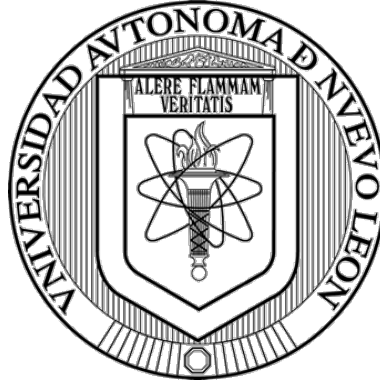


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE DIFERENTES MÉTODOS PARA LA
ESPORULACIÓN TEMPRANA EN UNA CEPA DE *BACILLUS* SP. DE INTERÉS
INDUSTRIAL

POR

MAURO RODRÍGUEZ ZÚÑIGA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAestrÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

2022

EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE DIFERENTES MÉTODOS PARA LA
ESPORULACIÓN TEMPRANA EN UNA CEPA DE *BACILLUS* SP. DE INTERÉS
INDUSTRIAL

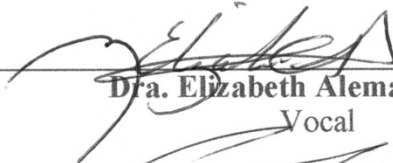
Comité de Tesis



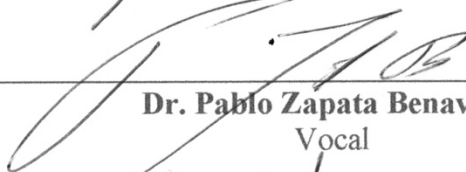
Dr. Katiushka Arévalo Niño
Presidente



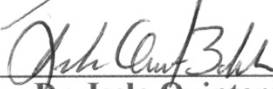
Dra. Susana de la Torre Zavala
Secretario



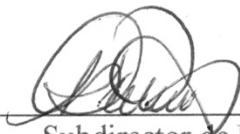
Dra. Elizabeth Alemán Huerta
Vocal



Dr. Pablo Zapata Benavides
Vocal



Dr. Isela Quintero Zapata
Vocal



SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

Subdirector de Posgrado

EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE DIFERENTES MÉTODOS PARA LA
ESPORULACIÓN TEMPRANA EN UNA CEPA DE *BACILLUS* SP. DE INTERÉS
INDUSTRIAL

Dirección de Tesis



Dr. Katiushka Arévalo Niño
Director

DERECHOS RESERVADOS©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para los estudios de Maestría realizada.

Agradecimiento a la Universidad Autónoma de Nuevo León por permitirme llevar a cabo los estudios de la Maestría realizada.

A la Dra. Katiushka Arevalo Niño como director del proyecto y sub-director de posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

Al Dr. José Santos García Alvarado como coordinador del programa de Maestría en Ciencias con orientación en Microbiología.

Agradecimiento al Instituto de Biotecnología de la UANL y al personal del L1 por permitirme llevar a cabo los experimentos correspondientes a la tesis de la Maestría realizada.

DEDICATORIA

A mi familia.

Por haberme apoyado en este largo proceso demostrando su paciencia y el amor que tienen hacia mi. A mis primos, tíos y abuelos por siempre interesarse en el desarrollo y evolución de mi proyecto y animándome a seguir avanzando.

Amigos

Daniela, Milena, Carla y Alejandro: por el apoyo moral y buena amistad que me han regalado por más de 10 años.

L1

Dra. Katiushka Arévalo Niño: Por una vez más haberme abierto las puertas del laboratorio para realizar un nuevo proyecto de tesis.

Dra. Eugenia Guadalupe Ortiz Lechuga: Por los invaluable consejos y ayuda en el laboratorio, y por ser mi amiga y mentora en este proyecto de investigación.

Katy: por siempre tener buenos memes y ser buena amiga durante estos años.

Raúl & Renato: La MC no hubiera sido lo mismo sin ustedes. Me deben unos chicharroncitos de la San Juan, perros.

Índice

INTRODUCCIÓN	1
1. Importancia de la esporulación bacteriana.	2
1.1 Productos comerciales de cepas esporulantes.	3
1.2 Actividad lipolítica de microorganismos.	4
2. Mecanismos moleculares de la esporulación bacteriana.	5
3. Esporulación Inducible.	7
JUSTIFICACIÓN	10
HIPÓTESIS	11
OBJETIVO GENERAL	12
4. Objetivos particulares.	12
MATERIALES Y MÉTODOS	13
1. Producto comercial.	13
2. Aislamiento.	13
3. Caracterización microbiológica.	13
3.1 Morfología.	13
3.2 Actividad lipolítica.	14
3.3 Actividad de lipasas libres de células.	14
3.4 Cinética de crecimiento.	15
4. Identificación molecular.	15
5. Esporulación bacteriana.	15
5.1 Inducción de la esporulación.	16
5.2 Eficiencia de la esporulación.	18
6. Efecto de la esporulación inducida.	18
6.1 Curva estándar nitrofenol.	19
6.2 Ensayo para cuantificación de actividad lipolítica.	19

