcentaje de actividad residual a pH 11.0 con 85% y un máximo de 109% a pH 8.0, siendo superior al control de pH 7.0.

La exposición de la muestra a la luz UV, no evidenció una pérdida importante de actividad, ya que mantuvo 98.1% de actividad residual luego del tratamiento por 30 min (Tabla 3). Esto nos permitió además utilizar este tratamiento como medida de esterilidad para la bioautografía de CCF que se presenta más adelante.

## 6.2 Electroforesis y bioautografía de geles de poliacrilamida SDS-PAGE y Tricine-SDS-PAGE

De acuerdo con la formación de zonas de inhibición en la bioautografía del gel SDS-PAGE, la actividad corresponde a una banda de un compuesto de bajo peso molecular menor a 20 kDa (Figura 10). Esto determinó la necesidad del fraccionamiento del compuesto activo e identificar el tamaño aproximado de éste en geles SDS-Tricine-PAGE.

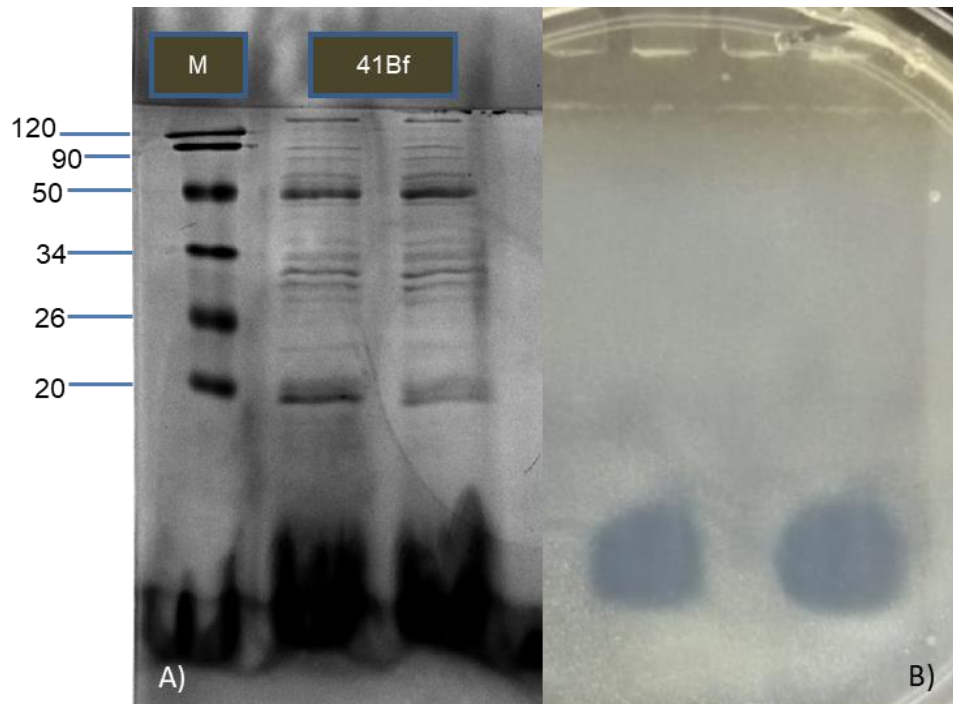


Figura 10.- Bioautografía del perfil cromatográfico de los compuestos producidos por *B. firmus* (41Bf) en gel SDS-PAGE al 12% frente a *Streptococcus iniae* (527). Donde A) corresponde al perfil cromatográfico de los compuestos y el marcador de peso molecular, y B) las zonas de inhibición observadas en la bioautografía, correspondientes a compuestos de peso molecular inferior a 20 kDa.

Del primer método de fraccionamiento del extracto crudo se obtuvieron tres fracciones: la fracción que comprendía los compuestos de mayor tamaño >30 kDa, de tamaño intermedio entre 10 y 30 kDa y finalmente la fracción de menor tamaño <10 kDa. Del segundo fraccionamiento se obtuvieron 4 fracciones, >30 kDa (F1), 10 a 30 kDa (F2), 3 a 10 kDa (F3) y <3 kDa (F4).

Con la prueba de DAG realizada a todas las fracciones obtenidas con ambos métodos, a excepción de la fracción F4, se observó la presencia de zonas de inhibición, por lo que se determinó que ninguno de los métodos es ideal para realizar una purificación parcial del extracto crudo. La ultrafiltración es menos eficaz en este caso debido a que el extracto es susceptible a la contaminación y el aparato para ultrafiltración no es un sistema estéril. Por lo que las fracciones de mayor tamaño presentaron contaminación. En el caso de los tubos con membrana, estos son un sistema estéril y de manejo fácil en comparación con el aparato de ultrafiltración.

La fracción F1 se resuspendió y se centrifugó en tres o cuatro ocasiones para concentrar la mayor cantidad de compuesto activo en las fracciones inferiores, con concentraciones de proteína total de 10.7 mg/mL en F1, 6.3 mg/mL en F2 y 5.01 mg/mL en F3.

En la evaluación de las fracciones en el gel SDS-Tricine-PAGE se observa la presencia de una banda similar en todas ellas, que corresponde a un peso molecular entre los 5-7 kDa y evidencia la formación de zonas de inhibición en la bioautografía (Figura 11).



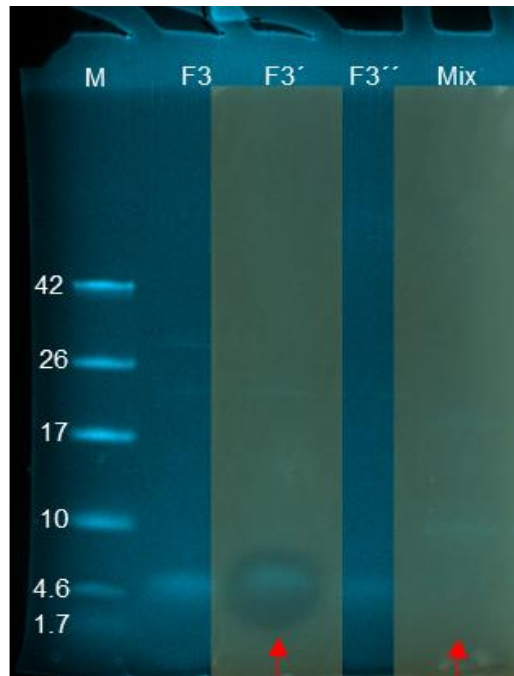


Figura 11.- Perfil electroforético de la fracción F3 del extracto de *B. firmus* (41Bf) en gel SDS-Tricine-PAGE al 20%. Donde M) marcador molecular y los correspondientes valores en kDa, F3-F3'') las réplicas de la fracción F3 y Mix) que corresponde a la proteólisis de la fracción. Las flechas rojas indican el resultado de la bioautografía donde se observa la zona de inhibición sobre la banda de bajo peso molecular en F3' y la ausencia de la zona de inhibición para la proteólisis de la fracción en Mix.

### 6.3 Evaluación de la presencia de compuestos proteicos por Cromatografía de capa fina (CCF) y bioautografía.

Se corroboró la naturaleza proteica de las fracciones a través de una cromatografía de capa fina, donde ninguno de los sistemas evidenció ser el adecuado para la separación de los compuestos. De todos los sistemas probados como fase móvil, el que permitió una mejor separación de los compuestos fue el S1, donde pudieron observarse seis compuestos con diferentes RF.

Tabla 4.- Valores de RF del perfil cromatográfico de los compuestos en placas de silica gel, donde se presentan de modo ascendente desde el punto de carga hasta el frente de corrida.

Compuesto	RF
1	0
2	0.04
3	0.1
4	0.23
5	0.5
6	0.6
7	0.77

Con la tinción de la placa de cromatografía se pudo corroborar la presencia de aminoácidos en los compuestos que fueron separados por capilaridad. La placa que no se tiñó y que se empleó para la bioautografía evidenció la formación de tres zonas de inhibición a diferentes RF. 0.7 para la zona superior, 0.23 para la zona intermedia y la zona inferior encontrándose en la base de la corrida. Estas zonas de inhibición coinciden con los compuestos que se tiñeron con el colorante y son consistentes en las tres fracciones (Figura 12). Indicando que, si se tratase de diferentes compuestos, todos ellos comparten un peso molecular similar de acuerdo con las pruebas realizadas en geles de poliacrilamida y por lo tanto *Bacillus firmus* es capaz de producir varios compuestos que inhiben el crecimiento del patógeno y que son de naturaleza proteica.



Figura 12.- Sobreposición de la placa teñida con el resultado de la bioautografía de la cromatografía en capa fina. Donde se observan los resultados para las fracciones 1 (3-9 kDa), 2 (10-30 kDa) y 3 (+30 kDa), en orden ascendente de derecha a izquierda.

## VII. Bioactividad de la fracción activa

### 7.1 Inhibición del crecimiento de patógenos

Las pruebas de actividad realizadas en medio líquido en microplacas, mostraron resultados diferentes a las obtenidas con las pruebas de DAG, ya que se observó la inhibición del crecimiento de patógenos que no pudo demostrarse en las pruebas de difusión en agar (Tabla 4).

Tabla 5.- Inhibición del crecimiento de los patógenos luego de pruebas de difusión en agar (medio solido) y en medio líquido en microplacas de 96 pozos por 24 h con la fracción F3.

### INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

Patógeno	Medio solido	Medio líquido
<i>Streptococcus iniae</i>	+	100%
<i>Aliivibrio fischeri</i>	-	27.2% ± 4.83
<i>Enterobacter</i> sp	-	N/P
<i>Aeromonas hydrophyla</i>	-	14.8% ± 13.3
<i>Aliivibrio salmonicida</i>	+	100%
<i>Citrobacter freundii</i>	+	100%
<i>Edwardsiella tarda</i>	-	4.33% ± 1.16
<i>Listonella anguillarum</i>	+	100%
<i>Photobacterium damsela</i>	+/-	14.07% ± 0.75
<i>Shewanella xiamanensis</i>	-	117.11% ± 14.84
<i>Streptococcus</i> sp.	+	100%
<i>Vibrio peneicida</i>	+	82.1% ± 7.71
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> 17802	-	0%
<i>Aeromonas caviae</i>	-	N/P
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> M1, M8, G4, G6, G7, G9, G10 y CVP2	-	N/P
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	32.45% ± 3.91
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	24.21% ± 0.57
<i>Escherichia coli</i>	-	7.75% ± 7.08
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	7.11% ± 2.51
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> clínica	-	0%
<i>Salmonella enterica</i>	-	8.6% ± 0.93
<i>Candida albicans</i>	-	N/P

---

Donde en medio líquido se evaluó la diferencia porcentual respecto al crecimiento del control con los tratamientos y en medio sólido se evalúa la presencia (+) o ausencia (-) de halos de inhibición. N/P) representa a las cepas no evaluadas en ese medio.

Las cepas que fueron más sensibles al efecto antimicrobiano del compuesto activo en la fracción F3 fueron *Streptococcus* sp, *Streptococcus iniae*, *Aliivibrio salmonicida*, *Aliivibrio fischeri*, *Listonella anguillarum*, *Citrobacter freundii*, y *Vibrio peneicida*. El resto de los patógenos no evidenciaron más del 50% de inhibición.

## 7.2 Evaluación de la inhibición en la formación de biopelículas

La evaluación de la formación de biopelículas se realizó con las cepas patógenas *Salmonella* sp, *S. enterica*, *P. aeruginosa* ATCC y clínica, *Staphylococcus epidermidis* y *S. aureus*. En la Figura 13, se presentan los porcentajes de inhibición tanto del crecimiento como de la formación de biopelículas por cepa, donde se observa que para *S. aureus* no se observó inhibición de biopelículas o muy poco como en el caso de *P. aeruginosa* ATCC, pero sí inhibió el crecimiento en ambos casos, siendo superior al 30% para *S. aureus*. La mayor inhibición en la formación de biopelículas se observó en *S. enterica* (92%), seguida de *Salmonella* sp (81%) y *P. aeruginosa* (75%), pero con un nulo o pequeño porcentaje de inhibición en el crecimiento. Para *S. epidermidis*, la inhibición en ambos casos también varía siendo superior en la inhibición de biopelículas. Para el aislado clínico de *P. aeruginosa* no se observa disminución en el crecimiento mientras que observa cerca de un 75% de inhibición en la formación de biopelículas.

## Inhibición de la formación de biopelículas y crecimiento

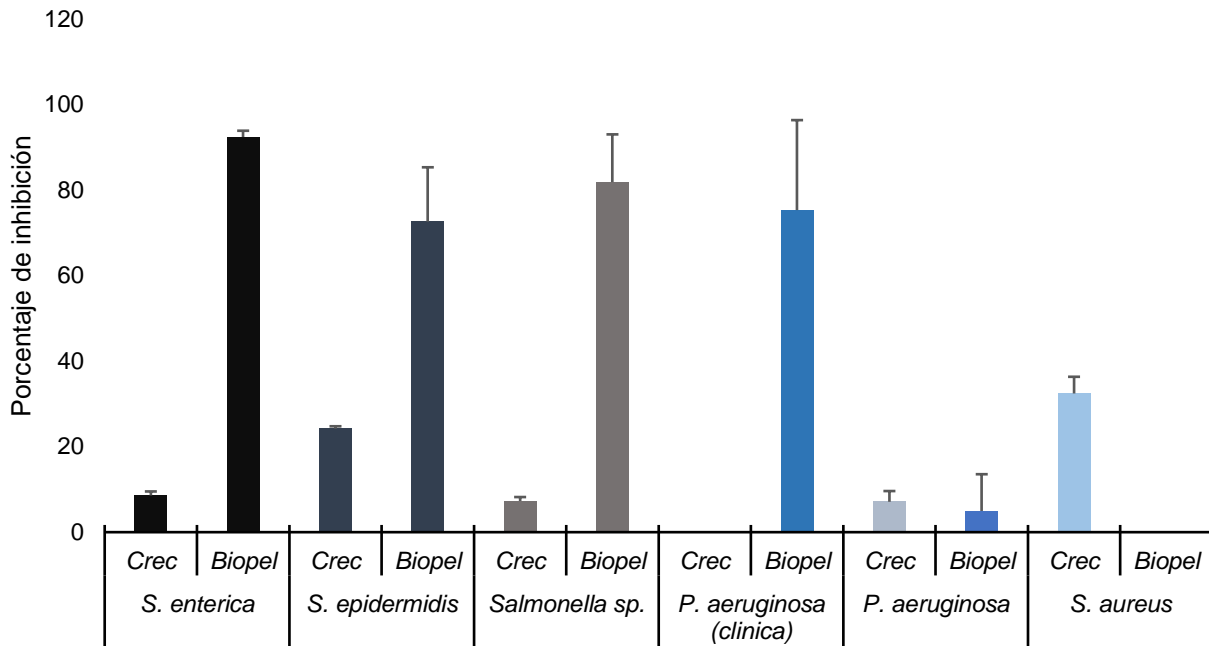


Figura 13.- Porcentajes de inhibición en el crecimiento y formación de biopelículas en cepas patógenas.

### 7.3 Interacción con cepas relacionadas

De acuerdo con la evaluación de las cepas de *Bacillus*, el extracto evidenció la formación de zonas de inhibición en todos los casos. Se evaluaron cinco cepas de *Bacillus subtilis*, además de *B. aerophilus*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. tequilensis*, *B. licheniformis* y *B. firmus*, así como la cepa productora, con la que también resultó ser activo el extracto, pero que en el caso del sobrenadante activo apenas se aprecian las zonas de las gotas medianamente claras.

## DISCUSION

El objetivo de este trabajo fue evaluar la producción de compuestos antimicrobianos en cepas de *Bacillus* aisladas de ambiente marinos y corroborar su origen proteico. No obstante, de acuerdo con nuestros resultados, no se cuentan con bases para aseverar que los compuestos con actividad antimicrobiana evaluados en todas las cepas sean principalmente de origen proteico. Sin embargo, no se rechaza la hipótesis de trabajo en su totalidad por varias razones, la primera es que no se probó una batería grande de enzimas proteolíticas, la segunda, porque quizá era necesaria la influencia del competidor durante el cultivo para algunas cepas y tercera, no se recuperaron los compuestos antimicrobianos en los SLC del total de las cepas con actividad antibacteriana, lo que pudo influir en la cantidad de cepas que evidenciaron la producción de péptidos activos.

En el presente estudio, de 167 cepas de *Bacillus* evaluadas, 58 mostraron actividad antimicrobiana frente a por lo menos uno de los patógenos evaluados. En comparación con otros estudios prospectivos, en este trabajo se obtuvo cerca del 20.8% de cepas de *Bacillus* que presentaron actividad antimicrobiana consistente y 8.2% de las cepas que mantuvo la actividad en los SLC, esto pudiendo estar determinado por la influencia que ejerce el antagonista sobre la producción de los compuestos activos pero que no se evaluó para las 167 cepas de *Bacillus* utilizadas en este trabajo. En trabajos como el de Prieto *et al.* (2012), de 303 cepas aisladas, sólo siete presentaron actividad, ellos lo atribuyen a la distribución geográfica y a los criterios de selección de las muestras, mencionando que es una cifra baja de aislados que presentan actividad antimicrobiana en comparación con otros estudios, sin embargo, las cepas que ellos logran aislar en todos los casos fueron sensibles a la digestión enzimática, lo que supera por poco respecto a la cantidad de cepas evaluadas a los casos observados en este trabajo que fue de tres. En otro caso, como el trabajo de Shayesten *et al.* (2014), se exhibe que, de 30 cepas aisladas, tres de ellas tuvieron actividad antimicrobiana, donde en todos los casos fueron sensibles a la digestión enzimática, que es aproximadamente cinco veces mayor a lo reportado en este estudio.

La producción de compuestos activos puede variar dependiendo del género, la especie e incluso de la cepa con la que se trabaja, es dependiente de muchos factores, como el método de evaluación, el medio de cultivo, la cepa patógena a inhibir o el proceso de extracción, por lo que los análisis prospectivos podrían subestimar el potencial de la batería de bacterias aisladas por la especificidad de los temas de investigación y los tiempos de evaluación principalmente.

