

## Aislamiento e identificación de cepas bacterianas aisladas de diferentes muestras tomadas en El Copal

Isolation and identification of bacterial strains isolated from different samples taken in El Copal

González-Rivera X.<sup>1</sup>, Díaz-Arreola M.G.<sup>2</sup>, Caudillo-Gámez K.L.<sup>1</sup>, Cruz-Martínez C.A.<sup>3</sup>, Casados-Vázquez L.E.<sup>4,5,6\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de química. División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato

<sup>2</sup>Departamento de Biología. División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato

<sup>3</sup>Departamento de Química, Bioquímica y Ambiental, Tecnológico Nacional de México, Campus Villahermosa, Villahermosa Tabasco

<sup>4</sup>Programa de Posgrado en Biociencias, División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca. Irapuato, Guanajuato, 36500, México.

<sup>5</sup>Departamento de Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca. Irapuato, Guanajuato, 36500, México.

<sup>6</sup>CONAHCyT-Universidad de Guanajuato

x.gonzalezrivera@ugto.mx<sup>1</sup> mg.diazarreola@ugto.mx<sup>2</sup> kl.caudillogamez@ugto.mx<sup>1</sup> cristinaalejandr.cruz.martinez@gmail.com<sup>3</sup>

\*autor de correspondencia edith.casados@gmail.com

### Resumen

Las bacterias son esenciales en biotecnología debido a su diversidad metabólica y adaptabilidad. Estas bacterias pueden producir metabolitos útiles en diversas áreas, el género *Bacillus* es notable por sus características explotables en el área biotecnológica, incluyendo la producción de proteínas insecticidas y proteínas antimicrobianas. Este trabajo explora el aislamiento e identificación de bacterias del género *Bacillus* en muestras recolectadas en El Copal, se procesaron muestras de diferentes fuentes, tras el aislamiento, las bacterias se identificaron utilizando tinción de Gram, prueba de catalasa y amplificación del ADN ribosomal 16S por PCR. Los resultados mostraron que las muestras de musgo, tierra, telaraña y heno tuvieron la mayor diversidad bacteriana. Se aislaron un total de 23 bacterias diferentes morfológicamente, 15 fueron bacilos Gram positivos, de estos se seleccionaron diez que se identificaron molecularmente como: *Bacillus sp.*, *Bacillus toyonensis*, *Bacillus aryabhattai*, *Peribacillus simplex*, *Bacillus wiedmannii*, *Bacillus proteolyticus*, *Bacillus mobilis* y *Bacillus amyloliquefaciens*. Este estudio resalta la importancia de explorar ambientes diversos para descubrir bacterias con potencial en biotecnología. Las muestras de origen apícola produjeron menos diversidad, pero algunas colonias mostraron potencial antimicrobiano, que se evaluó mediante el método de difusión de pozos.

**Palabras clave:** *Bacillus*, aislamiento microbiano, identificación

### Introducción

Las bacterias son organismos unicelulares que desempeñan un papel fundamental en muchos procesos biológicos y tecnológicos debido a su diversidad metabólica y a su capacidad de adaptarse a diferentes ambientes. En el campo de la biotecnología, la búsqueda de bacterias con metabolitos de interés se ha convertido en un enfoque crucial para el avance científico. Este proceso implica la identificación y caracterización de cepas bacterianas capaces de sintetizar compuestos que pueden ser utilizados para mejorar cultivos, combatir enfermedades, degradar contaminantes ambientales o producir biocombustibles. La exploración de ambientes diversos y extremos, como suelos agrícolas, ambientes marinos, desiertos y fuentes termales, ha permitido descubrir bacterias con capacidades metabólicas únicas, ampliando así el repertorio de herramientas biotecnológicas disponibles [1].

En este contexto, se destaca el género *Bacillus* el cual consta de más de 336 especies que se pueden dividir en diferentes grupos según su similitud genética, siendo los más notables el grupo relacionado con la obtención de compuestos de interés biotecnológico como lo son *Bacillus cereus* y *Bacillus thuringiensis*, ahora bien, este tipo de bacterias gram positivas se caracteriza por la capacidad para producir esporas resistentes al calor, además de que generan proteínas insecticidas, como por ejemplo la formación de cristales parasporales de *Bacillus thuringiensis*, los cuales son responsables de ocasionar un efecto insecticida cuando son ingeridas por larvas de insectos de diferentes órdenes, como lepidóptera, ofreciendo una alternativa

sostenible y menos perjudicial que los pesticidas químicos [2,3]. Por otro lado, algunas cepas también son productoras de otras proteínas de interés, como las quitinasas, las cuales son enzimas que degradan la quitina por lo que muestran un efecto inhibitorio contra patógenos de origen fúngico en plantas ya que son las encargadas de hidrolizar los enlaces glicosídicos presentes en la pared celular del hongo y por último las bacteriocinas, que son proteínas antimicrobianas que inhiben el crecimiento de bacterias patógenas, y se utilizan en la conservación de alimentos y en la producción de probióticos [3,4].