7. Análisis estadístico.....	20
RESULTADOS.....	21
1. Caracterización microbiológica.	21
1.1 Actividad lipolitica.....	22
1.2 Cinetica de crecimiento.....	23
2. Identificación molecular.....	24
3. Inducción de la esporulación.....	24
3.1 Medio SM.....	25
3.2 Medio mínimo FAM.	27
3.3 Metilxantina (caféina).	27
3.4 Decoyinina.	29
3.5 Sobrenadante liofilizado.....	30
3.6 Comparación de la esporulación.	31
4. Efecto de esporulación inducida.	32
DISCUSIÓN	34
CONCLUSIÓN	41
BIBLIOGRAFÍA.....	42

Índice de tablas

Tabla 1. Inductores y medios empleados para ensayo de esporulación.....	16
Tabla 2. Resultados obtenidos del conteo de UFC/ml con y sin tratamiento termico.	25
Tabla 3. Porcentaje de esporulación obtenido en cada tratamiento.	25
Tabla 4. Actividad enzimatica de las lipasas expresada en IU/L.....	33

Índice de figuras.

Figura 1. Esquematación breve del proceso de fosforilación de Spo0A para dar inicio a la esporulación en <i>Bacillus</i> . Tomada de Mancilla & Castaño, (2013).....	7
Figura 2. $\Delta\text{abs}/\text{min}$ = cambio en la absorbancia por minuto. VT= volumen total de reacción en mL. 1000= factor de conversión para Litros. 17.91= coeficiente de extinción de p-nitrofenol. VM= volumen de muestra. (Ortiz, E., 2016).....	19
Figura 3. A y B) Producto comercial de consorcio bacteriano, presentación de empaque y polvo; C) morfología macroscópica de cepas asiladas; D) morfología microscópica, bacilos Gram(+).	21
Figura 4. Presencia de endosporas bacterianas teñidas de color verde, luego de llevar a cabo la tinción de Schaeffer–Fulton con verde malaquita.	22
Figura 5. A) Medio agar Rodamina B al 0.02% p/v; B) Emulsión lipídica luego de agitación; C) Crecimiento de cepas sin actividad lipolítica; D) Crecimiento de cepas con actividad lipolítica; E) Fluorescencia de cepas con actividad lipolítica.	22
Figura 6. A, B y C) Cepas empleadas en el protocolo de actividad de lipasas libres de celulas; D) Halos de hidrolisis obtenidos durante el ensayo de lipasas; E) Cepa con mayor fluorescencia bajo luz UV 350 nm.	23
Figura 7. Cinética de crecimiento de la cepa de <i>Bacillus</i> sp. seleccionada y cultivada en caldo LB y caldo nutritivo.....	24
Figura 8. UFC/mL de medios SM, LB y CN sin tratamiento térmico a 12, 24 y 48 horas de cultivo.	26
Figura 9. Cinética de crecimiento obtenida del medio SM comparada contra medio LB.	26
Figura 10. UFC/mL de los medios FAM, LB y CN sin tratamiento térmico, a 12, 24 y 48 horas de cultivo.	27
Figura 11. UFC/mL de los medios LB con cafeína, LB y CN sin tratamiento térmico, a 12, 24 y 48 horas de cultivo.	28

Figura 12. Cinética de crecimiento obtenida del medio LB con cafeína comparada contra medio LB.....	28
Figura 13. UFC/mL de los medios LB con decoyinina, LB y CN sin tratamiento térmico, a 12, 24 y 48 horas de cultivo	29
Figura 14. Cinética de crecimiento obtenida del medio LB con decoyinina comparada contra medio LB.....	29
Figura 15. UFC/mL de los medios LB con sobrenadante liofilizado, LB y CN sin tratamiento térmico, a 12, 24 y 48 horas de cultivo.	30
Figura 16. Cinética de crecimiento obtenida del medio LB con sobrenadante liofilizado comparada contra medio LB.	30
Figura 17. Comparación de los resultados obtenidos de la esporulación inducida obtenidos a las 12 horas de cultivo.	31
Figura 18. Comparación de los resultados obtenidos de la esporulación inducida obtenidos a las 24 horas de cultivo.	31
Figura 19. Comparación de los resultados obtenidos de la esporulación inducida obtenidos a las 48 horas de cultivo.	32
Figura 20. Curva estándar de p-nitrofenol.	33
Figura 24. Pruebas de cepas formadoras de esporas para determinar sus actividades causantes de deterioro a la temperatura de fermentación del yogur de 42 °C; tomada y modificada de Mehta et al., (2019).	40