Debido al problema que se presentó al no recuperar los compuestos activos en los SLC, se emplearon varias metodologías para tratar de descartar los posibles factores. Entre ellos el medio de cultivo, tamaño del inóculo, pruebas de reto frente al patógeno, la recolección de los productos extracelulares en medio sólido, el pH de obtención, la concentración de sales y la temperatura durante el crecimiento. Se determinó que los medios de cultivo evaluados no influyen en la producción de los compuestos activos durante el crecimiento, ya que en ambos medios de cultivo sólido se observó la presencia de halos de inhibición en las pruebas preliminares de actividad. Sin embargo, después de la filtración del cultivo, no pudieron recuperarse los compuestos activos en ninguno de ellos, por lo que se decidió continuar con el medio de tripticaseína de soya ya que el cultivo era más denso en comparación con el crecimiento en caldo marino y porque de acuerdo con la literatura es un medio de cultivo que ha sido principalmente utilizado en el cultivo de diferentes especies de *Bacillus* para la obtención de bacteriocinas (Lajis, 2020). Además de acuerdo con estudios anteriores sobre bacterias ácido lácticas, la producción de bacteriocinas podría estar estrechamente relacionada con la producción de biomasa (De Vuyst *et al.*, 1996; Callewaert y De Vuyst, 2000).

Es importante mencionar que la variabilidad y complejidad de los medios de cultivo podría o no influenciar la producción de compuestos activos, es decir, un medio más complejo no garantiza una mayor producción de compuestos activos, esto dependerá de los requerimientos de las cepas estudiadas. Sin embargo, esto sólo puede evaluarse una vez que se haya identificado el compuesto activo y monitorear la presencia o ausencia de éste en diferentes medios de producción. De acuerdo con el trabajo de Shayesten *et al.* (2014), la producción de bacteriocinas



por la cepa marina *Bacillus* sp., está altamente influenciada por la composición del medio de cultivo y las condiciones de crecimiento, obteniendo el máximo de inhibición en un medio con 1% de glucosa, porcentaje menor al que incluye el medio de cultivo TSB comercial que se utilizó en este trabajo. Sugiriendo que la producción de compuestos activos puede optimizarse para la obtención de un mayor rendimiento e incluso la reducción de costos de producción, ya que de acuerdo con la revisión de Lajis *et al.* (2020), el medio TSB es un medio de cultivo de alto costo e incluso desventajoso para la precipitación y purificación de bacteriocinas, ya que es un medio complejo que contiene péptidos y pigmentos que no son utilizados por la bacteria durante el cultivo y que interfieren con la purificación.

De las pruebas de reto para inducir la producción de los compuestos activos al enfrentar a *Bacillus* y los productos liberados por el patógeno, no se logró observar actividad inhibitoria en las pruebas de DAG. En un principio esto fue atribuido al volumen de cultivo, que fue otro de los factores evaluados, ya que se observó que en los cultivos de 100 mL a partir de una densidad óptica superior a 1.5, se evidenció la presencia de compuestos activos. Mientras que, en los cultivos de 10 mL empleados en las pruebas de reto, la densidad no alcanzó este valor, suponiendo que la producción del compuesto activo es denso-dependiente. Sin embargo, de acuerdo con el trabajo de Lagunas *et al.* (2001) la obtención de los compuestos activos de varias cepas de *B. firmus* luego de un cultivo de 48 h en medio líquido, tampoco exhibieron el potencial de inhibición que se presentó en las pruebas en placas de agar, donde crecieron ambos, el patógeno y el *Bacillus*, siendo esto similar a lo observado durante la realización de este trabajo. Esto sugiere que posiblemente la producción del compuesto que evaluaron no alcanzó los niveles apropiados para la inhibición del patógeno o que la actividad antagónica estuvo ligada a la presencia del patógeno. No obstante, en este caso, ellos probaron un volumen de cultivo de 1 L, lo que es diez veces mayor al volumen empleado en las pruebas de reto y producción de compuesto para este trabajo, lo que indica que podría no tratarse de una denso-dependencia como se estableció en un principio.

De acuerdo con otros estudios (Himmelbloom *et al.*, 2001; Guerra y Pastrana,

2002; Taheri *et al.*, 2012; Khay *et al.*, 2013) se ha demostrado que algunos factores como el tamaño del inóculo, la salinidad, pH y la temperatura pueden influir en la producción de los compuestos activos por lo que se evaluaron simultáneamente diferentes condiciones para tratar de recuperar los compuestos activos en los SLC. Entre estas se probaron diferentes tiempos de incubación en un cultivo escalado a partir de un inóculo previamente incubado durante 24 h a 30° C, los tiempos evaluados fueron 0, 24, 48 y 72 h. Después de un periodo de almacenamiento de 72 h a 4° C y reactivación a 30° C se encontró que con el inóculo de 20 mL, los compuestos activos se mantenían en el SLC. El tamaño del inóculo que se determinó, posteriormente fue ajustado a un tamaño inferior al probado, se utilizaron alícuotas 100 µL y 1 mL del inóculo de 20 mL como iniciadores del cultivo, obteniendo resultados similares en la recuperación de los compuestos activos, presentando incluso halos de mayor tamaño en las pruebas de DAG con la alícuota de 100 µL.

Los resultados de la influencia que podría tener el tamaño del inóculo en la producción es variable para diferentes cepas. Por ejemplo, los resultados obtenidos con la evaluación del tamaño de inóculo, se asemejan a lo reportado por Taheri *et al.* (2012), donde observan que efectivamente un inóculo de menor tamaño induce una mayor producción de compuestos, mientras que por el contrario, Himelbloom *et al.* (2001) determinan que la producción de la bacteriocina no está influenciada por la cantidad de inóculo suministrado, sino más bien a la presencia de compuestos que inducen la producción, pero que la producción del compuesto activo es menor o nula en inóculos de 0.001% . En el caso de cepas de *Bacillus*, se estima que un inóculo de entre 1-5% (v/v) es el tamaño óptimo para la máxima obtención de bacteriocinas. Sin embargo, esto dependerá del comportamiento, metabolismo y requerimientos de las cepas productoras, ya que en inóculos grandes de más de 10% podría verse una rápida disminución en los nutrientes del medio de cultivo y por lo tanto verse comprometida la producción de compuestos activos (Lajis, 2020), problema que se observa en inóculos muy pequeños también, por lo que es un comportamiento similar entre ambos géneros.

De acuerdo con lo observado durante la experimentación, la producción de compuestos activos no puede atribuirse al tamaño de inóculo o a la presencia de inductores, ya que, sin el tratamiento a 4° C, no se observa la presencia de compuestos activos en los SLC sin importar el tamaño de inóculo que se utilice. Hasta el momento no se ha encontrado información con la que puedan compararse estos resultados, por lo que es necesario profundizar en el proceso y determinar si la producción de compuestos activos luego del tratamiento térmico se debe a una respuesta al estrés y a la activación de los genes de producción.

En cuanto a la salinidad, no se observó diferencia en la actividad mostrada por la cepa cultivada bajo diferentes concentraciones de NaCl. Las especies del género *Bacillus* han mostrado una gran capacidad de adaptación, siendo consideradas como halotolerantes, pueden crecer incluso en ambientes salinos (Yilmaz y Birbir 2019). Como es el caso de los *Bacillus* aislados de ambientes marinos utilizados para este trabajo, por ello, podría ser que esta condición no fue determinante para la producción de los compuestos activos.

Por otro lado, de acuerdo con las evaluaciones de bacterias ácido-lácticas, una de las razones por la que no se pueden recuperar los compuestos proteicos o no hay un máximo de obtención es debido a la adsorción de estos a la pared celular de la bacteria productora, por lo que evaluar el efecto del pH y la sonicación para la desorción de los compuestos son opciones viables (Southern *et al.*, 1984; Lee *et al.*, 2009 y Taheri *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos evidencian que el tratamiento con pH es útil para recuperar los compuestos activos en los SLC, pero que la actividad disminuye con la acidez. El pH óptimo para recuperar los compuestos activos de esta cepa de *B. firmus* es pH 6.0, lo mismo ocurre con la sonicación, se obtuvieron los compuestos activos después del tratamiento del cultivo concavitación, sin embargo, en la evaluación del cultivo sonificado sin filtrar, no se encontraron células viables disponibles, lo que indica la lisis de las células en el cultivo y por consiguiente la presencia de compuestos intracelulares, debido a los objetivos del trabajo, se decidió descartar este tratamiento para evitar trabajar con

una mezcla de compuestos intra- y extra-celulares ya que se buscaban compuestos extracelulares de tipo peptídico.

Hasta este momento se determinó que de las 167 cepas de *Bacillus* probadas 58 presentaban actividad frente a por lo menos un patógeno, que debido a que no se recuperaron los compuestos activos en los SLC se probaron una serie de tratamientos de los que se estableció que el cambio de pH posterior al cultivo y el tratamiento térmico del inóculo eran útiles para recuperar los compuestos activos en los SLC. Luego de los tratamientos, se obtuvieron 23 SLC activos que fueron sometidos a tratamiento enzimático para determinar cuáles de ellos eran de origen proteico.

La digestión enzimática varía dependiendo del compuesto activo y de la enzima utilizada, la mayoría de los trabajos evalúan los SLC activos en lugar de los precipitados y utilizan una batería enzimática diversa, pero principalmente tripsina y proteinasa K obteniendo pérdida total o parcial de la actividad (Sutyak *et al.*, 2007; Cordoso 2012; Prieto *et al.*, 2012). Sin embargo, en este trabajo con las tres enzimas que se probaron en los 23 SLC recuperados, se observaron dos SLC que perdieron totalmente la actividad y uno con pérdida parcial, es decir que 20 de los SLC no fueron sensibles al tratamiento enzimático, y por lo tanto la actividad que presentan debe atribuirse a un compuesto no proteico. En trabajos como el de Touraki *et al.* (2012) con sobrenadantes activos de *Bacillus subtilis*, se evidencia que el compuesto activo obtenido no es sensible a la acción de la proteinasa k, mientras que sí es digerido por otras enzimas. Esta diferencia entre la acción de las enzimas sobre los compuestos activos se plantea en todos los trabajos en que se realiza el tratamiento enzimático, por lo que es necesario utilizar una batería enzimática más robusta para corroborar que efectivamente los compuestos activos de los 20 SLC no son de tipo proteico.