La identificación de bacterias con potencial biotecnológico se realiza mediante dos enfoques principales: las pruebas bioquímicas y la identificación molecular. Las pruebas bioquímicas, como la fermentación de azúcares, la producción de enzimas específicas y la resistencia a ciertos antibióticos, permiten determinar las características fenotípicas de las bacterias, identificando las más comunes en un entorno dado [4]. Sin embargo, para una identificación más precisa se realiza la secuenciación del ADN 16S ribosomal, es una herramienta poderosa para identificar a nivel de género e incluso especie [5].

En este artículo, se explorará la importancia de las bacterias en la biotecnología mediante el aislamiento e identificación de diversas muestras del Copal, con un énfasis particular en el género *Bacillus* y sus metabolitos.

## **Materiales y método**

### **Toma de muestra, cultivo y aislamiento**

Las muestras para este estudio se tomaron en la localidad El Copal. Se recolectaron y procesaron muestras de: resina de nopal (RN), resina de nopal camino rally (RNR), musgo (Mu), nopal seco (NS), tierra (Ti), telaraña (Te), capullo seco (CS), heno (He), miel (Mi), miel 2 (Mi2), miel y cera de abeja (MC), cera tapa (CT), diarrea tapa abajo (Di), larvas (La), chapulín (Cha) y abejas (Ab), abeja y larva (AL).

Cada muestra se depositó en tubos cónicos de 50 mL y se sometió a un lavado riguroso con 25 mL de agua estéril. Posteriormente, se centrifugaron a 6000 rpm durante 3 minutos, del sobrenadante se tomó una muestra de 1mL que se sometió a calentamiento a 65°C por 10 min para eliminar células vegetativas. A continuación, 100 µL del sobrenadante tratado con calor se sembraron en cajas Petri con medio TSA (Tryptona Soya Agar) y se incubaron a 30°C durante 24 horas para permitir el crecimiento bacteriano proveniente de esporas. De forma paralela, se prepararon cultivos líquidos en caldo TSB (Tryptona Soya Broth) se tomaron 20 µL de cada muestra y se inocularon en 5 mL de medio de cultivo. Estos cultivos líquidos se incubaron a 28°C durante 18 horas a 200 rpm para favorecer el desarrollo bacteriano en suspensión. Transcurrido el período de incubación, se comparó el crecimiento bacteriano observado en los cultivos en agar y en caldo.

Para las muestras de origen apícola (Mi, Mc, CT, Di, La, TAN, Cha, Mi2, Ab y AL), se realizó un cultivo adicional en caldo y agar BHI (Brain Heart Infusion Agar) adicionando 1 mg/L de tiamina, considerando que este medio es más rico en nutrientes y podría favorecer el crecimiento de una mayor diversidad de bacterias. Estos cultivos en BHI se incubaron bajo las mismas condiciones de temperatura y tiempo que los cultivos en TSA y TSB.

Una vez finalizada la incubación, se revisaron los cultivos en agar para identificar morfológicamente las colonias bacterianas presentes en cada caja Petri. Cada colonia identificada se aisló en una nueva caja Petri con el medio de cultivo original (TSA o BHI) para obtener un cultivo puro. Las colonias aisladas se incubaron nuevamente a 30°C durante 24 horas, y en algunos casos, se requirió un período de incubación adicional de 48 horas para que las colonias alcanzaran un tamaño suficiente para su análisis.

### **Identificación de bacterias por tinción de Gram**

Una vez que las colonias aisladas mostraron un crecimiento adecuado, se realizaron cultivos líquidos en TSB o BHI, según el medio de cultivo original de la colonia. Se realizó la tinción de Gram, técnica esencial para clasificar las bacterias en Gram positivas o Gram negativas. Para ello, se preparó un frotis de cada muestra en un portaobjetos, luego se fijó el frotis con la ayuda de un mechero y se agregó el colorante cristal violeta sobre la muestra fijada y se deja reposar durante un minuto. Después de un minuto, el portaobjetos se enjuaga con agua y se agrega la solución de lugol, se deja por un minuto, se agrega alcohol-acetona por quince segundos y safranina por un minuto. Finalmente, los frotis teñidos se observaron bajo el microscopio con el objetivo 100X.