RESUMEN

El interés en el proceso de esporulación en bacterias de importancia industrial radica en buscar aprovechar esta característica morfológica que le brinda propiedades de alta resistencia a condiciones adversas del medio ambiente con la finalidad de brindarles una ventaja comercial a los productos a partir de estas como un mayor tiempo de vida de anaquel. Diversos estudios demuestran que es posible inducir la esporulación bacteriana mediante la sobre expresión de ciertos genes involucrados en el proceso. Los medios específicos de esporulación, así como el uso de inductores permiten reducir los tiempos de producción de endosporas bacterianas, lo cual puede resultar de gran utilidad en procesos de producción industrial. En este proyecto se aisló y seleccionó una cepa a partir de un consorcio comercial empleado en biorremediación de aguas residuales, mediante un protocolo de actividad lipolítica en medio FAM suplementado con aceite de oliva como única fuente de carbono. La cepa se identificó como *Bacillus velezensis*, y se sometió a diferentes tratamientos de inducción para obtener esporas bacterianas. Se encontró que solo 2 de los tratamientos empleados, decoyinina y sobrenadante liofilizado, permiten obtener esporas a las 8 horas de haber sido adicionados al medio, y obtienen su mayor rendimiento de esporulación a las 24 horas de cultivo. El medio de cultivo adicionado con cafeína y el medio mínimo FAM no presentaron esporas a las 48 horas de cultivo, mientras que el resto de los tratamientos no presentó diferencia significativa en el número de UFC/ml a partir de esporas a esta misma hora.

ABSTRACT

The interest in the sporulation process in the industry lies in seeking to take advantage of this morphological characteristic that provides high resistance properties to adverse environmental conditions in order to provide a commercial advantage to the products from these bacteria, such as a longer shelf life. Several studies show that it is possible to induce bacterial sporulation by overexpressing certain genes involved in the process. Specific sporulation media, as well as the use of inducers, allow reducing the production times of bacterial endospores, which can be very useful in industrial production processes. In this project, a strain was isolated and selected from a commercial consortium used in wastewater bioremediation, using a FAM medium supplemented with olive oil as the only carbon source in a lipolytic activity protocol. The strain was identified as *Bacillus velezensis*, and was subjected to different induction treatments to obtain bacterial spores. It was found that only 2 of the treatments used, decoyinin and lyophilized supernatant, allowed obtaining spores at 8 hours after being added to the medium, and obtained their highest sporulation yield at 24 hours of culture. The culture medium added with caffeine and the FAM minimal medium did not present spores at 48 hours of culture, while the rest of the treatments did not present significant differences in the number of CFU/ml from spores at the same time.

INTRODUCCIÓN

El drástico cambio morfológico al que se someten algunas bacterias para resistir condiciones adversas y de escasas de nutrientes se conoce como esporulación bacteriana, un proceso ampliamente estudiado en microorganismos del género *Bacillus* y *Clostridium*. Estos microorganismos tienen la capacidad de producir una espora a partir de una célula vegetativa o célula madre, y está compuesta por una envoltura externa llamada exosporio, capas de peptidoglicanos y el protoplasto de la espora, que comprende pared celular de la célula germinal, membrana y una estructura similar a un núcleo, en el que se almacena enzimas, ribosomas, dipicolinato de calcio y ADN asociado a proteínas pequeñas ácido-solubles (SASP).

De acuerdo con Mancilla & Castaño (2013) las bacterias tienen siete fases o estados morfológicos durante la esporulación. En la fase I el ADN adquiere una forma de filamento axial, posteriormente en la fase II se forma una doble membrana asimétrica, continuando en la etapa III, donde se constituye la pre-espora. En la fase IV se forma la corteza de la espora que está compuesta de peptidoglicanos, seguido de la fase V, durante la cual se genera la cubierta de la espora conformada por proteínas ricas en residuos de cisteína. Durante la fase VI se forma la espora madura junto con su gran resistencia ambiental, concluyendo en la fase VII, donde se lleva a cabo la liberación por medio de lisis de la célula madre.

Aunque la formación de esporas bacterianas conlleva a diversos problemas de contaminación en alimentos y otros productos de consumo humano (debido a la dificultad que se tiene para eliminarlos por métodos de esterilización tradicional), existe un gran interés por parte de algunas industrias para explotar la formación de estas morfologías súper resistentes y aplicarlas en diferentes productos comerciales para sectores agrícolas, farmacológicos e incluso alimenticios, por lo que actualmente se investigan nuevas cepas diseñadas con la finalidad de inducir la esporulación, acortando así los tiempos de producción y permitiendo un mejor estudio del proceso.

1. Importancia de la esporulación bacteriana.

El estudio de microorganismos formadores de esporas no es un tema nuevo, ya que se remonta hasta el año de 1872 cuando Cohn y colaboradores describieron al genero *Bacillus* como bacterias productoras de endosporas resistentes al calor (Villarreal-Delgado et al., 2018). Durante el paso de los años se han llevado a cabo innumerables y diversos estudios resaltando la importancia del proceso de esporulación bacteriana presente en diversos organismos tanto anaerobios estrictos como *Clostridium* y aerobios como los ya mencionados *Bacillus*, entre otros tantos géneros relacionados que pueden ocasionar diversos problemas de salud al ser organismos patógenos y contaminar productos agrícolas e industriales (Heyndrickx, 2011).

