



Evaluación bactericida de metabolitos de *Bacillus spp.* aisladas de muestras de suelo

Laura Fabiola Estrada Andrade¹, Ana Celia Juárez Rabanales¹, Estibaliz Sansinenea Royano²,
Maricela de Jesús Alor Chávez².

¹División Académica de Ciencias Básicas, UJAT, Tabasco, México

²Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México

e- mail: laura.estrada@ujat.mx

Resumen

En el presente estudio se llevó a cabo la extracción y evaluación bactericida de metabolitos secundarios, aislados a partir de especies de *Bacillus spp.* Se identificaron, 15 cepas de *Bacillus thuringiensis* y 5 de *Bacillus cereus*, las cuales se aislaron a partir de muestras de suelo provenientes de diferentes estados de la República Mexicana. Los resultados denotaron efectividad en el método de extracción, empleando la matriz amberlita y el caldo tripticasa soya (TSB) como medio de cultivo, obteniendo, 2.0 mg/mL de cada extracto, por cada 125 mL de medio. Se comprobó que 58% de los extractos analizados, tuvo eficiente actividad bactericida contra bacterias Gram positivas, de manera particular las especies, *Streptococcus agalactie* y *Staphylococcus aureus*. El 90% de los extractos presentó deficiencia bactericida contra casi todas las especies Gram negativas, únicamente la especie *Serratia marcescens*, resultó positiva para todos los extractos probados.

Palabras Claves: agua, aire, microorganismos, suelo.

Abstract

In the present study, the bactericidal extraction and evaluation of secondary metabolites, isolated from *Bacillus spp.* We identified 15 strains of *Bacillus thuringiensis* and 5 strains of *Bacillus cereus*, which were isolated from soil samples from different states of the Mexican Republic. The results showed effectiveness in the extraction method, using the amberlite matrix and the triptyse soy broth (TSB) as a culture medium, obtaining 2.0 mg / mL of each extract, for every 125 mL of medium. It was found that 58% of the extracts analyzed had efficient bactericidal activity against Gram positive bacteria, particularly the species, *Streptococcus agalactie* and *Staphylococcus aureus*. 90% of the extracts presented bactericidal deficiency against almost all Gram negative species, only the *Serratia marcescens* species, was positive for all tested extracts.

Recibido: 12 de mayo de 2019. Aceptado: 31 agosto 2019. Publicado: 1 de diciembre de 2019.

1. Introducción

El género *Bacillus* se encuentra entre los agentes más adecuados para el control biológico debido a cualidades tanto morfológicas como fisiológicas que permiten su ubicuidad en la naturaleza [1].

Este género ha tenido mucho éxito en la prevención de patologías vegetales causadas por hongos [2]. La mayoría de las especies del género *Bacillus spp.* produce muchas clases de antibióticos como bacilomicina, fungimicina, micosubtilina y zwittermicina, éstos suprimen el crecimiento de patógenos in vitro y/o in situ [3]. De hecho, *Bacillus spp.* actúa vía antibiosis es decir afectando la interacción biológica del insecto con la relación de organismo que es perjudicial, por la competencia de diversos nutrientes, sitios de exclusión e infección, parasitismo y/o inducción de resistencia [4].



El desarrollo y la comercialización de plantas transgénicas empleando insecticidas de *B. thuringiensis*, han revolucionado la agricultura en las últimas dos décadas. Es un hecho que el uso de insecticidas elaborados a partir de metabolitos de la especie, *B. thuringiensis*, han representado excelentes beneficios económicos, así como una reducción considerable, en el uso de insecticidas químicos [1].

Sin duda alguna, la persistencia de *B. thuringiensis* en el ambiente, resulta relevante, desde el punto de vista ecológico y económico. En general, la bacteria pierde el 50% de su actividad insecticida en 1-3 días, requiriendo muchas veces de una segunda aplicación.

A pesar de que *B. thuringiensis* es una bacteria autóctona de suelo, su forma vegetativa no está bien adaptada a éste, aunque sus esporas pueden sobrevivir bastante tiempo en este ambiente. No se ha observado fitotoxicidad (efectos adversos en plantas) como consecuencia de su uso en campo.

Dada la relevancia e impacto que han denotado múltiples investigaciones acerca del género *Bacillus*, *spp.*, en el presente estudio, se llevará a cabo un análisis de la actividad bactericida de los metabolitos secundarios producidos por especies de este género, contra bacterias Gram positivas y negativas, de manera que los resultados obtenidos, sirvan de plataforma para futuras investigaciones en diversas disciplinas de corte científico, en donde *Bacillus* *spp.*, represente una fuente viable de estudio para el desarrollo de nuevos productos.

2. Teoría

Bacillus thuringiensis (*B. thuringiensis*) es considerada una bacteria ubicua aislada de diversos sistemas como: suelo, agua, hojas de plantas, insectos muertos, etc. Se le ha diferenciado de *Bacillus cereus* (*B. cereus*) y *Bacillus anthracis* (*B. anthracis*), por contener un cuerpo paraesporal conocido como cristal, el cual es de naturaleza proteica con propiedades insecticidas. Está constituido por proteínas denominadas δ -endotoxinas también conocidas como proteínas Cry y Cyt, las cuales son activas contra insectos y plagas en la agricultura y de enfermedades humanas de transmisión por vectores [5]. *B. thuringiensis*, es una bacteria Gram positiva, cuya morfología colonial se denota como colonias de 3 a 8 mm de diámetro β -hemolíticas con hemólisis completa, de color de gris a verde, con aspecto de vidrio esmerilado y bordes regulares.