### **Pruebas de catalasa**

Se realizó una prueba de catalasa [6] a las bacterias que resultaron ser bacilos Gram positivos; en un portaobjetos se colocaron 50  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrógeno y encima se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de un precultivo de 24 horas de cada una de las diferentes muestras, la presencia de burbujeo indica que la prueba es positiva.

#### Obtención de DNA genómico

Se colocaron 1.5 mL de precultivo líquido de las diferentes bacterias en los microtubos, se centrifugaron durante 1 minuto a 10000 rpm, se decantó el sobrenadante y las células se lavaron con 1 mL de TE 20/50, se resuspendieron con ayuda de un vortex y se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 minutos, posteriormente se eliminó el sobrenadante y a cada botón lavado se le adicionó 1 mL de acetona fría, se resuspendió nuevamente en vortex, los tubos se incubaron 5 minutos en hielo y se centrifugaron por 4 min a 13000 rpm, se eliminó el sobrenadante y los tubos se dejaron secar destapados a 37°C por 10 minutos. El botón se resuspendió con 500  $\mu\text{L}$  de TE 20/50 y 10  $\mu\text{L}$  de lisozima (50 mg/mL), se incubaron a 37°C durante 1-2 horas hasta observar que la muestra estuviera homogénea, posteriormente se añadieron 75  $\mu\text{L}$  de SDS al 10 % y 125  $\mu\text{L}$  de NaCl 5 M y se mezclaron por inversión hasta observar una mezcla homogénea, se incubaron en un baño de hielo/etanol durante 3 minutos, después se incubaron a 65°C por 3 minutos y el ciclo se repitió 3 veces, cada vez que se realizó el cambio de 65°C a hielo se mezclan los tubos por inversión. Concluidos los 3 ciclos se incubaron en hielo durante 10 minutos, se centrifugaron 5 minutos a 13000 rpm y luego el sobrenadante se pasó a un tubo nuevo; se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de RNasa A y se incubaron 15 minutos a 37°C, posteriormente se adicionaron 10  $\mu\text{L}$  de proteinasa K y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se añadió un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y cada tubo se mezcló por inversión hasta que se formara una emulsión homogénea, después se centrifugaron por 4 min a 13000 rpm y la fase acuosa (superior) se transfirió a un tubo nuevo. Los tubos se llenaron con etanol de 96° y se incubaron durante toda la noche a -20°C para favorecer la precipitación de DNA. Finalizada la incubación se centrifugaron a 13000 rpm por 10 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el pellet se lavó con etanol 70%, se centrifugaron a 13000 rpm por 10 minutos, nuevamente el sobrenadante se decantó y se pusieron a secar por 10 minutos a 37°C con las tapas abiertas, finalmente el botón se resuspendió en 100  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura.

#### Amplificación del 16S ribosomal por PCR

La amplificación del DNAr 16S se hizo por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizaron oligonucleótidos específicos Fw- UBF (5'AGAGTTTGATCCTGGCTGAG3') y Rv- R (5'GGTTACCTTGTTACGACTT3'), se prepararon reacciones de 50  $\mu\text{L}$  con los siguientes componentes: Buffer 1 X,  $\text{MgCl}_2$  a 2.5 mM, dNTPs a 0.2 mM, oligonucleótido Fw-UBF a 0.4  $\mu\text{M}$ , oligonucleótido Rv-R a 0.4  $\mu\text{M}$ , 100 ng de DNA genómico y 1 U de Taq DNA polimerasa (5' Bio). La amplificación se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 95°C durante dos minutos seguido por 30 ciclos de 95°C por treinta segundos, 56°C durante treinta segundos, 72°C durante un minuto, finalmente se dejó cinco minutos a 72°C. Las amplificaciones fueron monitoreadas en geles de agarosa al 1 %.