A pesar de esto, la resistencia química y física de las endosporas bacterianas, así como su habilidad de sobrevivir y germinar después de ser expuestas a diferentes ambientes letales para muchos organismos, resultan de gran interés para su estudio y aplicación practica en diferentes sectores de la industria (Sella et al., 2014). La habilidad de germinar y crecer define la aplicación especifica que se le puede dar a las endosporas bacterianas en los diferentes sectores industriales, tales como el sector alimenticio y farmacéutico en forma de probióticos y acarreadores de medicamentos al ser resistentes al pH acido del estomago y alcanzar intactas el tracto gastrointestinal para germinar y crecer junto con el resto del microbioma. Otras funciones importantes incluyen agentes de biocontrol para plantas al actuar como promotores del crecimiento, y en casos más recientes se han utilizado para llevar a cabo procesos de “auto saneamiento” en estructuras de concreto (Silva et al., 2015).

Sin embargo, la esporulación puede ser un proceso estocástico y no homogéneo ya que solo una porción de la población bacteriana lo llevará a cabo aun bajo condiciones óptimas (Chastanet et al., 2010). Esto representa una área de oportunidad para los investigadores ya que actualmente la industria esta teniendo un constante incremento en la demanda de esporas bacterianas rebasando los 60 millones de euros anuales en Europa, por lo que una optimización del proceso resulta de gran interés (Silva et al., 2015).

1.1 Productos comerciales de cepas esporulantes.

Como se mencionó anteriormente, los productos industriales en donde se emplean cepas bacterias formadoras de endosporas están en constante y creciente demanda. En el 2012 solamente, los productos probióticos basados en esporas bacterianas mostraron un incremento del 22% en el mercado europeo (Silva et al., 2015). De igual forma, el uso de gran diversidad de especies del género *Bacillus* han demostrado tener actividad antagónica contra organismos fitopatógenos de cultivos como arroz, frutos, maíz, así como actividad insecticida, producción de antibióticos, sideróforos, enzimas líticas, toxinas de interés agrícola, entre otros (Villarreal-Delgado et al., 2018).

En el sector alimenticio, las cepas de *B. cereus*, *B. clausii*, *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *B. polyfermenticus*, *B. pumilus*, y *B. subtilis* se utilizan como productos probióticos con propiedades antimicrobianas, anticancerígenas, antioxidantes y como productores de vitaminas (Lee et al., 2019).

Así mismo, diversas cepas formadoras de esporas son empleadas en la biorremediación para el tratamiento de diferentes tipos de contaminantes terrestres y acuáticos para degradar los componentes tóxicos, como pueden ser aceites, hidrocarburos, contaminantes provenientes de industria minera, aguas residuales, entre otros. En la actualidad existen diversas empresas que comercializan y distribuyen consorcios bacterianos con la finalidad de eliminar diversos contaminantes (Claassens et al., 2006; Zhu et al., 2004). Una de las ventajas que presentan las esporas para productos comerciales es la capacidad de permanecer en estado inactivo y resistente a condiciones adversas durante décadas, esto debe suponer una mayor vida de anaquel y periodos extensos de almacenamiento de los productos comerciales. Algunas de las empresas encargadas de comercializar productos para la biorremediación son *BioEnviro Tech*, *International Environmental Products*, *Societe*, *CECA S.A.*, *Land and Sea Restoration LLC*, *Verde Environmental, Inc.*, *Oil Spill Eater International Corporation*, *Oppenheimer Biotechnology, Inc.*, *Marine Systems*, *B & S Research, Inc.*, *Quantum Environmental Technologies, Inc.*, *BioNutraTech, Inc.*, *WMI International, Inc.* (Zhu et al., 2004) así como *Monera Technologies Corporation* que adquirió otra empresa conocida por sus productos de biorremediación, *Bioscience, Inc.*, y que continúan presentando su catálogo comercial con descripciones como “*formulaciones con contenido $>3 \times 10^9$ /gramos de*

microorganismos preseleccionados y adaptados en polvo granulado con vida de anaquel de 2 años” en presentaciones de 11.3 Kg hasta 100 Kg (Bioformula, 2015) por mencionar un ejemplo.

1.2 Actividad lipolítica de microorganismos.

Con base en la definición de la Comisión de Enzimas de la IUPAC, podemos definir a las lipasas (Triacilglicerol éster hidrolasas, EC 3.1.1.3) como enzimas que catalizan la hidrólisis de triacilglicéridos hasta alcohol y ácidos grasos libres, además de otras reacciones que implican ésteres carboxílicos tales como esterificación, acidólisis, interesterificación y alcoholólisis (Leyva, 2016). Son consideradas enzimas ubicuas ampliamente distribuidas en animales, plantas y microorganismo como hongos y bacterias, las cuales presentan la capacidad de secretarlas al medio extracelular, lo que facilita muchos de los procesos de extracción y purificación para la industria (Pedroza, C. et al., 2017).