Su hábitat principal es el suelo. Es considerada parte de la población bacteriana zimógena [6-7], aunque también ha sido aislada de superficies de plantas, cadáveres de insectos y polvo de productos almacenados. Su ciclo de vida es simple. Cuando los nutrientes y las condiciones ambientales son suficientes para crecer, las esporas germinan produciendo células vegetativas que crecen y se reproducen por fisión binaria, en donde las células continúan su multiplicación hasta que uno o más nutrientes, como los azúcares, aminoácidos u oxígeno, se tornan insuficientes, para dar continuidad con el crecimiento vegetativo. Bajo esas condiciones, la bacteria esporula, produciendo una endospora y un cuerpo parasporal (cristal), como se denota en la Figura 1, en donde radica su actividad bioinsecticida. Estos cristales están constituidos de las denominadas δ -endotoxinas o proteínas Cry, las cuales se liberan únicamente bajo lisis celular y codificada en plásmidos extra cromosomales que se pueden replicar de manera independientemente [8].

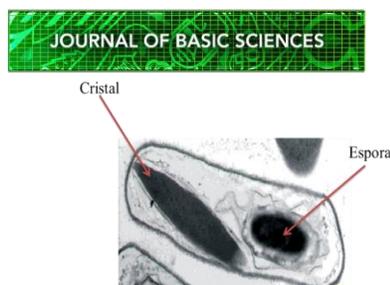


Fig. 1. Cristales y esporas de *B. thuringiensis* [8]

Entre los agentes de control biológico se destacan las bacterias entomopatógenas es decir enfermedades de los insectos causadas por bacterias, hongos, virus, protozoos y nematodos. Entre las que se encuentra *B. thuringiensis*, la cual ha sido empleada como insecticida biológico en el control de insectos y plagas en la agricultura [9].

La actividad bioinsecticida de *B. thuringiensis* radica en las proteínas parasporales llamadas Cry. Las toxinas Cry individuales tienen un espectro de actividad insecticida definido, generalmente restringido a unas pocas especies en un orden en particular de lepidópteros (mariposas y polillas), dípteros (mosquitos y moscas), coleópteros (escarabajos y gorgojos), himenópteros (avispas y abejas) y nematodos (gusanos) [5]. Estas proteínas Cry o δ -endotoxinas se producen en forma de protoxinas que se acumulan intracelularmente como cuerpos de inclusión. Estudios cristalográficos indican que las proteínas Cry tienen tres dominios estructuralmente diferentes, como se denota en la Figura 2. El dominio I se compone de 290 residuos de aminoácidos, con siete hélices hidrofóbicas enlazadas a seis hélices, que rodean a una hélice central. Este dominio está involucrado en la inserción de la toxina en la membrana plasmática y en la formación del poro. El dominio II consiste en seis láminas antiparalelas o tres hojas β . Este dominio es responsable del reconocimiento inicial del receptor y la unión al mismo. Finalmente, el dominio III, está formado por dos hojas β -antiparalelas y forma parte de la unión al receptor en la especificidad del insecto, así como en la regulación de la formación del canal iónico [10].

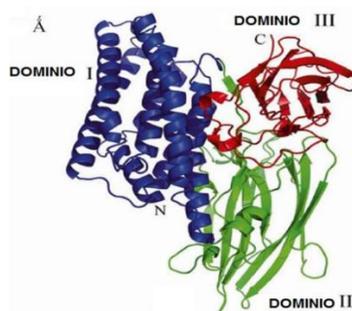


Fig. 2. Estructura cristalina en 3D de la δ -endotoxina [10].

Las δ -endotoxinas deben de ser ingeridas por los insectos para tener efecto. Esta es la razón por la cual los insectos chupadores y otros invertebrados como arañas y ácaros no son sensibles a las proteínas Cry usadas en las formulaciones a base de los insecticidas de *B. thuringiensis*. Su modo de acción involucra varios eventos que deben ser completados varias horas después de su ingestión para que ocurra la muerte del insecto. Siguiendo la ingestión, los cristales son solubilizados por condiciones alcalinas en el intestino medio del insecto y son subsecuente y proteolíticamente convertidos en fragmentos tóxicos [11].



Las toxinas activadas se unen a los receptores (glicoproteínas o glicolípidos) localizados en las membranas de las células epiteliales del intestino medio [12].

Para algunas toxinas se han descrito al menos cuatro diferentes sitios de unión en diferentes insectos del orden Lepidóptera: una proteína tipo caderina (CADR), una N-aminopeptidasa (APN) anclada a glicosilfosfatidil-inositol (GPI), una fosfatasa alcalina anclada a GPI (ALP) y una proteína glicoconjugada. Posteriormente a la unión, la toxina adopta una conformación que permite su inserción en la membrana celular y forma un canal selectivo para cationes [13].