#### Purificación del producto de PCR

Para purificar el fragmento que corresponde al 16S ribosomal, se llevó a cabo una precipitación de DNA con etanol de la siguiente manera: se midió el volumen de cada muestra de DNA, se añadió 1/10 de volumen de acetato de sodio (3M pH 5.2) y se mezclaron bien todos los tubos, se adicionaron 2 volúmenes de etanol frío 96°, se mezclaron y se incubaron a -20°C durante 20 minutos, posteriormente se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y se añadió 1 mL de etano al 70%, se mezclaron las muestras y se centrifugaron a 5°C durante 5 minutos a 13000 rpm, el sobrenadante se decantó y los tubos se secaron con las tapas abiertas a 37°C, finalmente el pellet se resuspendió en 30  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura libre de nucleasas.

#### Actividad antimicrobiana por el Método de difusión de pozos (MDP)

De las colonias ya aisladas se dejó incubando un cultivo líquido por 24 horas con agitación a 200 rpm, a 28 °C. La finalidad es obtener metabolitos antimicrobianos en este tiempo. Pasado este tiempo, los cultivos se centrifugaron y el sobrenadante se separó para probar su actividad antimicrobiana contra las bacterias: *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Xanthomonas spp*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*.

Las bacterias indicadoras se crecieron toda la noche en medio TSB a 28 °C con agitación a 200 rpm, cumplidas las 16 horas, se tomaron 500 uL del precultivo para inocular 5 mL de medio fresco y se pusieron a crecer durante 2 horas bajo las misma temperatura y agitación del precultivo. Una vez que pasaron las dos horas se tomaron 140 uL de este cultivo fresco para inocular 20 mL de agar de pozos atemperado (0.7 g de TSB, 6 g de agar por 500 mL). El agar inoculado se vertió en cajas Petri y se esperó a que solidificaran, una

vez gelificadas, se horadaron pozos con un sacabocados estéril y en estos pozos se agregaron 90 uL del sobrenadante correspondiente a cada cepa de interés, como control positivo se thurincina H para *B. cereus* y kanamicina a 20 µg/mL para las demás cepas indicadoras y como control negativo se utilizó agua. Las cajas se incubaron a 4 °C durante una noche y posteriormente *P. aeruginosa* y *Xanthomonas* se incubaron a 28°C por 16 horas, mientras que *L. monocytogenes* y *S. aureus* se incubaron a una temperatura de 37°C durante las mismas 16 horas. Después del período de incubación, se examinan las placas para observar los halos de inhibición alrededor de los pozos. se pasaron a 28 °C por 24 horas. El tamaño del halo de inhibición es indicativo de la eficacia del agente antimicrobiano contra la bacteria probada.

## Resultados y discusión

Se procesaron 13 muestras diferentes recolectadas en diferentes sitios de la localidad El Copal. En todas las muestras se observó crecimiento y de todas se pudieron aislar bacterias. Las muestras de musgo (Mu), tierra (Ti), telaraña (Te) y heno (He) son las que tuvieron mayor diversidad y se obtuvieron 3, 4, 3 y 3 colonias diferentes, respectivamente. De las muestras de nopal seco (Ns), resina de nopal (RNR) solo se obtuvo una colonia. En cuanto a las muestras apícolas: Miel (Mi), cera de tapa (CT), diarrea de abeja (Di), larvas (La), tapa abajo normal (Tan) y chapulin (Cha) se obtuvo solo un tipo de colonia, a excepción de Cha del cual se aislaron dos colonias diferentes (Tabla 1). La mayoría de las colonias aisladas corresponden a bacilos gram positivos, lo cual es congruente con lo buscado, dado que las muestras se sometieron a tratamiento con calor para aislar bacterias provenientes de esporas.

Las muestras que tuvieron una mayor diversidad bacteriana corresponden a tierra y musgo; se ha reportado que el suelo cuenta con una gran diversidad microbiana que es beneficiosa para la agricultura, muchas de estas bacterias ayudan a las plantas a fijar nitrógeno [7] en el caso del musgo ocurre lo mismo, estos forman parte de consorcios compuestos por cianobacterias, líquenes, algas, hongos, entre otros organismos que ayudan a biorremediar el suelo [8].

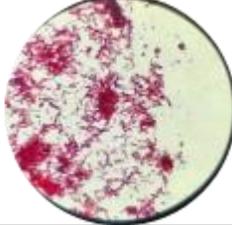
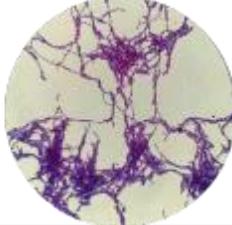
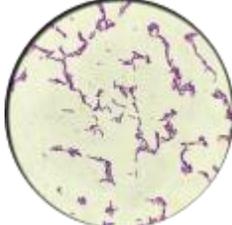
**Tabla 1.** Muestras obtenidas de El copal y descripción de las colonias aisladas.