Durante décadas se han empleado cepas de microorganismos tales como *Pseudomonas aeruginosa* para la producción de lipasas y de esta manera caracterizar dichas enzimas y así poder aprovecharlas en usos industriales (Palmeros et al., 1994). Otros microorganismos productores de lipasas incluyen *Arthrobacter* sp., *Staphylococcus* sp. y *Bacillus* sp. Las lipasas del género *Bacillus* han sido de especial atención debido a las secuencias de proteínas consideradas únicas, junto con diversas propiedades bioquímicas consideradas poco comunes, por lo que se han caracterizado muchas lipasas producidas por *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenuatus* y *Bacillus thermoleovorans* (Massadeh & Sabra, 2011). Sumado a esto, se han estudiado diversas regiones con suelo contaminado con aceites y se ha encontrado que dentro de los microorganismos que proliferan en ellos se encuentran los bacilos esporulados (Leyva, 2016).

2. Mecanismos moleculares de la esporulación bacteriana.

Diversos procesos de señalización están involucrados para dar lugar a la esporulación bacteriana, durante la cual los microorganismos segregan su material genético y lo envuelven en una doble membrana proveniente de la invaginación de la membrana original, continuando con la maduración de la endospora, la cual contiene alrededor de 80 proteínas en un arreglo específico que forman la capa interior y exterior, junto con una fuerte porción de peptidoglicanos entre ellas. Este proceso toma diversas horas para concluir en una lisis de la célula madre para liberar las esporas maduras (Sella et al., 2014). Las señales ambientales que promueven la esporulación pueden ser falta de nutrientes, altas concentraciones minerales, pH neutro, temperatura y alta densidad celular, la cual está relacionada con la acumulación de ciertos péptidos secretados que son detectados por receptores de membrana. Diversos estudios demuestran que la formación de endosporas es el último recurso que adoptan las bacterias ya que existen diversas alternativas que deben explotarse antes de someterse al extremo cambio morfológico y fisiológico que conlleva la esporulación, tales como activación de flagelos y búsqueda de nutrientes por quimiotaxis junto con la secreción de compuestos antimicrobianos y enzimas hidrolíticas para eliminar organismos competidores, entre otras alternativas (Sella et al., 2014; Stephens, 1998).

La activación del proceso de esporulación comienza con la activación de lo que muchos autores denominan el regulador maestro, Spo0A. Este regulador transcripcional se acumula gradualmente durante los primeros 90 minutos de la esporulación y solo es activo en su forma fosforilada Spo0A~P. Algunos de los genes bajo su control están involucrados en la formación de biopelículas y procesos de canibalismo, y se ven activados con bajas concentraciones de Spo0A~P ya que presentan sitios de unión fuertes. Por otro lado, los genes involucrados para la esporulación tienen sitios de unión débiles y se activan con concentraciones elevadas de Spo0A~P (Chastanet et al., 2010). La activación de Spo0A se lleva a cabo manera postraduccional y esta mediada por un complejo de fosforilación que consiste de varios sensores quinasas (Kin A – Kin E), las cuales responden a señales externas por auto fosforilación y una subsecuente transferencia de residuos de fosfato de

manera directa a Spo0A o por medio de algunos intermediarios como Spo0F y Spo0B. (Dembek et al., 2017). La fosforilación de Spo0A se lleva a cabo en el residuo aspartato localizado en la porción N-terminal de la proteína. Esta fosforilación estimula la capacidad de Spo0A de unirse a su secuencia de reconocimiento en el ADN, conocida como 0A-box, por medio de un dominio de unión a ADN localizado en la porción C-terminal de la proteína (Fujita & Losick, 2005).

El regulador Spo0A se encuentra muy conservado entre especies bacterianas del género *Bacillus*, sin embargo, no se han encontrado homólogos de Spo0F y Spo0B en cepas de *Clostridium*, por lo que el sistema de fosforilación cambia entre organismos esporulantes (Dembek et al., 2017).