Subsecuentemente ocurre una oligomerización y estos oligómeros forman un poro o canal iónico, que induce un incremento en la permeabilidad catiónica. Una vez que un número suficiente de canales se han formado, una gran cantidad de cationes entran en la célula lo cual causa un desbalance osmótico lo que conduce a una ruptura celular [5].

Los metabolitos secundarios producidos por bacterias, son moléculas relativamente pequeñas producidas por un número limitado de cepas, que al parecer no tienen una función determinada en el crecimiento celular. De hecho, las cepas productoras de éstos, que por alguna mutación han perdido su capacidad de producirla, presentan crecimiento y características normales. Estos metabolitos incluyen diferentes tipos de compuestos de importancia económica, dentro de los cuales se encuentran, los antibióticos, pigmentos, toxinas, feromonas, inhibidores enzimáticos, agentes inmunomoduladores, antagonistas y agonistas de receptores, pesticidas, agentes antitumorales y promotores del crecimiento en animales y plantas [14]. Estos metabolitos producidos por unos pocos organismos, no parecen ser esenciales para su crecimiento y reproducción; su formación depende de las condiciones ambientales donde se encuentre. Existen cuatro clases de estos, los cuales han sido significativos para el ser humano, entre los que destacan los terpenoides, alcaloides, compuestos nitrogenados, fenilpropanoides, compuestos fenólicos y flavonoides [15].

Actualmente, en el sector agrícola se tiene un problema latente que no ha podido ser controlado en su totalidad, y es el desarrollo frecuente de diversos tipos de plagas en cultivos agrícolas. Si bien es cierto, lo anterior ha traído como consecuencia pérdidas cuantiosas de cultivo y por ende cuantiosas pérdidas económicas, en donde se pierde alrededor de un 20 y 30% de la producción total de cultivos. Sin embargo, para contrarrestar dicha problemática, se han venido empleando insecticidas de acción residual y alta toxicidad que dañan al ecosistema y reducen la biodiversidad de diversas especies [16].

B. thuringiensis es un bioinsecticida que se considera inocuo para el humano. Sin embargo, esta bacteria está muy relacionada con *B. cereus* y *B. anthracis*. Entre las principales características que presenta *B. cereus* es su aerobiosis, formadora de endosporas, Gram positiva, causante de severas intoxicaciones alimentarias, comúnmente asociada al consumo de arroz, siendo un patógeno humano oportunista [17].

Los productos elaborados a bases de cepas de *B. thuringiensis*, han ocupado una posición estable en el mercado de insecticidas ya que los insecticidas químicos repercuten de manera negativa en el medio ambiente [18].

3. Metodología experimental

Se trabajaron cepas del género *Bacillus spp*, previamente aisladas e identificadas en trabajos anteriores por Sansinenea (2012), a partir de muestras de muestras de suelo recolectadas de diferentes parques públicos de diferentes estados de la República Mexicana, tal como se muestra en la Tabla 1.



Extracto	Procedencia	Medio	Esporas		Cristal		Observaciones
			Sí	No	Sí	No	
ELI3J1	Chiautla de Tapia (Puebla)	Tris G	X	-	X	-	<i>B.thuringiensis</i>
ELI6J4	Chiautla de Tapia, Puebla	Tris G	X	-	X	-	<i>B.thuringiensis</i>
ELI10T1	Tlapanala, Puebla	Tris G	X	-	-	X	<i>B. thuringiensis</i>
ELI11T2	Tlapanala, Puebla	Tris G	X	-	X	-	<i>B.thuringiensis</i>
ELI12T3	Tlapanala, Puebla	Tris G	X	-	-	X	<i>B.cereus</i>
ELI17Q1	Querétaro	Tris G	X	-	X	-	<i>B.thuringiensis</i>
ELI18Q2	Querétaro	Tris G	X	-	-	X	<i>B.cereus</i>
ELI21VH1	Villahermosa Tab.	Tris G	X	-	X	-	<i>B.thuringiensis</i>
ELI26SA2	Atlixco, Puebla	Tris G	X	-	X	-	<i>B. thuringiensis</i>
ELI27CU2	CU, puebla	Tris G	X	-	X	-	<i>B. thuringiensis</i>
ELI28CU3	CU, puebla	Tris G	X	-	X	-	<i>B. thuringiensis</i>
ELI30J1	Jardinera, Puebla	Tris G	X	-	X	-	<i>B. thuringiensis</i>
ELI31J4	Jardinera, Puebla	Tris G	X	-	X	-	<i>B. thuringiensis</i>
ELI32P5	Patio, Puebla	Tris G	X	-	-	X	<i>B. cereus</i>
ELI33B1	Bacalar Quintana R.	Tris G	X	-	X	-	<i>B. thuringiensis</i>
ELI34B3	Bacalar Quintana R.	Tris G	X	-	X	-	<i>B. thuringiensis</i>
ELI37B8	Bacalar Quintana R.	Tris G	X	-	-	X	<i>B. cereus</i>
ELI40CH1	Chetumal Q. R.	Tris G	X	-	X	-	<i>B. thuringiensis</i>
ELI41CH2	Chetumal Q. R.	Tris G	X	-	-	X	<i>B. cereus</i>
ELI42CH3	Chetumal Q. R.	Tris G	X	-	X	-	<i>B. thuringiensis</i>

Tabla 1. Extractos de *Bacillus spp* obtenidas de diferentes Estados de la República [1].