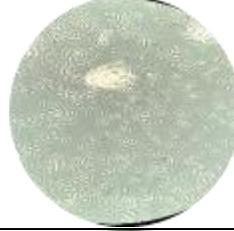
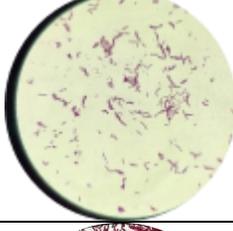
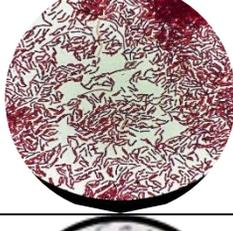
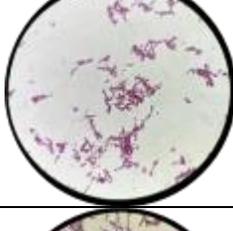
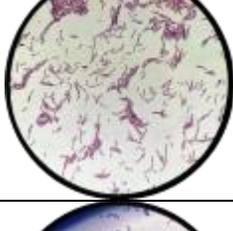
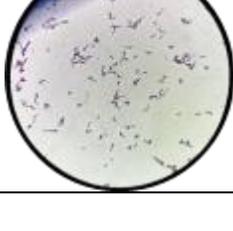
Muestra	Código	Medio	Morfología de colonia	Forma	Gram
Resina de nopal camino rally	RNR	BHI	Colonias redondas, pequeñas, blancas, translúcidas y planas	Bacilo	Positivo
Musgo	Mu1	TSA	Colonias grandes, redondas blancas, cremosas y elevadas	Bacilo	Positivo
	Mu2	TSA	Colonias irregulares, ligeramente amarillas, opacas y planas	Bacilo	Positivo
	Mu3	TSA	Colonias irregulares, blancas mate y planas	Bacilo	Positivo
Nopal seco	NS	TSA	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y planas	Bacilo	Positivo
Tierra	Ti1	TSA	Colonia irregular, blanca, opaca y elevada	Bacilo	Positivo
	Ti2	TSA	Colonia grande, redonda, blanca, borde entero y plana	Bacilo	Positivo
	Ti3	TSA	Colonia ovalada, mediana, blanca translúcida y plana	Bacilo	Negativo
	Ti4	TSA	Colonia irregular, blanca mate, ligeramente elevada	Bacilo	Positivo
Telaraña	Te1	TSA	Colonia grande, redonda blanca mate y plana	Bacilo	Negativo

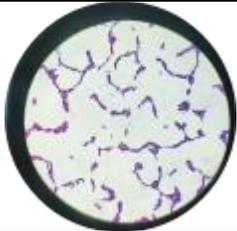
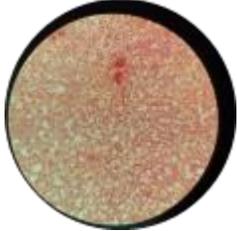
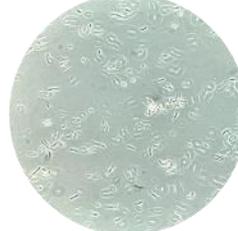
	Te2	<b>TSA</b>	Colonia pequeña, redonda, blanquecina, brillante, borde entero y plana	Bacilo	Negativo
	Te3	<b>TSA</b>	Colonia redonda, mediana, blanca, borde entero y plana	Bacilo	Negativo
Heno	He1	<b>TSA</b>	Colonias pequeñas redondas, blancas, opacas borde entero y planas	Bacilo	Negativo
	He2	<b>TSA</b>	Colonias irregulares, bancas, cremosas y opacas	Bacilo	Negativo
	He3	<b>TSA</b>	Colonias irregulares grandes, ligeramente amarillas brillantes y planas	Bacilo	Positivo
Miel	Mi	<b>TSA</b>	Colonia redonda, blanquecina, borde entero, plana y cremosa	Bacilo	Positivo
Cera tapa	CT	<b>TSA</b>	Colonias puntiformes, blanquecinas, translucidas, planas	Bacilo	Positivo
Diarrea de abeja	Di	<b>TSA</b>	Colonia redonda, blanca, borde entero, plana y cremosa	Bacilo	Negativo
Larvas	La	<b>TSA</b>	Colonia redonda pequeña, blanca, borde entero, cremosa y plana	Coco	Negativo
Tapa abajo normal	TAN1	<b>BHI</b>	Colonia redonda, pequeña, blanca translucida y ligeramente elevada	Bacilo	Positivo
	TAN2	<b>BHI</b>	Colonia irregular, blanca, opaca y plana	Bacilo	Positivo
Chapulín	Cha	<b>BHI</b>	Colonia redonda, blanca translucida, borde entero y elevada	Bacilo	Positivo
	Cha1	<b>BHI</b>	Colonia grande, irregular, translucida, plana	Bacilo	Dudoso
Miel 2	Mi2	<b>TSA</b>	Colonia redonda, blanca mate, borde entero y elevada	Coco	Negativo