Debido a la variabilidad en la actividad de las cepas 20Bs y 18E, se decidió continuar exclusivamente con la caracterización del precipitado de 41Bf que presentó una actividad consistente y que por el tratamiento enzimático se determinó que el compuesto activo es de origen proteico. Se corroboró mediante identificación

molecular la identidad de la cepa 41Bf, donde se confirmó que se trataba de *Bacillus firmus*.

*B. firmus* es una bacteria de la que no se encuentran muchos trabajos relacionados a ella como productora de compuestos antimicrobianos. Sin embargo hay trabajos en los que se le reconoce como agente de control biológico por la producción de compuestos que pueden inhibir el crecimiento de patógenos o la formación de biopelículas (Laguna *et al.*, 2001; Korenblum *et al.*, 2008), estimular el crecimiento (Penterman *et al.*, 2000 en Lagunas *et al.*, 2001), ser útil como probiótico para cultivos acuícolas (Aly *et al.*, 2008; Abasolo-Pacheco, 2015), producir polímeros extracelulares para la bioremediación (Salehizadeh y Shojaosadati, 2003; Camacho-Chab *et al.*, 2018) presentar actividad antifouling (Ortega-Morales *et al.*, 2008; Ramasubburayan *et al.*, 2014), y ser un efectivo nematocida (Terefe *et al.*, 2009; Xiong *et al.*, 2015; Engelbrecht *et al.*, 2018), entre otras bondades. En el caso de la producción de compuestos proteicos o peptídicos con actividad antimicrobiana, Korenblum *et al.* (2005) evidencia la producción de una sustancia de tipo bacteriocina por *B. firmus* aislada de reservorios de aceite, donde establecen que es resistente a las proteasas, es estable en temperaturas de hasta 100° C durante 1 h y que además es estable en pH alcalinos, pero con un peso molecular superior a los 90 kDa. Por lo que la investigación realizada en este trabajo sería el primer reporte en el que se evidencia el potencial de producción de péptidos antibacterianos peptídicos de bajo peso molecular y que además son producidos por una cepa marina de *B. firmus*. En específico con la cepa de estudio, se ha demostrado anteriormente su potencial de producción de polímeros extracelulares no tóxicos que participan en la bioadsorción del cadmio en sistemas acuosos (Camacho-Chab *et al.*, 2018)

La producción del compuesto activo puede observarse en diferentes etapas de la fase de crecimiento de la cepa productora, en el caso del *B. firmus*, se observó el comienzo de la producción en la fase estacionaria y el aumento de éste durante la fase de muerte, teniendo el máximo de actividad en un periodo de 44 h, lo que se asemeja a trabajos realizados con especies del mismo género como en el trabajo

de Dusane *et al.* (2013), en el que la producción del compuesto comienza luego de las 12 h de cultivo y tiene un máximo entre las 36 y 44 h. Sin embargo, a diferencia de lo observado con nuestros resultados, su producción máxima se registra durante la fase estacionaria del crecimiento celular y la disminución durante la fase de muerte, mientras que la disminución del compuesto activo en este trabajo, se observa durante el segundo crecimiento exponencial.

Para otras especies de *Bacillus* se observa la producción de compuestos activos hasta las 72 h de cultivo durante la fase estacionaria (Sharma *et al.*, 2011; Touraki 2012; Zaghian *et al.*, 2012) o incluso en periodos cortos como en el caso del trabajo realizado por Baindara *et al.* (2013) con *Bacillus subtilis*, donde la producción comienza a partir de las 14 h y tiene un máximo a las 18 h durante la fase estacionaria.

El crecimiento bacteriano que se observó en la cepa 41Bf donde se aprecia una curva bifásica de multiplicación celular, no es un comportamiento típico de acuerdo con la revisión de la literatura para trabajos similares. Nápoles *et al.* (2006) sugiere que la curva bifásica en un cultivo pudiera presentarse debido a la elevada velocidad de crecimiento, generando la muerte temprana del cultivo y sirviendo de sustrato para un segundo proceso de crecimiento. Lo que podría indicar en nuestros resultados, que a partir de las 40 h se está realizando la reabsorción de los compuestos producidos en ese periodo y de aquellos disponibles por la lisis celular durante de la fase de muerte, estando relacionado con la disminución en los halos de actividad observada a las 60 horas de cultivo. La disminución o pérdida de actividad puede estar relacionada ya bien sea por la acción proteolítica de enzimas producidas durante el cultivo, la agregación de las proteínas y/o la adsorción de los compuestos activos por las células productoras. Siendo este último el motivo principal de la disminución según algunos autores (Onda *et al.*, 2003; Mitra *et al.*, 2005; Todorov y Dicks, 2006).

Métodos de extracción de los compuestos activos en SLC son varios, como la extracción ácida, la extracción con solventes orgánicos y resinas, precipitación con sales, tratamientos de pH y sonicación, etc. Para este trabajo decidimos probar

con dos métodos de extracción: resinas y precipitación con sales (Salting out).

Para la extracción con resinas se utilizaron las resinas Amberlite XAD-16 y Diadion HP-20, de las que se extrajeron más de 500 mg de extracto de cada una y para ambas se observó actividad a una concentración de 30 mg/mL, pero se determinó no utilizar este tipo de extracción para el resto de las pruebas debido a que se probaba el inóculo con tratamiento térmico que hasta el momento no había sido evaluado. Dado que *Bacillus* es un género conocido por producir una gran cantidad de compuestos activos con una extracción general como pasa con las resinas, sería complicado determinar el compuesto responsable en el caso de extraer múltiples compuestos activos de diferentes naturalezas. De acuerdo con el trabajo de Ahire *et al.* (2020), donde realizan la extracción de compuestos con resina Amberlite, el extracto crudo está compuesto principalmente por moléculas no proteicas, ya que, de cada 1 mg de extracto crudo, sólo el 38% representa los compuestos proteicos.

La precipitación con sales o salting-out permite la recuperación de proteínas o péptidos sin desnaturalizarlas, se utiliza como agente principalmente sulfato de amonio ya que éste presenta una solubilidad más alta que otras sales de fosfato, por lo que es el método de obtención o purificación parcial más utilizado en trabajos con bacteriocinas o sustancias de tipo bacteriocina. Los porcentajes de sulfato de amonio que se utilizan para la precipitación puede variar dependiendo del tamaño de la proteína utilizándose valores bajos para proteínas de mayor tamaño (Wingfield, 2001).

En este trabajo se realizó una precipitación seriada e individual del SLC de *B. firmus*, utilizando 20, 40, 60 y 80% de sulfato de amonio, donde no se encontraron diferencias de precipitación entre los porcentajes, ya que con todos ellos se recuperaron los compuestos activos. Tanto con la precipitación seriada como con las individuales, se realizó el seguimiento del sobrenadante, donde no perdió la actividad hasta luego de la precipitación al 80%, por lo que no concuerda con la selección de tamaños de proteínas en relación con el porcentaje de precipitación. Esto podría deberse a la asociación del compuesto activo con otras moléculas, ya

que de acuerdo con el tamaño aproximado que se le atribuye al compuesto en este trabajo, se trata de un péptido no mayor a los 10 kDa. En trabajos similares con este género bacteriano, se emplean porcentajes variados de sulfato de amonio que van desde el 40 al 80%, siendo el más comúnmente utilizado el 60% (Lim *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2017; Brock *et al.*, 2018; Perumal *et al.*, 2019;). Sin embargo, de acuerdo con el trabajo de Bindiya *et al.* (2019), con una precipitación al 30% ellos logran precipitar la bacteriocina que posee un tamaño de 3 kDa, lo que indica que también en porcentajes bajos pueden precipitarse péptidos pequeños como se observó en los resultados de este estudio. No obstante, ellos no mencionan si realizaron un seguimiento de actividad al sobrenadante residual de la precipitación, en cambio en el trabajo de Su *et al.* (2019), donde realizan una precipitación seriada de entre el 20-90% de sulfato de amonio, el péptido activo es obtenido a 70% de saturación y con un peso molecular aproximado de 6.5 kDa, por lo que la precipitación del compuesto activo podría variar de acuerdo al porcentaje de saturación y no está estrechamente relacionado al tamaño del péptido activo.

En el estudio de compuestos activos de sustancias de tipo bacteriocina o bacteriocinas la caracterización del compuesto es importante, ya que proporciona información sobre el comportamiento que podría ser comparable con trabajos anteriores y así elucidar o inferir el tipo de compuesto con el que se trabaja y facilita la toma de decisiones para la purificación y el futuro uso del compuesto una vez que sea identificado. Principalmente se caracterizan las propiedades fisicoquímicas como la actividad residual luego de la exposición a diferentes condiciones y el tamaño aproximado del compuesto.