La metodología se desarrolló en dos fases, conforme lo establecido por Sansinenea (2004), partiendo en primera instancia, de la extracción de los metabolitos secundarios a partir de las muestras de suelo,



seguido del proceso de evaluación del efecto bactericida de dichos metabolitos, contra diferentes especies patógenas.

3.1 Extracción de metabolitos secundarios a partir de cepas de *Bacillus spp.* silvestre utilizando amberlita XAD-16.

Para llevar a cabo el proceso de extracción de los metabolitos secundarios, se prepararon veinte frascos debidamente etiquetados, los cuales contenían 0.7 g de amberlita XAD16 (Sigma aldrich), a los cuales se les efectuaron lavados primeramente con 50 mL de agua destilada y posteriormente con 50 ml de metanol. Los residuos obtenidos tras las decantaciones de cada solución, fueron extraídos, empleando 5 mL de agua destilada y colocados en 125 mL de caldo de cultivo TSB e inoculados respectivamente con las cepas problema. Dichas muestras fueron incubadas a 30°C por 7 días bajo agitación constante a 200 rpm. Posteriormente, se retiró el caldo de cultivo, con la finalidad de obtener únicamente la amberlita, la cual se diluyó en 60 mL de metanol bajo agitación constante durante 20 minutos aproximadamente, hasta la obtención de un color blanco en la amberlita y un color marrón en la solución metanólica. Dicha mezcla fue sometida a centrifugación por un lapso de 5 minutos a 6000 rpm. El sobrenadante obtenido, se colocó en un rotavapor (marca Buchi modelo R-210) para eliminar el exceso de disolvente y obtener el extracto correspondiente, el cual se micro filtró (empleando membranas de 0.45 micras, para la eliminación total de esporas) y se secó en la estufa durante 24 horas a 28°C. Pasado el tiempo, se verificó que los residuos del recipiente estuvieran completamente secos, para finalmente colocar el residuo sólido en tubos Eppendorf perfectamente etiquetados.

3.2 Evaluación del efecto anti bactericida de los metabolitos secundarios extraídos de las cepas de *B. cereus* y *B. thuringiensis*

Las especies a probar (*Serratia marcescens*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *Salmonella sp.*, *Bacillus cereus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Shigella sp.*), fueron suspendidas de manera independiente en caldo LB e incubadas bajo agitación constante a 29°C por 24 horas. Se tomó un inóculo de cada una de ellas de y se colocaron independientemente, en una caja de Petri estéril que contenía 50 mL de agar TSA y discos de papel previamente estériles impregnados con 0.2 µL de los extractos aislados de las cepas de *B. cereus* y *B. thuringiensis*. Las cajas se incubaron a 29°C durante 24 horas.

Finalmente se calculó el porcentaje inhibitorio de los extractos, a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\delta \text{ halo del extracto} - \delta \text{ halo de formación del blanco}}{\delta \text{ halo del control} - \delta \text{ halo de formación del blanco}}$$

De donde:

δ = diámetro

Halo del extracto = diámetro de inhibición del extracto

Halo del blanco = diámetro de inhibición del agua

Halo del control = diámetro de inhibición del antibiótico



4. Resultados experimentales

La extracción de metabolitos secundarios a partir de cepas del género *Bacillus spp* se llevó a cabo de manera efectiva empleando el medio de cultivo (TSB). Se obtuvieron metabolitos secundarios, los cuales denotaron una coloración marrón posterior al proceso de secado, en cantidades (mg) diferentes, de cada una de las cepas muestreadas, por cada 125 mL de cultivo como se presenta en la Tabla 2, a los cuales se les evaluó su actividad bactericida correspondiente.

Extractos	Cantidad (mg)	Concentración (mg/ mL)
J1 ELI3	105.5	0.844
J4 ELI6	108.4	0.867
TI ELI10	123.2	0.985
T2 ELI11	117.5	0.94
T3 ELI12	132.0	1.056
Q1 ELI17	167.3	1.338
Q2 ELI18	158.4	1.267
VH1 ELI21	134.6	1.076
SA2 ELI26	148.2	1.185
CU2 ELI27	141.0	1.128
CU3 ELI28	188.6	1.508
J1 ELI30	151.1	1.208
J4 ELI31	164.8	1.318
P5 ELI32	147.3	1.178
B1 ELI33	195.5	1.564
B3 ELI34	180.4	1.443
B8 ELI37	134.4	1.075
CH1 ELI40	103.4	0.827
CH2 ELI41	219.2	1.753
CH3 ELI42	268.6	2.148

Tabla 2. Cantidad y concentración de extractos obtenidos de las cepas de *Bacillus spp*.

Los extractos obtenidos en la matriz amberlita, fueron evaluados contra una amplia gama de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Para la evaluación, se trabajó con discos estériles, los cuales contenían



la solución control (agua), antibióticos a probar (500 mg/mL de ampicilina y estreptomina, para bacterias Gram negativas y Vancomicina con 50 mg/mL, para bacterias Gram positivas).

Los veinte extractos de *Bacillus spp*, sembrados en cada una de las cajas de manera previa y respectiva, mostraron halos de inhibición, como se muestra en las figuras 3 y 4.