A todas las bacterias se les realizó una caracterización inicial por tinción de Gram para clasificarlas como positivas o negativas, esto con el fin de descartar a los microorganismos Gram negativos, es de nuestro interés quedarnos con bacterias del género *Bacillus* y estas caen dentro del grupo de los Gram positivos. De los 23 aislados, 14 resultaron ser bacilos Gram positivos: RNR, Mu1, Mu2, Mu3, NS, Ti1, Ti2, Ti4, He3, Mi, CT, Tan1, Tan2 y Cha (Tablas 1 y 2). Es importante remarcar que la tinción de Cha1 fue dudosa, si bien parecía gran negativa al secuenciarse se obtuvo que pertenece al género *Bacillus* por lo que corresponde a un Gram positivo. Estos 15 microorganismos fueron seleccionados para hacerles prueba de catalasa y de actividad antimicrobiana. De estas colonias, las colonias Mu1, Ti1, Ti2, Ti4, He3, Tan1, Cha y NS, fueron catalasa positivo (Tabla 2). La prueba de catalasa se utiliza para identificar si el microorganismo es aerobio o anaerobio, aunque se ha encontrado que algunos organismos anaerobios facultativos dan negativo a esta prueba, por este motivo esta prueba actualmente se utiliza para diferenciar los géneros *Staphylococaceae* y *Micrococaceae* que son catalasa positiva del género *Streptococaceae* que es catalasa negativa. También se ha reportado que el género *Bacillus* es catalasa positivo.

**Tabla 2.** Identidad obtenida por secuenciación

Muestra	Código/ Identidad	Gram	Esporas	Catalasa
Resina de nopal camino rally	RNR			Negativo
Musgo	Mu1 <i>Bacillus sp.</i>			Positivo
	Mu2			Negativo
	Mu3 <i>Bacillus toyonensis</i>			Negativo
Nopal seco	NS			Positivo
Tierra	Ti1 <i>Bacillus aryabhatai</i>			Positivo

	Ti2			Positivo
	Ti4 <i>Peribacillus simplex</i>			Positivo
Heno	He3 <i>Bacillus sp.</i>			Positivo
Miel	Mi			Negativo
Cera tapa	CT <i>Bacillus wiedmannii</i>			Negativo
Tapa abajo normal	TAN1 <i>Bacillus sp</i>			Positivo
	TAN2 <i>Bacillus proteolyticus</i>			Negativo

	Cha <i>Bacillus mobilis</i>			Positivo
Chapulín	Cha1 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>			Negativo

De las 15 bacterias a las que se les realizó la prueba de catalasa se les dejó crecer por 5 a 9 días y se estuvieron monitoreando por microscopía en busca de esporas. Hipotéticamente todas deberían provenir de esporas y por lo tanto, todas deberían esporular; sin embargo, podría haber crecido alguna bacteria resistente al calor, esta podría ser la explicación de porque tenemos bacilos gram negativos. Las 15 bacterias que fueron Gram positivas esporularon a las 96 horas (Tabla 2).

Para realizar la identificación molecular se extrajo DNA genómico de 14 cepas gram positivas y se realizó PCR para amplificar el 16S, se amplificó el fragmento de aproximadamente 1600 bp (figura 1). Este fragmento se purificó y 10 de estas cepas se mandaron a secuenciar. Un criterio de selección fue tomar en cuenta las que presentaran actividad antimicrobiana o que en la microscopía mostraran cuerpos parasporales. Se seleccionaron las cepas Mu1, Mu3, Ti1, Ti4, He3, CT, Tan1, Tan2, Cha y Cha1. Estas fueron identificadas como: *Bacillus sp.*, *Bacillus toyonensis*, *Bacillus aryabhattai*, *Peribacillus simplex*, *Bacillus sp.*, *Bacillus wiedmannii*, *Bacillus sp.*, *Bacillus proteolyticus*, *Bacillus mobilis* y *Bacillus amyloliquefaciens*; respectivamente.