En el caso de la evaluación de la respuesta a los estímulos térmicos, de acuerdo a la literatura, en los compuestos activos que son resistentes a la exposición a temperaturas altas, se observa una permanencia de actividad entre el 70 y el 90% después de 15-30 min de tratamiento (Cordoso, 2012), mientras que de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, se mantuvo constante el tamaño de halo con una actividad residual superior al 80% en el caso de la exposición a 100° C y superior al 95% para el resto de los tratamientos. En trabajos con bacterias



del mismo género, se observa un comportamiento similar ya que se mantiene constante la actividad luego de la exposición a altas temperaturas, aunque durante un periodo más corto que el evaluado en este trabajo (Touraki *et al.*, 2012;). Sin embargo, también hay compuestos producidos por *Bacillus*, que son sensibles a la exposición a temperaturas altas, como la thuricina 4AJ1, presentando una disminución del 70% a una temperatura de 90° C luego de la exposición por 30 min (Su *et al.*, 2019).

La estabilidad de la actividad luego de la exposición a diferentes pH que se observó en este trabajo es similar a otros trabajos con *Bacillus*, principalmente en pH ácidos y neutros (Touraki *et al.*, 2012). Sin embargo, durante la caracterización del compuesto estudiado en este trabajo, se observa que la actividad residual en pH alcalinos es superior al 80%, mientras que ellos reportan valores menores al 50%. Demostrando con esto que el compuesto activo evaluado es estable a las variaciones de las condiciones de pH, asemejándose a resultados presentados para otros compuestos activos aislados de cepas de *Bacillus* (Su *et al.*, 2019).

Zaghian *et al.* (2012), describe que el compuesto activo que aislaron de *Bacillus pumilus* y que caracterizaron como una sustancia de tipo bacteriocina, puede mantener su actividad aún después de la exposición a luz UV durante 30 min, siendo el primer reporte de esta actividad para la especie. Esta misma característica se encontró para el precipitado crudo obtenido en este trabajo, donde mantuvo una actividad residual del 98%. Ambas sustancias mantienen características en común. Sin embargo, el compuesto activo de *B. pumilus* posee un tamaño de 25 kDa, lo que no es cercano al tamaño del observado en este estudio.

De acuerdo con trabajos similares en cuanto a la búsqueda y caracterización de bacteriocinas, el uso de una bioautografía permite aproximar y relacionar la actividad antimicrobiana con el peso molecular que posea el péptido responsable. Para este trabajo se probaron diferentes porcentajes de acrilamida con el fin de determinar si la actividad estaba dada exclusivamente por un compuesto parcialmente purificado y delimitado en bandas delgadas, como se observa en otros trabajos (Risoen *et al.*, 2004; Baidara *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2017; Ansari *et al.*,

2018; Perumal *et al.*, 2019; Su *et al.*, 2019). Sin embargo, en todos los porcentajes de acrilamida, se observó una banda gruesa, correspondiente a la zona de inhibición en la bioautografía. Esto podría ser causado por la alta incidencia de distintos compuestos de tamaños similares o una muy alta concentración del compuesto activo. Para corroborar esto último, se realizó una serie de diluciones de la fracción F3, en donde no se observó una banda activa definida, sino que sólo se perdió intensidad de la banda, por lo que no necesariamente se trata de una alta densidad de compuesto activo.

Los reportes sobre los tamaños de las bacteriocinas aisladas de cepas de *Bacillus* son variados, ya que este género es capaz de producir bacteriocinas de varios tipos incluso en una misma especie, por lo que equiparar los resultados obtenidos de este trabajo en donde se presenta por primera vez la evaluación de la producción de compuestos activos de tipo bacteriocina por *B. firmus*, podría verse influenciado por las similitudes de bacteriocinas conocidas, por lo que es importante en el futuro purificar el compuesto activo y realizar una búsqueda de los genes que codifican para bacteriocinas conocidas antes de descartar la idea de que se trate de un compuesto nuevo.

Entre las sustancias de tipo bacteriocinas que se aproximan al intervalo de tamaño del péptido activo que se propone en esta evaluación, pueden encontrarse por ejemplo la sustancia aislada por Nayak y Mukherjee (2011) que posee actividad frente a patógenos de peces y tiene un tamaño entre los 5-10 kDa, Así también la Bacocina caracterizada por Brock *et al.* (2018) probada frente a *Staphylococcus epidemidis*, la cual posee un tamaño de alrededor de los 10 kDa. El compuesto activo aislado por Huang *et al.* (2016) de un *Bacillus thuringiensis* y probado frente a una cepa patógena de *Bacillus cereus* posee un tamaño próximo a los 7.3 kDa. La identificación y purificación parcial de la thuricina 4AJ1 realizada por Su *et al.* (2019) para la inhibición de *B. cereus* tiene un tamaño aproximado de 6.5 kDa, siendo tamaños similares al intervalo de 5-7 kDa que se observó para el compuesto activo producido por *B. firmus* en este estudio.

De acuerdo con los resultados presentados en este trabajo, no se logró

adecuar un sistema de solventes para lograr obtener una separación eficiente de los compuestos en la muestra. Sin embargo, el S1 permitió el desplazamiento de los compuestos en la placa con sílica gel, donde se observa después de la tinción con ninhidrina, la presencia de compuestos con aminoácidos. En el trabajo de Ahire *et al.* (2020) donde identifican la producción de un péptido antimicrobiano por *Bacillus paralicheniformis*, determinan con una fase móvil a partir de butanol:etanol:ácido acético:agua (6:12:1:6) y con una tinción de ninhidrina confirman la presencia del péptido activo con un RF de 0.47 que coincide con el halo de inhibición de la bioautografía. Sin embargo, ese sistema de solventes no fue eficiente para realizar la separación de las fracciones de nuestro precipitado.

Por otro lado, lograron identificarse tres halos de actividad en la bioautografía de la placa de sílica gel, que se relacionan con algunos de los compuestos observados. No se puede determinar si se trata de compuestos diferentes, de fracciones del compuesto activo o asociaciones de este con otras moléculas y que por alguna de esas razones el desplazamiento por capilaridad haya sido diferente y se observaran esos tres halos de actividad, por lo que se intentó un fraccionamiento parcial con una placa preparativa de sílica gel, del que no se tuvo éxito. Es necesario probar con otros métodos de purificación para corroborar si se trata de un mismo compuesto o de diferentes compuestos con pesos moleculares similares, que, de acuerdo con los resultados del apartado anterior, se observa exclusivamente una banda activa alrededor de los 5-7 kDa.

El uso de este tipo de compuestos proteicos es competitivo ya que con cantidades más pequeñas en comparación con agentes microbianos comerciales pueden obtenerse resultados similares. Como en el trabajo realizado por Dusane *et al.* (2013), donde la concentración mínima inhibitoria del compuesto activo aislado de la cepa marina *Bacillus licheniformis*, se encontró entre 1.60 a 3.12 µg/mL dependiendo el patógeno de prueba, lo que evidencia que la cantidad de compuesto puro necesario para la inhibición de patógenos es menor que en el caso de utilizar extractos parcialmente purificados, ya que de acuerdo con los resultados de este trabajo, la concentración mínima inhibitoria frente al patógeno de prueba es superior

a los 20 µg/mL, donde podría haber más de 15 µg/mL de otros compuestos que podrían interferir con la actividad o simplemente tratarse de un compuesto de menor efectividad y baja producción respecto a lo que presentan Dusane *et al.* (2013), por lo que es importante purificar los compuestos y verificar la actividad nuevamente.

La inhibición de la formación de biopelículas de algunos patógenos se ha estudiado con anterioridad como en el trabajo de Haneen y Neyhara (2019) donde ellos evalúan extracto de péptidos extracelulares de *Bacillus* spp de más de 50 kDa frente a varios patógenos incluyendo *S. aureus* y *P. aeruginosa* que también fueron evaluados en este trabajo. Ellos determinan que su extracto es medianamente activo frente a *S. aureus* y no presenta actividad frente a *P. aeruginosa*, mientras que en este estudio se observó que el extracto de *B. firmus* no presenta inhibición en la formación de biopelículas de *S. aureus*, pero que sí disminuye 32% del crecimiento de esta cepa. En el caso de *P. aeruginosa*, mientras que para la cepa ATCC, la inhibición de la formación de biopelículas fue muy baja y la inhibición del crecimiento de 7.1%, para la cepa *P. aeruginosa* clínica hubo una inhibición en la formación de biopelículas de 75% aunque no se inhibiera el crecimiento bacteriano. La disminución en el metabolismo de las células bacterianas de acuerdo con Nawroki *et al.* (2014) (en Haneen y Neyhara, 2019;) puede verse afectado por las interacciones de los péptidos con la superficie celular, por lo tanto, afectar funciones de señalización como la formación de biopelículas.

Entre los criterios presentados por Tagg *et al.* (1976) para clasificar a una sustancia como bacteriocina, se menciona que debe poseer un estrecho espectro inhibitorio de actividad frente a especies homologas, lo que pudo observarse con las bacterias del género *Bacillus* que fueron evaluadas en este trabajo. Sin embargo, con respecto a los patógenos evaluados, se observa actividad frente a bacterias Gram-positivas como frente a bacterias Gram-negativas, por lo que se sugiere que se trata de compuestos de amplio espectro y que se ha planteado en los últimos años que representa también una característica de las sustancias de tipo bacteriocina (Wu *et al.*, 2005; Jeevaratnam *et al.*, 2005; Asha Devi *et al.*, 2011) y que deber ser exclusivamente frente a bacterias Gram-positivas como plantearon

inicialmente Tagg et al. (1976).