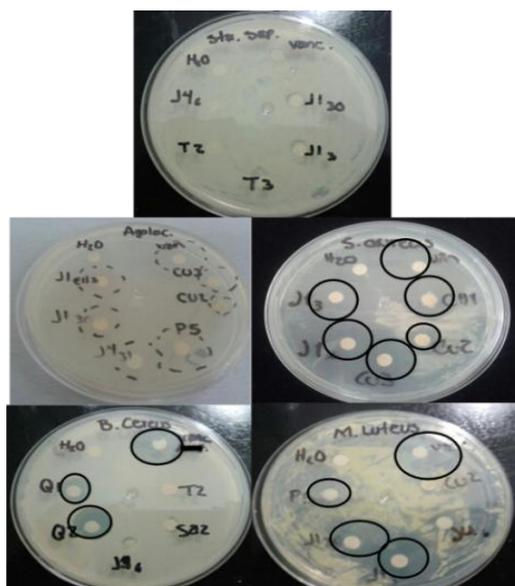


Fig. 3. Pruebas de inhibición de extractos en bacterias Gram positivas

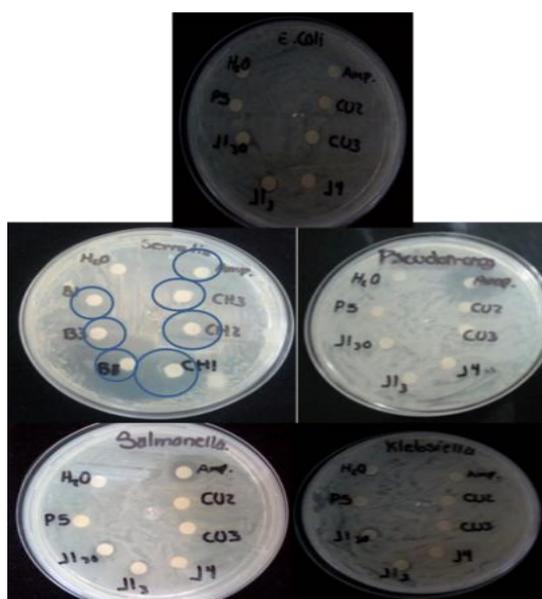


Fig. 4. Pruebas de inhibición de extractos en bacterias Gram negativas

De donde se puede observar que la ampicilina, a pesar de ser un antibiótico específico contra bacterias Gram negativas, no presentó un efecto inhibitorio significativo contra a la gran mayoría de bacterias, lo cual podría adjudicarse a la pérdida de efectividad en la alícuota empleada. Por lo anterior, fue necesario recurrir a la toma de alícuotas mayores de antibióticos, hecho que resultó eficiente, ya que la presencia de los halos de inhibición fue aún más intensa para la ampicilina y estreptomycinina y en menor proporción para la vancomicina, ya que éste denotó mayor especificidad, para bacterias Gram positivas como se observa en la Figura 5.

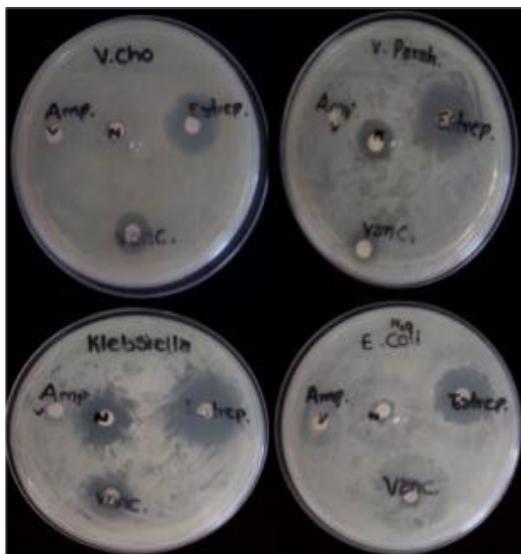


Fig. 5. Pruebas en algunas bacterias Gram negativas con varios antibióticos observando su actividad bactericida.

Las Tablas 3 y 4, muestran los datos de inhibición de los extractos de las bacterias ante los antibióticos empleados, para cepas de *Bacillus spp.*, contra especies Gram negativas y Gram positivas respectivamente, observando, que las bacterias Gram negativas, presentaron mayor resistencia a los extractos. Especies como *V. cholerae* o *Shigella sp.*, resultaron resistentes a la ampicilina, debido a las características propias de la pared y membrana celular de las bacterias Gram negativas, las cuales se encuentran conformadas por una doble estructura lipídica lo cual las hace más resistentes a algunos antibióticos, situación contraria a las bacterias Gram positivas. Se comprobó que *S. marcescens* (bacteria Gram negativa) fue la que presentara mayor sensibilidad a la ampicilina y estreptomycinina, hecho que coincide con estudios realizados por Sansinenea (2004).