Los diferentes cambios morfológicos de la bacteria durante la esporulación se ven acompañados por la activación de diferentes factores de transcripción sigma, los cuales incluye SigH, SigF, SigE, SigG y SigK (σ H, σ F, σ E, σ G and σ K) presentes en diferentes etapas y compartimientos de la endospora (Tu et al., 2020). Primero, altos niveles de σ H y Spo0A activan la esporulación y llevan a la expresión de pro- σ F. Durante la división asimétrica de la célula, σ F es activado únicamente en la pre-espora. La transcripción de σ E en la célula madre es activado por una cierta cantidad de Spo0A~P, mientras que σ G y σ K se activan por separado y secuencialmente en la pre-espora y célula madre respectivamente. Sigma A, un factor sigma considerado housekeeping, permanece activo en la pre-espora y célula madre durante todo el proceso de esporulación (Sella et al., 2014). Al estimular Spo0A~P la transcripción de su propio gen (*spo0A*), también estimula la transcripción del gen *spo0F* que codifica a Spo0F. De manera contraria, Spo0A~P reprime al gen *abrB* que codifica la proteína AbrB, la cual se encarga reprimir la transcripción del gen *sigH* que codifica para el factor sigma H. Finalmente, Spo0A~P, mediante la represión de *abrB*, des reprime el gen *spo0E* para codificar *Spo0E*. Las primeras dos vías mencionadas (Spo0A~P → *spo0A*; Spo0A~P → *spo0F*) son loops positivos, al igual que la tercera vía (Spo0A~P ⊣ *abrB* ⊣ *sigH*) en donde sigma H dirige la transcripción de *kinA*, *spo0A* y *spo0F*. Sin embargo la cuarta vía de señalización (Spo0A~P ⊣ *abrB* ⊣ *spo0E*) es un loop negativo debido a que Spo0E drena de fosfatos el arreglo molecular (Chastanet et al., 2010).

Estas vías de fosforilación proveen de oportunidades para diversos niveles de regulación más allá de solo la esporulación, lo que permite cierto grado flexibilidad y control al sistema (Fujita et al., 2005), es decir, los diferentes niveles de concentración de Spo0A fosforilado permitirá la activación de diferentes genes con funciones específicas, se sabe que en *B. subtilis* el regulón de Spo0A se compone de aproximadamente 120 genes, mientras que en *C. difficile* controla alrededor de 300 (Dembek et al., 2017).

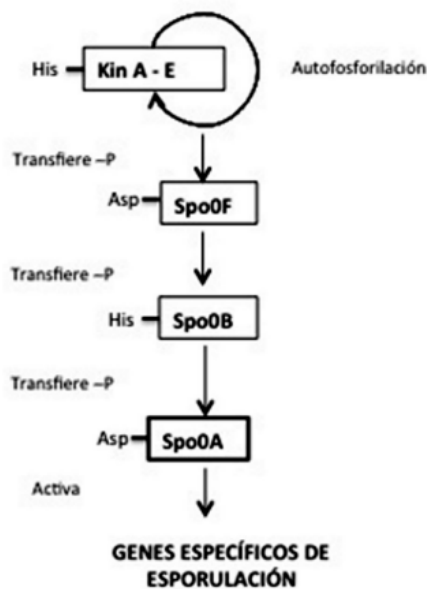


Figura 1. Esquematación breve del proceso de fosforilación de Spo0A para dar inicio a la esporulación en *Bacillus*. Tomada de Mancilla & Castaño, (2013).

3. Esporulación Inducible.

Como se ha mencionado ya, durante la esporulación se ven involucrados diversos genes y elementos regulatorios, por lo que el proceso demanda mucha energía y tiempo para las bacterias y es debido a esto que solo recurren a ello como última alternativa en condiciones adversas. El inicio de la esporulación se da de manera heterogénea y es debido a eso que se complica el estudio de dicho proceso (Tu et al., 2020). Debido a esto, diversos autores

han llevado a cabo procesos de inducción temprana o artificial de la esporulación con el fin de estudiar diversos aspectos moleculares del proceso. Algunas de las metodologías implementadas incluyen el uso de medios específicos para la esporulación, como lo son los medios CAD (*Casein Acid Digest*), medio CDSM (*Chemically Defined Sporulation Medium*) y NSM (*Nutrient Sporulation Media*), de los cuales este último fue el mejor para la inducción de esporas por *B. subtilis* (Diane Amant, 2003).

De igual manera, se ha logrado inducir la esporulación por medio de la adición de productos como decoyinina, el cual es un inhibidor de GMP sintasa que promueve la esporulación de células en crecimiento exponencial aun y en presencia de fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato (Tojo et al., 2013).

Por otro lado, Dembek et al. (2017) lograron acoplar un promotor inducible con sus elementos reguladores 30bp río arriba del ORF del gen *spo0A* de *C. difficile* generando una cepa *Ptet-spo0A*. Los elementos *tet* estaban compuestos por promotores *Ptet* y *PtetR* regulados por tetraciclina. *TetR*, que reprime *Ptet* y *PtetR*, introducía un loop negativo al sistema permitiendo un mayor nivel de control. Con esta nueva cepa demostraron que podían inducir la esporulación de manera artificial con la adición de anhidrotetraciclina (ATc), un análogo de tetraciclina, observando que la cepa era asporógena en la ausencia de Atc y que dosis de este compuesto impulsaban y aceleraban una esporulación más eficiente.