Las cepas productoras de bacteriocinas o sustancias de tipo bacteriocina, presentan genes de inmunidad que les permite producir las sustancias libremente sin ser dañadas por estas (Nes et al., 1996; Campero-Pintado, 2015). Sin embargo, en este trabajo se observó que no hubo resistencia por parte de la cepa productora, pues, aunque con el sobrenadante activo no presentó como tal la inhibición del crecimiento, con el extracto sí se evidenció la formación de zonas de inhibición. Esto puede indicar que la inmunidad que posee la bacteria productora frente a las bacteriocinas que produce sólo le brinda cierto grado de tolerancia, es decir, tolera sólo una cantidad específica de bacteriocinas en el medio, por lo que una alta concentración podría fungir como una sustancia tóxica para la cepa productora. Debido a que la toxicidad del extracto sobre la cepa productora no afecta el proceso de producción del compuesto activo, sigue siendo una opción viable para su evaluación más detallada y el posible uso industrial futuro debido a las características de resistencia que presenta y a que posee actividad frente a bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas.

## CONCLUSION

*Bacillus* es un excelente candidato para la búsqueda de compuestos activos ya que se obtuvo un porcentaje del 35% de cepas activas, pero las condiciones de cultivo y los métodos de obtención de compuestos activos limitan el potencial de producción de algunas de ellas.

Hasta el momento no se han descrito compuestos activos de tipo bacteriocina producidas por *Bacillus firmus* de bajo peso molecular ni aislado de una cepa marina, convirtiéndose éste en el primer reporte para esta especie, evidenciando su gran capacidad de producción y características que se asemejan a otros compuestos proteicos estudiados en este género.

El compuesto activo concentrado en la fracción correspondiente al tamaño entre 3-9 kDa, es estable luego de la exposición prolongada a diferentes temperaturas, pH, luz ultravioleta, con un peso molecular entre los 5-7 kDa de acuerdo con la presencia de una banda activa única en los geles SDS-Tricine-PAGE, por lo que de acuerdo con la literatura podría tratarse de una sustancia tipo bacteriocina, por el tamaño molecular que exhibe, el modo de acción y las características de resistencia que presenta, sin embargo, esto debe corroborarse con un estudio más detallado y con la purificación e identificación de los compuestos activos.

En este trabajo se logró corroborar que la cepa 41Bf es productora de compuestos activos de tipo proteico, que poseen actividad antimicrobiana comparable a otros trabajos en lo que se evaluaron cepas del mismo género y que mantienen actividad frente a bacterias patógenas Gram-positivas como frente a Gram-negativas sin necesidad del uso de permeabilizadores. En general, esta cepa posee características que la convierte en un modelo potencial para su exploración y su posterior aplicación industrial.

## BIBLIOGRAFIA

- Abasolo-Pacheco F. (2015). Selección y evaluación de bacterias del tracto digestivo del pectínido mano de león (*Nodipecten subnodosus*) y de la concha nácar (*Pteria sterna*) con uso potencial probiótico en la acuicultura de bivalvos marinos. Tesis de Doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S.C., Baja California Sur, México.
- Abdel Monaim S.A.H., Somboro A.M., El-Faham A., de la Torre B.G. y Albericio F. (2019). Bacteria hunt bacteria through an intriguing cyclic peptide. *ChemMedChem*. 14(1): 24-51.
- Abriouel H., Franz C.M., Ben Omar N. y Gálvez A. (2011). Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol Rev*. 35(1):201-32.
- Ahern M., Verschueren S. y vanSinderen D. (2003). Isolation of a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* strain B439. *FEMS Microbiol Lett*. 163: 229-236.
- Ahire J.J., Kashikar M.S., Lakshmi M. S. y Madempudi R. (2020). Identification and characterization of antimicrobial peptide produced by indigenously isolated *Bacillus paralicheniformis* UBBLi30 strain. *3 Biotech*. 10, 112.
- Alday-Aguilera A.J. (2008). Aplicaciones por aspersion de bacteriocinas lácticas sobre un biofilm de *Listeria monocytogenes* en acero inoxidable. Tesis de Licenciatura. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.
- Alquicira L. (2006). Determinación del mecanismo de resistencia a la acción inhibitoria de la bacteriocina producida por *Pedococcus parvulus* MXVK 133. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa, México.
- Aly S.M., Abd-El-Rahman A.M., John G. y Mohamed M.F. (2008). Characterization of some bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* and their potential use as probiotics. *Aquaculture*. 277 (1): 128-136.
- Ansiari A., Zohra R.R., Tarar O.M., Qader S.A.U. y Aman A. (2018). Screening, purification and characterization of thermostable, protease resistant Bacteriocin

- active against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *BMC Microbiology*. 18 (1): 192.
- Asha Devi N.K., Rajendran R., Karthik Sundaram S. (2011). Isolation and characterization of bioactive compounds from marine bacteria. *Indian J Nat Prod Resour*. 2(1): 59-64.
- Baindara P., Mandal S.M., Chawla N., Singh P.K., Pinnaka A.K. y Korpole S. (2013). Characterization of two antimicrobial peptides produced by halotolerant *Bacillus subtilis* strain SK.DU.4 isolated from rhizosphere soil sample. *AMB express*. 3: 2.
- Barboza-Corona J.E., Vázquez-Acosta H., Bideshi D.K. y Salcedo.Hernández R. (2007). Bacteriocin-like inhibitor substances produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. *Arch Microbiol*. 187: 117-126.
- Barja JL, Lemos M and Toranzo AE. (1989). Purification and characterization of an antibacterial substance produced by a marine *Alteromonas* species. *Antimicrob Agents and Chemotherapy*. 33(10): 1673–1679.
- Benitez L.B., Caumo K., Brandelli A. y Rott M.B. (2011). Bacteriocin-like substance from *Bacillus amyloliquefaciens* shows remarkable inhibition of *Acanthamoeba polyphaga*. *Parasitol Res*. 108: 687-691.
- Bindiya E.S., Tina K.J., Sasidharan R.S. y Bhat A.G. (2019). BaCf3: highly thermostable bacteriocin from *Bacillus amyloliquefaciens* BTSS3 antagonistic on food-borne pathogens. *3 Biotech*. 3: 136.
- Bizani D., Motta A.S., Morrisy J.A.C., Terra R.M.S., Souto A.A. y Brandelli A. (2005). Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by *Bacillus cereus*. *Int Microbiol*. 8: 125-131.
- Brizuela M., García L., Pérez L. y Mansur M. (1998). Basidiomicetos: nueva Fuente de metabolitos secundarios. *Revista Iberoamericana de Microbiología*. 15; 69-74.



- Brock S., Knadler J., Ritter T. y Baker J.C. (2018). Characterization of bacteriocin from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 7(6): 1492-1503.
- Callewaert R. y De Vuyst L. (2000). Bacteriocin production with *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 is improved and stabilized by fed-batch fermentation. *Appl Environ Microbiol*. 66(2): 606-613.
- Camacho-Chab J.C., Castañeda-Chávez M.R., Chan-Bacab M.J., Aguila-Ramírez R.N., Galaviz-Villa I., Bortolo-Pérez P., Lango-Reynoso F., Tabasco-Novelo C., Gaylarde C. y Ortega-Morales B.O. (2018). Biosorption of cadmium by non-toxic extracellular polymeric substances (EPS) synthesized by bacteria from marine intertidal biofilms. *Int J Environ Res Public Health*. 15: 314.
- Campero-Pintado C. (2018). Caracterización bioquímica y genética de la infantaricina A: una nueva bacteriocina antineumocócica producida por la cepa de origen lácteo *Streptococcus infantarius* subesp. *infantarius* LP90. Tesis de Doctorado. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
- Chen H. y Hoover D.G. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2: 82-100.
- Cherif A., Ouzari H., Daffonchio D. Cherif H. Ben Salama k., Hassen A., Jaoua S. y Boudabous A. (2001). Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1.7 a new strain isolated from soil. *Lett Appl Microbiol*. 32: 243-247.
- Cladera-Olivera F., Caron G.R. y Brandelli A. (2004). Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. *Lett Appl Microbiol*. 38: 251-256.
- Cordoso M.M.E. (2012). Caracterización y purificación parcial de sustancias tipo Bacteriocinas producidas por cepas de *Enterococcus*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina.
- Cotter P.D., Hill C. y Ross R.P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol*. 3(10): 777-788.

- De la Fuente-Salcido N.M. (2009). Biosíntesis y actividad de bacteriocinas producidas por cepas mexicanas de *Bacillus thuringiensis* con potencial aplicación como bioconservadores en alimentos. Universidad Autónoma de Nuevo León. Nuevo León, México.
- Demain A.L. y Fang A. (2000). The natural functions of secondary metabolites. En *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Vol. 69. Ed. Scheper T. Springer Verlag, Berlin, pp. 1–39.
- Desriac F., Defer D., Bourgougnon N., Brillet B., Le Chevalier P. y Fleury Y. (2010). Bacteriocin as weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: Inventory and potential applications as an aquaculture probiotic. *Mar drugs*. 8: 1153-1177.
- De Vuyst L., Callewaert R. y Crabbé K. (1996). Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiol*. 142(4): 817-827.
- Dusane D.H., Damare S.R., Nancharaiah Y.V., Ramaiah N., Venugopalan V.P., Kumar A.R. y Zinjarde S.S. (2013). Disruption of microbial biofilms by an extracellular protein isolated from epibiotic tropical marine strain of *Bacillus licheniformis*. *Plos One*. 8(5).
- Engelbrecht G., Horak I., Rensburg P.J.J.V. y Claasens N. (2018). Bacillus-based bionetácidos: development, mode of action and commercialisation. *Biocontrol Sci Technol*. 2: 629-653. <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1469000>
- FAO. (2004). Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Estudio FAO: producción y sanidad animal 162. Roma, Italia. Disponible en <http://www.fao.org/3/y5468s/y5468s00.htm#Contents>
- Fenical W. (1997). New farmaceutics from marine organisms. *Trends Biotechnol*. 15(9): 39-41.