Extractos	Especies de prueba							
	<i>E. Coli</i>	<i>Klepsiella pneumoniae</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>V. Parahaemolyticus.</i>	<i>V. Cholerae</i>	<i>Shigella sp.</i>	<i>Salmonella sp.</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Q1 ELI18	---	---	1.3	---	---	---	---	1.0
Q2 ELI17	--	---	1.2	---	---	---	---	---
J4 ELI6	---	---	0.8	---	---	---	---	---
SA2 ELI26	---	---	1.4	---	---	---	---	---
T2 ELI11	---	---	1.0	---	---	---	---	---
T1 ELI10	---	---	1.1	---	---	---	---	---
T3 ELI12	---	---	1.2	---	---	---	---	---
VH1 ELI21	---	---	1.6	---	---	---	---	---
J1 ELI3	0.7	0.6	1.0	---	---	---	0.6	---
J1 ELI30	0.6	0.8	1.2	---	---	---	0.8	---
J4 ELI31	---	---	0.9	---	---	---	---	---
P5 ELI32	---	---	0.9	---	---	---	---	---
CU2 ELI27	---	---	1.1	---	---	---	---	---
CU3 ELI28	---	---	1.0	---	---	---	---	---
B1 ELI33	---	---	1.3	---	---	---	---	---
B3 ELI34	---	---	1.7	---	---	---	---	---
B8 ELI37	---	---	2.5	---	---	---	---	---
CH1 ELI40	---	---	2.2	---	---	---	---	---
Blanco	---	---	---	---	---	---	---	---
Ampicilina (500 mg/mL)	1.5	2.0	3.7	1.3	0.8	1.2	1.0	1.7
Estreptomycin (500 mg/mL)	2.3	2.8	5	2.3	2.0	1.6	2.7	3.0
Vancomicina (50 mg/mL)	0.7	1.5	---	1.1	1.2	1.1	---	---

Tabla 3. Diámetro de inhibición en (mm), de los extractos obtenidos, contra especies Gram negativas



Extractos	<i>Especies de prueba</i>				
	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Sta. aureus</i>	<i>Sta. saprophyticus</i>	<i>Streptococcus agalactie</i>	<i>Bacillus cereus</i>
Q1 ELI17	1.2	1.7	---	1.2	1.3
Q2 ELI18	---	2.3	---	1.1	1.5
J4 ELI6	1.0	1.5	---	1.0	---
SA2 ELI26	2.5	3.0	2.0	1.6	0.7
T2 ELI11	---	1.3	---	---	---
T1 ELI10	1.0	1.4	---	1.3	---
T3 ELI12	1.0	1.2	---	---	---
VH1 ELI21	1.2	1.4	---	1.2	---
J1 ELI3	2.3	3.0	---	1.8	1.1
J1 ELI30	2.0	3.1	---	1.3	0.9
J4 ELI31	1.5	2.4	---	1.5	---
P5 ELI32	1.2	---	---	1.9	---
CU2 ELI27	---	1.2	---	0.8	---
CU3 ELI28	2.0	2.0	---	1.4	---
B1 ELI33	---	1.4	---	1.2	---
B3 ELI34	2.1	2.1	---	1.2	---
B8 ELI37	2.2	2.4	---	1.2	---
CH1 ELI40	2.0	1.7	---	1.4	---
CH2 ELI41	2.0	2.2	---	1.3	---
CH3 ELI42	---	1.8	---	1.1	---
Blanco	---	---	---	---	---
Vancomicina (50 mg/mL)	2.0	3.5	1.5	2.0	2.3

Tabla 4. Diámetro de inhibición en (mm), de los extractos obtenidos, contra especies Gram positivas

Se observó que no todos los extractos presentan una actividad marcada contra las bacterias probadas. Sin embargo, los extractos J1ELI3 y J1ELI30, presentaron una actividad biológica bactericida contra cepas de *E.*



coli, *K. pneumoniae*, *S. marcescens* y *Salmonella sp*, como se muestra en la Tabla 4, lo anterior es indicativo a la posible presencia de algún tipo de metabolito secundario con actividad bactericida.

En la Tabla 5 se observa, que el extracto SA2ELI26, mostró una intensa actividad inhibitoria con todas las bacterias Gram positivas muestreadas, observándose halos de inhibición de color blanco, inclusive mayores a los halos desarrollados para el propio antibiótico. Cabe destacar que el poder inhibitorio de estos extractos contra las bacterias Gram positivas.

Se cuantificó el porcentaje de inhibición de los extractos de *Bacillus spp.* que presentaron mayor inhibición frente a las cepas en estudio. Para tal efecto, se limitaron los extractos que tuvieran efectividad para las bacterias Gram negativas y Gram positivas. Sansinanea (2004), demostró la efectividad de la ampicilina y la vancomicina contra bacterias Gram positivas y Gram negativas respectivamente, por lo que se decidió a emplear ambos antibióticos como referentes para cuantificar el porcentaje de inhibición de cada extracto seleccionado frente a las bacterias correspondientes. Como podemos observar en la figura 6, los extractos J1ELI30 y J1ELI3, fueron los que denotaron mayor actividad inhibitoria (80% y 60%), de manera particular para la especie *Salmonella sp*, seguido del extracto Q1ELI17 con 59% contra *P. aeruginosa*, y el extracto J1ELI30 en un (40%) para las especies *E. coli* y *K. pneumoniae* el de menor efectividad.