Por otro lado, Vishnoi et al. (2013) emplearon un sistema en donde la KinC era expresada por medio de un promotor inducible por IPTG junto con un promotor de de Spo0A inducible por xilosa. Utilizando este sistema determinaron la relación que existe entre la esporulación y los niveles de expresión de KinC y Spo0A, encontrando que la eficiencia de la esporulación depende de forma no monótona de los niveles de estas proteínas a pesar del hecho de que la actividad de Spo0A aumenta de forma monótona con aumentos en Spo0A y KinC. Demostraron que la inducción simultánea de KinC y Spo0A por medio de los promotores mencionados podía activar de manera eficiente el proceso de

esporulación incluso bajo condiciones ricas en nutrientes, sin embargo, la esporulación se veía dañada significativamente cuando la inducción de KinC o Spo0A era muy elevada. En otro estudio realizado por Zhiwei Tu et al. (2020) se logró inducir la esporulación al sobre expresar el gen *kinA*, sincronizando así la expresión de KinA y controlando la concentración de glucosa en el medio, donde altas concentraciones reprimen mientras que bajas concentraciones de glucosa baja des reprimen la fosforilación de Spo0A. Los resultados que obtuvieron indicaron que la esporulación sincronizada mediante la sobre expresión de *kinA* generaba un rendimiento de esporas del 70% en 8 horas, una mejora significativa al comparar con células Wt, las cuales alcanzaban valores similares hasta pasadas 24 horas de cultivo.

JUSTIFICACIÓN

El proceso de esporulación demanda mucha energía y tiempo para las bacterias y es debido a esto que solo recurren a ello como última alternativa en condiciones adversas al haber consumido los nutrientes del medio y agotado otras opciones para su supervivencia.

Diversos estudios demuestran que es posible acelerar la esporulación induciendo por medio de diferentes componentes los promotores de algunos de los principales iniciadores y reguladores de dicho proceso.

Estas inducciones se han podido llevar a cabo en periodos significativamente más cortos al compararse con su contraparte natural e incluso bajo condiciones ricas en nutrientes, con el propósito de estudiar y caracterizar más a fondo el proceso de esporulación bacteriana. Estos estudios pueden ser aprovechados para acoplar los sistemas propuestos y aplicarlos en cepas actualmente empleadas por la industria que aprovechan la espora bacteriana para aumentar la vida de anaquel de sus productos y reducir los tiempos de producción de estos mismos.

HIPÓTESIS

Es posible inducir la esporulación bacteriana en cepas con actividad lipolítica empleadas actualmente en procesos de biorremediación, lo que permitiría reducir el tiempo de producción del producto comercial.

OBJETIVO GENERAL

Emplear y comparar la eficiencia de diferentes medios de cultivo con inductores de la esporulación bacteriana en cepas con actividad lipolítica empleadas actualmente en la industria.

4. Objetivos particulares

- Aislar, caracterizar e identificar la cepa con mayor actividad lipolítica de un consorcio comercial producido industrialmente para eliminación de grasa vegetales y animales en agua residual.
- Evaluar la eficiencia de diferentes medios de cultivo adicionados con inductores de la esporulación bacteriana comparando el porcentaje de esporas obtenidas a diferentes horas incubación.
- Evaluar el efecto de la esporulación inducida sobre la actividad lipolítica de la cepa empleada.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Producto comercial.

Las cepas de interés se aislaron de un consorcio comercial de cepas con actividad lipolítica empleadas en trampas de grasa de restaurantes y comedores de tipo industrial que comenzaron a comercializarse a principios del 2014 por una distribuidora ubicada en Santa Catarina, Nuevo León. Las cepas no están protegidas ni patentadas y no se hará uso del resto de la formulación del producto comercial ni se llevará a cabo ningún análisis adicional para identificar los diferentes componentes del mismo. La muestra del producto fue otorgada de manera gratuita, sin fines de lucro ni colaboración con este trabajo.

2. Aislamiento.

Basándose en la metodología propuesta por Ortiz et al. (2016) las muestras se procesaron mediante diluciones seriadas en solución salina estéril al 0.85%, utilizando 1 gramo de producto comercial. Se utilizó Agar Nutritivo para el aislamiento de bacterias, se esterilizó con autoclave a 121° C por 15 minutos y se vertió en placas de Petri. La inoculación se realizó a 37 ° C durante 120 horas. Para una selección primaria de la actividad lipolítica de las cepas, se llevó a cabo un estriado simple en placas de agar Rodamina B y se observó bajo fluorescencia.

3. Caracterización microbiológica.

3.1 Morfología.

Se llevaron a cabo tinciones de Gram para observar la morfología microscópica de las cepas aisladas durante la selección primaria de la actividad lipolítica en medio agar Rodamina B. Luego de 48 horas de dicho cultivo, se realizaron tinciones de Schaeffer–Fulton con verde malaquita para observar la presencia de endosporas bacterianas. La morfología macroscópica se observó en subsecuentes cultivos sobre agar nutritivo y medio agar LB.