- Galbis-Pérez J.A. 2004. *Panorama actual de la química farmacéutica*. Serie Farmacia. Publicaciones de la Universidad de Sevilla. 2ª. Ed. Universidad de Sevilla. 374 p.
- García-Gutiérrez E., Mayer R.J. y Cotter P.D. (2018). Gut microbiota as a source of novel antimicrobials. *Gut microbes*. 10(1): 1-21.
- Gatti Junior P., Assuncao A.W.A., Baldin J.C. y Amaral L.A. (2014). Microbiological quality of whole and filleted shelf tilapia. *Aquaculture*. 433: 196-200.
- González-Esquinca A.R. y Castro-Moreno M. (2008). Papel ecológico de los metabolitos secundarios. *Lacandonia*. 1(2): 123-130.
- Gray E.J. (2005). Identification of a novel bacteriocin, thuricin 17 produced by *Bacillus thuringiensis* neb17. Tesis de Maestría. McGill University, Montreal. Quebec, Canada.
- Guerra N. y pastrana L. (2002). Modelling the influence of pH on the kinetics of both nisin and pediocin production and characterization of their functional properties. *Process Biochemistry*. 37(9): 1005-1015.
- Haider S.R., Reid H.J. y Sharp B.L. (2012). Tricine-SDS-PAGE. *Methods Mol Biol*. 869: 81-91.
- Hernández-Saldaña O.F., Barboza-Corona J.E., Bideshi D.K. y Casados-Vázquez L.E. (2020). New bacteriocin-like substances produced by *Streptomyces* species with activity against pathogens. *Folia Microbiol*. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12223-020-00770-z>.
- Himelbloom B., Nilsson L. y Gram L. (2001). Factors affecting production of an antilisterial bacteriocin by *Carnobacterium piscicola* strain A9b in laboratory media and model fish systems. *J Appl Microbiol*. 91: 506-513.
- Jack R.W., Tagg J.R. y Ray B. (1995). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol Rev*. 59: 171-200.
- Jacob, F., Lwolf, A., Simonovitch, A y Wollman, E.L. (1953). Definition de quelques termes relatifs à la lysogénie. *Ann. Inst. Pasteur*. 84: 222-224.

- Jensen P.R. y Fenical, W. (1994) *Annu. Rev. Microbiol.*48: 559-584.
- Jeevaratnam K., Jamuna M. y Bawa A.S. (2005). Biological preservation of foods. *J Biotechnol.* 4: 446-454.
- Juneja, V.K., y Davidson, P.M. (1993). Influence of Altered Fatty Acid Composition on Resistance of *Listeria monocytogenes* to Antimicrobials. *J Food Protect.* 56 (4): 302- 305.
- Kelecom A. (2002) Secondary metabolites from marine microorganisms. *An. Acad. Bras. Cienc.* 74: 151–170
- Khay E., Ouhsassi M., El Harsal A., Idaomar M. y Abrini J. (2013). Optimization of bacteriocin-like production by *Enterococcus durans* E204 isolated from camel milk of Morocco. *Curr Res Microbiol and Biot.* 1(4): 155-159.
- Klaenhammer T.R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 12: 39-86.
- Korenblum E., der Weid I., Santos A.L., Rosado A.S., Sebastián G.V., Coutinho C.M., Magalhaes F.C., Paiva M.M. y Seldin L. (2005). Production of antimicrobial substances by *Bacillus subtilis* LFE-1, *B. firmus* HO-1 and *B. licheniformis* T6-5 isolated from an oil reservoir in Brazil. *J Appl Microbiol* 98: 667–675.
- Korenblum E., Sebastián G.V., Paiva M.M., Coutinho C.M., Magalhaes F.C. Peyton B.M. y Seldin L. (2008). Action of antimicrobial substances produced by different oil reservoir *Bacillus* strains against biofilm formation. *Appl Microbiol Biot.* 79: 97-103.
- Kumar A., Kumar D. y Bajpai V. (2017). Isolation and preliminary characterization of a bacteriocin-producer *Bacillus* strain inhibiting methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Acta Biol Hung.* 68(2): 208-209.
- Laemmli U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.

- Lagunas J., Zavaleta E., Osada S., Aranda S., Luna I. y Vaquera H. (2001). *Bacillus firmus* como agente de control biológico de *Phytophthora capsici* Leo. en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Rev Mex Fitopatol.* 19: 57-65.
- Lajis A. (2020). Biomanufacturing process for the production of bacteriocins from *Bacillaceae* family. *Bioresour Bioprocess.* 7(8): 26pp.
- Lee S.S., Oh T.J., Kim J., Kim J.B., y Lee H.S. (2009). Bacteriocin from purple non sulfur phototrophic bacteria, *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol Virol.* 39(4): 269-276.
- Lee H. y Kim H.Y. (2011). Lantibiotics, class I bacteriocins from the genus *Bacillus*. *J Microbiol Biotechnol.* 21(3): 29-35.
- Li L.P., Wang R., Liang W.W., Huang Y., Luo F.G., Lei A.Y., Chen M. y Gan X. (2015). Development of live attenuated *Streptococcus agalactiae* vaccine for tilapia via continuous passage *in vitro*. *Fish Shellfish Immunol.* 45(2): 955-963.
- Lim K.B., Balolong M.P., Kim S.H., Oh J.K., Lee J.Y. y Kang D.K. (2016). Isolation and characterization of a broad spectrum bacteriocin from *Bacillus amyloliquefaciens* RX7. *Biomed Res Int.* 2016(2): 1-7.
- Lisboa M.P., Bonatto D., Bizani D., Henriquez J.A.P. y Brandelli A. (2006). Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian atlantic forest. *Int Microbiol.* 9(2): 111-118.
- Longeon A., Peduzzi J., Barthelemy M., Corre S., Nicolas J.L. y Guyot M. (2004). Purification and partial identification of novel antimicrobial protein from marine bacterium *Pseudoalteromonas* species strain X153. *Mar Biotechnol.* 6: 633-641.
- Lopetuso, L., Giorgio M., Saviano A., Scaldaferrri F., Gasbarrini A., y Cammarota G. (2019). Bacteriocins and Bacteriophages: Therapeutic Weapons for Gastrointestinal Diseases? *International journal of molecular sciences*, 20(1), 183.

- López J., Ochoa A., Santoyo G., Anaya J., Medina E., Martínez M. y Loeza P. (2008). Bacteriocinas de bacterias Gram-positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. *Rev Mex Cienc Farm.* 39(3): 49-57.
- Mitra, S., Chakrabarty, P.K. y Biswas, S.R. (2005). Production and characterisation of nisin-like peptide produced by a strain of *Lactococcus lactis* isolated from fermented milk. *Curr Microbiol* 51, 183– 187.
- Moll G.N., Konings W.N., y Driessen A.J.M. (1999). Bacteriocins: Mechanism of membrane insertion and pore formation. *Ant. van Leeuwenhoek.* 76:185–198.
- Moreira-Dos Santos W.L. (1993). Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por *Pediococcus* sp. 347, de origen cárnico. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
- Muñoz-Rojas J. (2004). Bacteriocinas: una estrategia de competencia microbiana propuesta como alternativa de antibióticos dirigidos para el futuro humano. En Martínez-Romero E. y Martínez-Romero J. (eds) *Microbios en línea.* Cuernavaca, Morelos, México, Asociación Mexicana de Microbiología, capítulo 3.  
[https://www.researchgate.net/publication/235953137\\_Bacteriocinas\\_una\\_estrategia\\_de\\_competencia\\_microbiana\\_propuesta\\_como\\_alternativa\\_de\\_antibioticos\\_dirigidos\\_para\\_el\\_futuro\\_humano](https://www.researchgate.net/publication/235953137_Bacteriocinas_una_estrategia_de_competencia_microbiana_propuesta_como_alternativa_de_antibioticos_dirigidos_para_el_futuro_humano)
- Muñoz K., Arango G.J., Jaramillo M.C. (2004). Los antibióticos y su situación actual. *Vitae*, vol. 11, núm. 1. Universidad de Antioquia Medellín, Colombia, pp. 21-33.
- Nápoles M.C., Martínez J., Costales D., Gómez G. y Somers E. (2006). Efecto de diferentes medios de cultivo en la multiplicación celular de *Bradyrhizobium elkanii*. *Cultivos Tropicales.* 27(1): 35-38.
- Nayak S.K. y Mukherjee S.C. (2011). Partial purification and characterization of the inhibitory substance of *Bacillus subtilis* against common bacterial fish pathogens. *Isr J Aquacult-Bamid.* 63: 1-5.