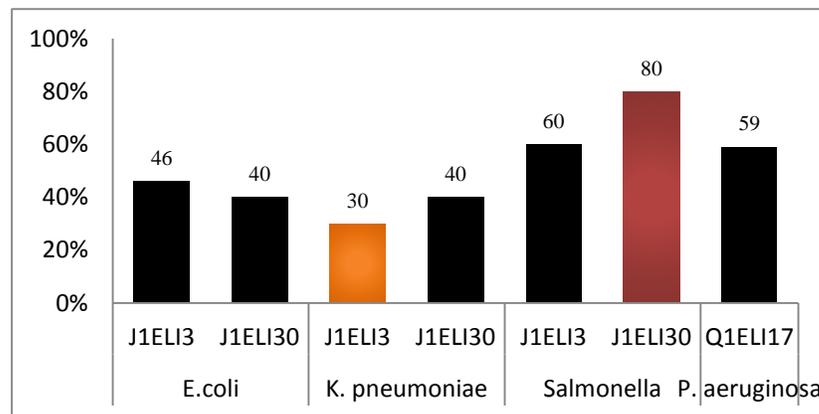


Fig. 6 Porcentaje de inhibitorio de extractos de *Bacillus spp* contra bacterias Gram negativas

De manera particular *S. marcescens*, fue la bacteria que presentó actividad para los veinte extractos, como se muestra en la figura 7, siendo los extractos B8ELI37 y CH1ELI40 los de mayor efecto inhibitorio (67% y 59%) respectivamente.

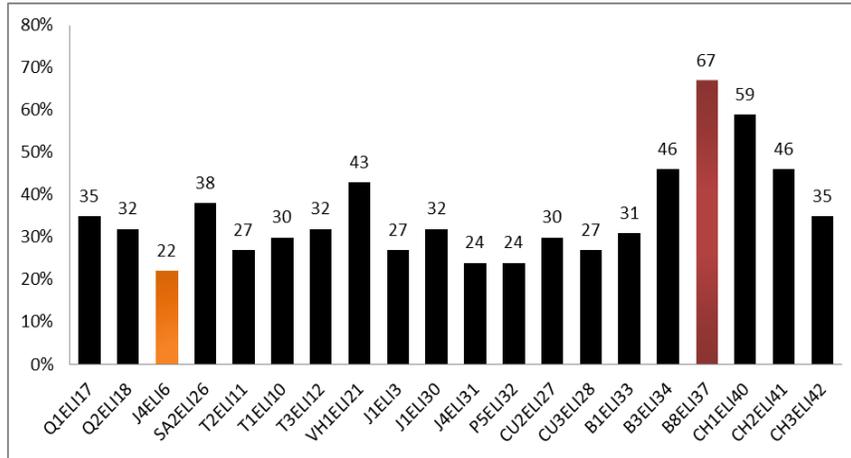


Fig. 7. Porcentaje inhibitorio de extractos de *Bacillus spp.* contra *S. marcescens*

Para la inhibición de bacterias Gram positivas, los extractos que denotaron una efectividad por arriba del 100% contra dichas bacterias fueron el SA2ELI26 (133%), B8ELI37 (125%), J1ELI3 (115%) y B8ELI37, J1ELI3 con 105%, como se denota en la figura 8. Lo anterior indica la capacidad que poseen dichas para inhibir a las bacterias mismas, debido a la presencia del sustrato genético adquirido propio de cada bacteria, desarrollando así una resistencia adquirida, misma que aparece por cambios puntuales en el DNA (mutación), en donde los genes que codifican las porinas bloquean el ingreso del antibiótico al interior del microorganismo.

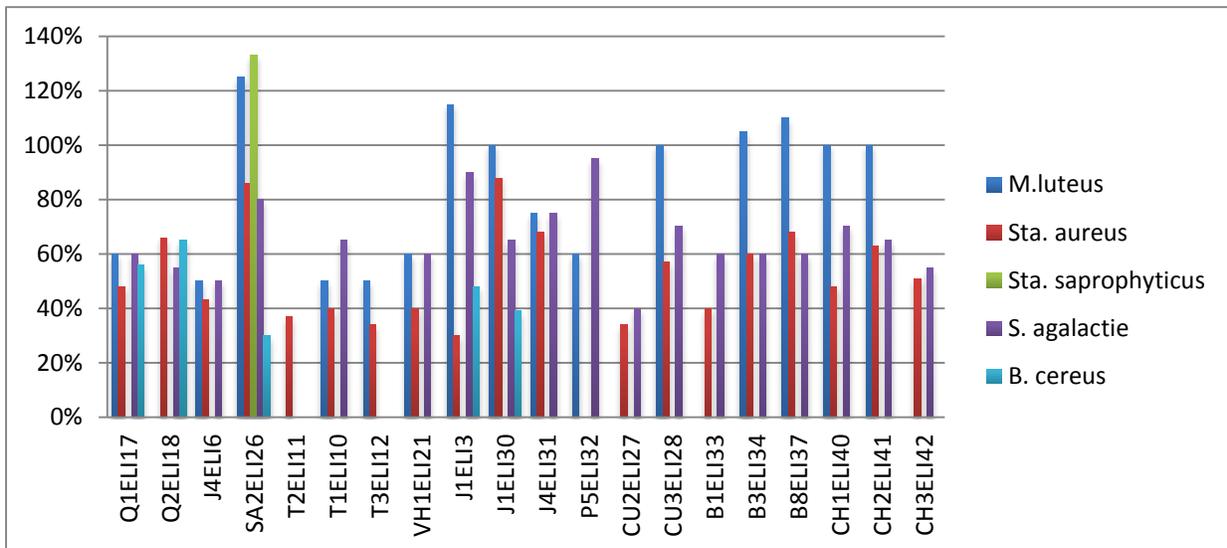


Fig. 8. Porcentaje inhibitorio de extractos de *Bacillus spp* contra bacterias bacterias Gram positivas



5. Conclusiones

Se realizó la extracción con la matriz amberlita de 20 cepas de *B. cereus* y *B. thuringiensis*, obteniendo por cada 125 mL de cultivo una cantidad 0 y 2.0 mg/mL de cada uno de los extractos corroborando su actividad bactericida.