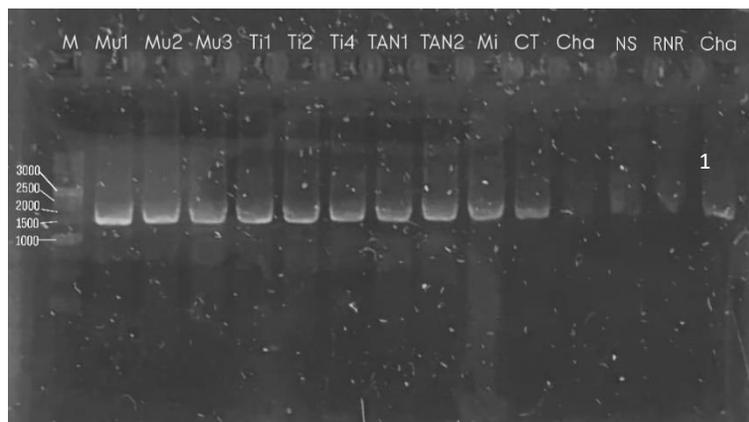


FIGURA1. Amplificación del 16S de las muestras Gram positivas. M: Marcador molecular Gen Ruler 1kb., Mu1: Musgo 1., Mu2: Musgo 2., Mu3: Musgo 3., Ti1: Tierra 1., Tierra 2: Tierra 2., Ti4: Tierra 4., TAN1: Tapa de Abajo Normal 1., TAN2: Tapa de Abajo Normal 2., Mi: Miel., CT: Cera Tapa., Cha: Chapulín., Cha1: Chapulín 1.

Como parte de la caracterización, se realizó un ensayo de actividad antimicrobiana por el método de difusión en pozos, se probaron contra *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *Xanthomonas*, *S. aureus* y *L. monocytogenes*, se probaron estas cepas por ser patógenos y fitopatógenos. Encontramos que las cepas nombradas como Cha y Cha1, aisladas de chapulín mostraron actividad antimicrobiana contra *B. cereus* y la cepa Cha1, además tuvo actividad contra *P. aeruginosa*, es un resultado prometedor porque consideramos a la actividad antibacteriana una característica para ser explotada biotecnológicamente. La cepa CT aislada de una tapa de cera en un apiario, mostró actividad contra *B. cereus*. Estas cepas deberán ser caracterizadas para

demostrar si la naturaleza de esta inhibición se debe a algún péptido antimicrobiano o a algún metabolito no ribosomal (Tabla 3 y figura 3). Es un hallazgo importante, esto destaca su potencial biotecnológico. En nuestro laboratorio hemos trabajado con una bacteriocina de *Bacillus thuringiensis* y en un intento por descartar que esta actividad pueda deberse a esta bacteriocina se realizó un PCR con oligonucleótidos específicos para amplificar genes del clúster biosintético de esta bacteriocina. La cepa CT que tuvo actividad contra *B. cereus* amplificó los fragmentos esperados, igual que en el control (figura 2). Este resultado sugiere que esta cepa puede tener el clúster genético para thurincina H, una bacteriocina reportada de *B. thuringiensis* pero que se ha visto en plásmidos de otras especies de *Bacillus*.

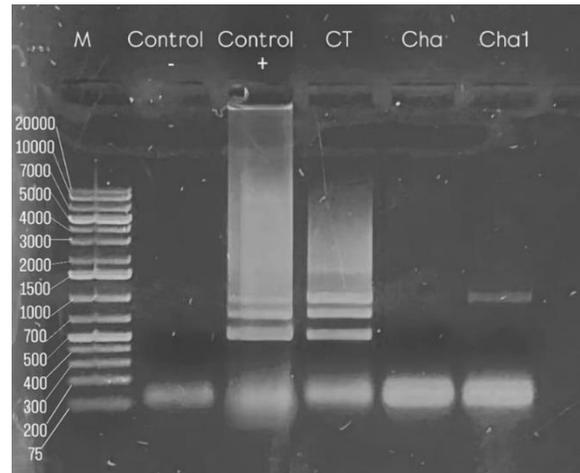
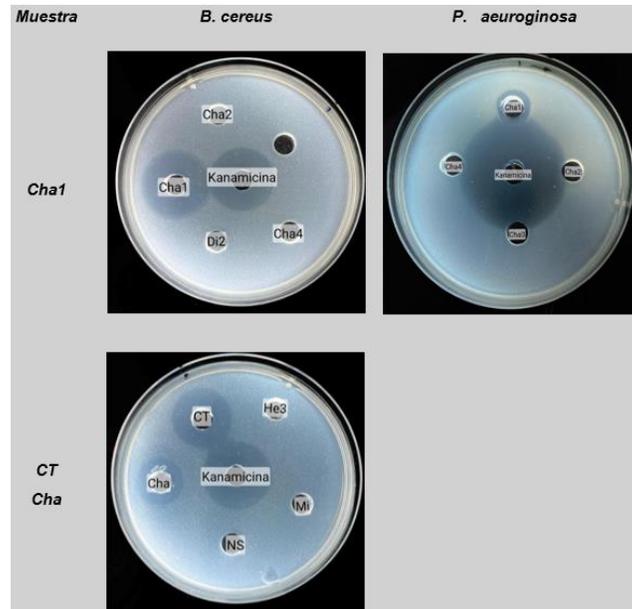