- Nayak S., Limsuwan C., Chichurd N., Kuhlmann K. y Pungpang S. (2017). Antimicrobial activity of a partially characterized analytes from *Bacillus pumilus*(B2). *Aquac Res.* 48(4): 1-8.
- Nes, I.F. y Johnsborg, O. (2004). Exploration of antimicrobial potential in LAB by genomics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15,100–104.
- Onda T., Yanagida F., Tsuji M., Shinohara T. y Yokutsuka K. (2003). Production and purification of a bacteriocin peptide produced by *Lactococcus* sp. strain GM005, isolated from miso-paste. *Int J Food Microbiol.* 87: 153-159.
- Ortega-Morales B.O., Chan-Bacab M.J., Miranda-Tello E., Fardeau M., Correro J.C. y Stein T. (2008). Antifouling activity of sessile bacilli derived from marine surfaces. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 35: 9-15.
- Pacheco K.D., Del'Duca A., Borges M.L., Fernandez R.T., Cesar D.E. y Apolônio A.C.M. (2018). Bacteriocin-like inhibitory substance in aquaculture: a classic method of protein precipitation for a new applicability. *Acta Sci Biol Sci.* 40(1). <https://doi.org/10.4025/actascibiolsoci.v40i1.37881>
- Perumal V., Yao Z. y Kim J.A., Kim H.J. y Kim J.H. (2019). Purification and characterization of a bacteriocin, bacBS2, produced by *Bacillus velezensis* BS2 isolated from meongge jeotgal. *J Microbiol Biotechnol.* 29(7): 1033-1042.
- Prieto M.L., O'Sullivan L., Tan S.P., McLoughlin P., Hughes H., O'Connor P.M., Cotter P.D., Lawlor P.G. y Gardiner G.E. (2012). Assessment of the bacteriocinogenic potential of marine bacteria reveals lichenicidin production by seaweed-derived *Bacillus* spp. *Mar Drugs.* 10(10): 2280-2299.
- Proksch P., Edrada R.A. y Ebel R. (2002). Drugs from the seas - current status and microbiological implications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 59(2-3): 125-134.
- Ramasubburayan R., Susan T., Pradeep K. V., Immanuel G. y Palavesam A. (2014). Isolation, screening and optimization of culture conditions for enhanced

- antibacterial activity by a marine epibiotic bacterium *Bacillus flexus* APGI against fouling bacterial strains. *J Pur Appl Microbiol.* 8: 2909-29220.
- Resende J.A., Silva V.L., Fontes C., Souza-Filho J., Rocha de Olivera T., Cohelo C.M., Cesar D.E. y Diniz C.O. (2012). Multidrug-resistance and toxic metal tolerance of medically important bacteria isolated from aquaculture system. *Microbes Environ.* 27(4): 449-455.
- Risøen P.A., Rønning P., Henga I.K. y Kolstø A.B. (2004). Characterization of broad range antimicrobial substance from *Bacillus cereus*. *J Appl Microbiol.* 96(4): 648-655.
- Salehizadeh H. y Shojaosadati S.A. (2003). Removal of metal ions from aqueous solution by polysaccharide produced from *Bacillus firmus*. *Water Res.* 37: 431-4235.
- Sansinenea E. y Ortiz A. (2011). Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnol Lett.* 33: 1523-1538.
- Sharma N., Kapoor R., Gautam N. y Kumari R. (2011). Purification and characterization of bacteriocin produced by *Bacillus subtilis* R75 isolated from fermented chumks of mung bean (*Phaseolus radiatus*). *Food Technol Biotechnol.* 49(2): 169-176.
- Shayesten F., Ahmad A. y Usup G. (2014). Bacteriocin production by a marine strain of *Bacillus* sp Sh10: Isolation, screening and optimization of culture condition. *Biotech.* 13(6): 273-281.
- Smitha S. y Bhat S.G. (2013). Thermostable bacteriocin BL8 from *Bacillus licheniformis* isolated from marine sediment. *J Appl Microbiol.* 114(3): 688-694.
- Soltani M., Ghosh K., Hoseinifar S.H., Kumar V. Lymbery A.J., Roy S. y Ringø E. (2019). Genus *Bacillus*, promising probiotics in aquaculture: aquatic animal origin, bio-active components, bioremediation and efficacy in fish and shellfish. *Rev Fish Sci Aquac.* 27(3):331-379.



- Southern J.A., Katz W. y Woods D.R. (1984). Purification and properties of a cell-bound bacteriocin from a *Bacteroides fragilis* strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 25(2): 253-257.
- Stein T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures syntheses and specific functions. *Mol Microbiol.* 56(4): 845-857.
- Su X., Li L., Pan J., Fan X., Ma S., Guo Y., Idris A.L. Zhang L., Pan X., Gelbič I., Huang T. y Guan X. (2019). Identification and partial purification of thuricin 4AJ1 produced by *Bacillus thuringiensis*. *Arch Microbiol.* 202(4): 755-763.
- Sutyak K.E., Wirwan R.E., Aroutcheva A.A. y Chikindas M.L. (2007). Isolation of the *Bacillus subtilis* antimicrobial peptide subtilisin from the dairy product-derived *Bacillus amyloliquefaciens*. *J Apl. Microbiol.* 104(4): 1067-1074.
- Tagg J.R., Dajani A.S. y Wannamaker L.W. (1976). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev.* 40(3): 722-756
- Taheri P., Samadi N., Ehsani M.R., Khoshayand M.R. y Jamalifar H. (2012). An evaluation and partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp *lactis* ST1 isolated from goat milk. *Braz J Microbiol.* 43(4): 1452-1462.
- Terefe M., Tefera T. y Sakhuja P.K. (2009). Effect of a formulation of *Bacillus firmus* on root-knot nematode *Meloidogyne incognita* infestation and the growth of tomato plants in the green-house and nursery. *J Invertebr Pathol.* 100(2): 94-99.
- Todorov S.D. y Dicks L.M.T. (2006). Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria: comparison of the bacteriocins. *Process Biochem.* 41(1): 11-19.
- Torkar K.G. y Matijasic B.B. (2003). Partial characterization of bacteriocins produced by *Bacillus cereus* isolates from milk and milk products. *Food Technol Biotechnol.* 41(2): 121-129.

- Touraki M., Frydas I., Karamanlidou G. y Mamara A. (2012). Partial purification and characterization of a bacteriocin produced by *Bacillus subtilis* NCIMB 3610 that exhibits antimicrobial activity against fish pathogens. *J Biol Res Thessalon.* 18: 310-319.
- Vady valoo V., Arous S., Gravesen A., Héchard Y., Chauchan H.R., Hastings J.W. y Rautenbach M. (2004). Cell surface alterations in class IIa bacteriocin-resistant *Listeria monocytogenes* strains. *Microbiology.* 150: 3025-3033.
- van Belkum M.J., y Stiles M.E. (2000). Nonlantibiotic antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Nat. Prod. Rep.* 17:323-335.
- Wiedemann I., Breukink E., Van Kraaij C., Kuipers O.P., Bierbaum G., De Kruijff B., y Sahl H.G. (2001). Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *J Biol Chemistry.* 276:1772-1779.
- Wingfield P.T. (2001). Protein precipitation using ammonium sulfate. *Curr Protoc Protein Sci.* Appendix 3: Appendix-3F.
- Wu S., Jia S., Sun D., Chen M. Chen X., Zhong J. y Huan L. (2005). Purification and characterization of two novel antimicrobial peptides subpeptin JM4-A and subpeptin JM4-B produced by *Bacillus subtilis* JM4. *Curr Microbiol.* 51(5): 292-296.
- Wulff E.G., Mguni C.M, Mansfeld-Giese K., Fels J., Lubeck M. y Hockenhull J. (2002). Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* and *B. pumilus* isolates with distinct antagonistic potential against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Plant Patholo.* 51(5): 574-584.
- Xie J., Zhang R., Shang C. y Guo Y. (2009). Isolation and characterization of a bacteriocin produced by an isolated *Bacillus subtilis* LFB112 that exhibits antimicrobial activity against domestic animal pathogens. *Afr J Biotechnol.* 8(20): 5611-5619.

- Xiong J., Zhou Q., Luo H., Xia L., Li L., Sun M. y Yu Z. (2015). Systemic nematicidal activity and biocontrol efficacy of *Bacillus firmus* against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *World J Microbiol Biotechnol.* 31(4): 661-667.
- Xue J., Hunter I., Steinmetz T., Peters A., Ray B., y Miller K.W. (2005). Novel activator of mannose-specific phosphotransferase system permease expression in *Listeria innocua*, identified by screening for pediocin ACh resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1283-1290.
- Yilmaz E. y Birbir M. (2019). Characterization of Halotolerant *Bacillus* species isolated from salt samples collected from leather factories in Turkey. *J Am Leather Chem Assoc.* 114(4): 118-130.
- Zaghian S., Shokri D. y Emtiazi G. (2012). Co-production of a UV-stable bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) and indole-3-acetic acid hormone (IAA) and their optimization by taguchi design in *Bacillus pumilus*. *Ann Microbiol.* 62(3): 1189-1197.
- Zhang J.T., Zhou S.M., An S.W., Chen L. y Wang G.L. (2014). Visceral granulomas in farmed large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Richardson), caused by a bacterial pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*. *J Fish Dis.* 37(2): 113-121.
- Zheng G. (1997). Isolation, purification, and characterization of a novel bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus subtilis*. Tesis de doctorado. University of Arkansas. Arkansas, USA.