El caldo Soya tripticaseína fue el medio que permitió mayor oportunidad de aislamiento de metabolitos secundarios para la gran mayoría de los extractos.

Se comprobó la actividad bactericida en el 58% de los extractos analizados contra bacterias Gram positivas, con un porcentaje de efectividad mayor, de manera particular, para las especies *S. agalactie* y *Sta. aureus*.

Se comprobó la baja actividad bactericida de los extractos en estudio para bacterias Gram negativas, sin embargo, de las 13 especies en estudio, *S. marcenses* fue la única bacteria positiva para todos los extractos probados, demostrando así un excelente poder inhibitorio de los veinte extractos, para esta especie en particular.

6. Agradecimientos

Nuestro agradecimiento a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, particularmente a la Dra. Estibaliz Sansinenea Royano por el apoyo brindado en cuanto a las instalaciones, equipos y reactivos, para efecto del desarrollo experimental de la presente investigación.

7. Referencias

- [1] Sansinenea, E. *Bacillus thuringiensis* biotechnology. Editorial Springer, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla México (2012).
- [2] Griffiths, J., Haslam, S., Yang, T. "Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin". *Scienc* Vol. 307, p. 922–925, 2005
- [3] Tenover, F., Weige, I L., Appelbaum, P. "Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania". *Antimicrobiology. Agents Chemother*, Vol. 48, p. 275-280, 2004.
- [4] Luzhetskyy, A., Pelzer, S., Bechthold, A. "The future of natural products as a source of new antibiotics". *Current Opinion in Investigational Drugs*, Vol. 8, p. 608-613, 2007.
- [5] Bravo, A., Gill, S., Soberon, M. "Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control". *Toxicon*, Vol. 49, p. 423–435, 2007.
- [6] Bernhard, K., Jarret, P., Butt, J. Meadows, M. "Natural Isolates of *Bacillus thuringiensis*: Worldwide Distribution, Characterization, and Activity against Insect Pests". *Journal of invertebrate pathology*, Vol. 70 (1), p. 59-68, Julio 1997.
- [7] Morris, C. "Bacillus thuringiensis: ecology, the significance of natural genetic modification and regulation". *World Journal of Microbiol and biotechnol*, Vol. 11, p. 471-477, 1995.
- [8] Demain AL, Fang A. "The natural functions of secondary metabolites". *Adv Biochemistry English Biotechnology*, Vol. 69, p. 1–39, 2000.



- [9] Ahmedani, M., Haque, M., Afzal, S., "Scope of commercial formulations of *Bacillus thuringiensis* berliner as an alternative to methyl bromide against *Tribolium castaneum* adults". *Pak Journal Bot*, Vol. 40, p. 2149–2156, 2008.
- [10] Sansinenea, E., Ortiz A., Márquez, J. "Secondary metabolites of soil *Bacillus spp.*", *Biotechnology Letters*, Vol. 33 (3), p. 1523–1538, 2011.
- [11] De Maagd, R. Bravo, A., Berry, C. "Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore forming entomopathogenic bacteria. *Ann Rev Genetic*, Vol. 37 (7), p. 409–420, 2003.
- [12] Lee, M., Walters, F., Hart, H. "The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab δ -endotoxin", *Apply Environmental Microbiology*, Vol. 69 (5), p. 4648–4657, 2003.
- [13] Jurat, F., Adang, M. "Characterization of a Cry1Ac receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae", *Journal Biochemistry*, Vol. 271, p. 3127–3135, 2004.
- [14] Evangelista, M. "Metabolitos secundarios de importancia farmacéutica producidos por actinomicetos", *Biotecnología*, Vol. 11 (3), p. 37-41, 2007.
- [15] Universidad de Granada-Facultad de Ciencias-Departamento de Química Orgánica. (2004). En línea <<http://www.ugr.es/~quiorred/pnatu/secundario.htm>> Recuperado el 18/05/2018.
- [16] Casey, J., Walsh, P., O'Shea, D. "Characterization of adsorbent resins for the recovery of geldanamycin from the fermentation broth", *Separation and Purification Technology*, Vol. 53 (3), p. 281-288, 2007.
- [17] Rosas, N. "*Bacillus thuringiensis*: una aplicación de la ciencia", *Rev. Colombiana de Biotecnología*, Vol. 16 (2), p. 145-151, Julio-diciembre 2014.
- [18] Saxena, D., Ben-Dov, E., Manasherob, R., Barak, Z., "A UV tolerant mutant of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* producing melanin", *Curr Microbiology*, Vol. 44 (3), p. 25–30, 2014.