FIGURA 2. Amplificación mediante PCR de Thurincina H. Electroforesis en gel de agarosa (1%) M: Marcador molecular GeneRuler 1kb., Control negativo: reacción de cadena de polimerasa sin DNA., Control positivo: Cry-B/ThnA., CT: DNA obtenido de Cera de abeja de la Tapa., Cha1: DNA obtenido de Chapulín., Cha: DNA obtenido de Chapulín.

Tabla 3. Actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos.

Muestra	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Xanthomonas</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Listeria</i>
Cha 1	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
Mu 1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Mu 2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Mu 3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
TAN 1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
TAN 2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Ti 1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Ti 2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Ti 4	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
RNR	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
CT	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
He 3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Mi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
NS	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Cha	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Di 2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)



**FIGURA 3.** Resultados positivos obtenidos en los que se dio la presencia de un halo inhibitorio de crecimiento microbiano correspondiente a las muestras de Cha1 (Chapulín1), CT (Cera tapa) junto con Cha (Chapulín), en los agaros de *Bacillus cereus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

## Conclusión

El suelo y otras muestras son matrices de donde se pueden aislar bacterias con actividad antimicrobiana. El tratamiento con calor eliminó gran parte de la comunidad microbiana permitiendo el crecimiento en su mayoría de bacterias formadoras de espora correspondientes al género *Bacillus*.

## Referencias

- Ostos-Ortiz, Olga Lucía, Rosas-Arango, Sonia Marcela, & González-Devia, Johanna Lizeth. (2019). Aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos. *Nova*, 17(31), 129-163. Retrieved July 25, 2024, from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1794-24702019000100129&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702019000100129&lng=en&tlng=es).
- Villarreal-Delgado, María Fernanda, Villa-Rodríguez, Eber Daniel, Cira-Chávez, Luis Alberto, Estrada-Alvarado, María Isabel, Parra-Cota, Fannie Isela, & Santos-Villalobos, Sergio de los. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista mexicana de fitopatología*, 36(1), 95-130. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>
- Raymond, B., Johnston, P. R., Nielsen-LeRoux, C., Lereclus, D., & Crickmore, N. (2010). *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends in Microbiology*, 18(5), 189–194. doi:10.1016/j.tim.2010.02.006
- Chaabouni, I., Guesmi, A., & Cherif, A. (2012). Secondary Metabolites of *Bacillus*: Potentials in Biotechnology. *Bacillus Thuringiensis Biotechnology*, 347–366. doi:10.1007/978-94-007-3021-2\_18
- Galvis, Fabián, & Yolima Moreno, Laura. (2014). Caracterización molecular mediante rep-PCR de aislados nativos de *Bacillus thuringiensis*, obtenidos de muestras de suelo. *Agronomía Costarricense*, 38(1), 223-229. Retrieved July 25, 2024, from [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0377-94242014000100016&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0377-94242014000100016&lng=en&tlng=es).
- McFaddin J. F. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de Bacterias de importancia clínica. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Velasco-Jiménez, A., Castellanos-Hernández, O., Acevedo-Hernández, G., Aarland, R. C., & Rodríguez-Sahagún, A. (2020). Bacterias rizosféricas con beneficios potenciales en la agricultura. *Terra Latinoamericana*, 38(2), 333-345.
- Castillo-Monroy, A. P., & Maestre, F. T. (2011). La costra biológica del suelo: Avances recientes en el conocimiento de su estructura y función ecológica. *Revista chilena de historia natural*, 84(1), 1-21.