3.2 Actividad lipolítica.

Continuando con la metodología propuesta por Ortiz et al., (2016) para identificar cepas con la mayor actividad lipolítica se utilizó la intensidad de fluorescencia como criterio de selección. Se empleó un medio base conteniendo 1.25 gramos de extracto de levadura, 4.5 gramos de caldo nutritivo y 10 gramos de agar bacteriológico en 450 ml de agua destilada. La emulsión lipídica fue preparada con 200 ul de Tween 80, 30 ml de aceite de oliva y 50 ml de agua ajustando el pH a 7. Ambos preparados se esterilizaron en autoclave a 121 ° C durante 15 minutos por separado. Se utilizaron 50 mg de Rodamina B con 50 ml de agua estéril y se adicionaron 20 ml de esta solución a la emulsión de lipídica con una agitación vigorosa. Se agregaron 50 ml del colorante y solución lipídica a un medio base (Alken-Murray) para obtener un volumen final de 500 ml de Agar Rodamina B al 0.02% p/v. Las placas se analizaron bajo luz UV a 350 nm.

3.3 Actividad de lipasas libres de células.

Basándose en el protocolo propuesto por Julia Pedroza (2017) se preparó un medio mínimo FAM modificado (NaNO_3 10 mM, KH_2PO_4 4 mM, Na_2HPO_4 16 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,4mM, CaCl_2 60 mM y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 9,8 mM), sin agar, suplementado con aceite de oliva 1% v/v como única fuente de carbono. Como componente adicional, se agregaron 250 μl de Tween 80 para facilitar la emulsión lipídica llevada a cabo por ultraagitación durante 15 minutos.

Las cepas previamente aisladas fueron inoculadas en 100 ml del medio mínimo FAM con pH 7.0, e incubadas a 37 °C a 150 rpm durante 48 horas. Posteriormente se tomaron alícuotas de 1 ml y se pasaron por filtros de 0.22 micras para obtener el sobrenadante libre de células en el que se encontraban las enzimas secretadas.

Para la detección de actividad lipolítica se emplearon cajas Petri con agar FAM + aceite de oliva (1% v/v) suplementado con Rodamina B al 0.001%, a las que se les hicieron pozos de 6 mm de diámetro para adicionarles 80 ml del filtrado libre de células. Los cultivos fueron incubados a 30°C por 24-48 horas para luego ser sometidas a luz UV (350 nm) para detectar la actividad enzimática.

3.4 Cinética de crecimiento.

Una vez seleccionada la cepa con mayor actividad lipolítica, se inoculó en caldo LB a 37 °C y 150 rpm durante toda la noche. Posteriormente se ajustó el cultivo a 0.5 - 1 en la escala de Mcfarland para luego tomar un 1 ml de dicho cultivo e inocular un caldo LB estéril. Inmediatamente después de la inoculación y una breve homogenización, se tomaron muestras de 2 ml y se colocaron en celdas de poliestireno para espectrofotómetro, las cuales fueron colocadas en el equipo de espectrofotometría *Beckman Coulter* para tomar lecturas con luz visible con una longitud de onda de 600 nm cada 60 minutos durante 8 horas. Al mismo tiempo, el resto del caldo LB inoculado fue puesto en agitación a 150 rpm a 37 °C durante 8 horas, para tomar muestras de 1 ml del cultivo cada 60 minutos y realizar diluciones seriadas en microtubos con agua destilada previamente esterilizada, y realizar conteo de UFC en placas de medio agar LB.

El protocolo se repitió bajo la mismas condiciones y parámetros con caldo y agar nutritivo.

4. Identificación molecular

La cepa aislada en medio agar Rodamina B fue preparada para su envío a LANGEBIO-CINVESTAV, Campus Guanajuato, México, para su identificación molecular. El servicio de extracción de DNA genómico continuo con amplificación de la región de interés por PCR, una secuenciación bidireccional del producto de PCR sin clonar mediante secuenciación de SANGER y un análisis de la secuencia para detección y clasificación de la especie de interés. El servicio bioinformático llevado a cabo consintió en un análisis que se limitaría a separar las condiciones y hacer una identificación a nivel de género y especie por medio del gen 16S.

5. Esporulación bacteriana.

Se prepararon lotes de caldo LB y caldo nutritivo esterilizados por autoclave, para ser inoculados con la cepa aislada y puestos en incubación a 37 °C con agitación de 150 rpm durante toda la noche. Posteriormente se ajustó el cultivo a 0.5 - 1 en la escala de McFarland para luego tomar un 1 ml de dicho cultivo e inocular caldo LB y nutritivo

estériles. Los matraces fueron puestos en incubación bajo las mismas condiciones previamente mencionadas durante un total de 48 horas. Se tomaron alícuotas de 1ml de cada medio a las 12, 24 y 48 horas de los cultivos, para llevar a cabo diluciones seriadas en agua destilada estéril y sembrar en cajas Petri con agar LB para el conteo de UFC.

5.1 Inducción de la esporulación.

Para este protocolo se emplearon 5 tratamientos diferentes y 2 controles, como se muestra en la tabla 1. Para cada tratamiento se inoculó el medio seleccionado y se mantuvo a 37 °C con agitación de 150 rpm durante toda la noche. Posteriormente se ajustó el cultivo a 0.5 - 1 en la escala de Mcfarland para luego tomar un 1 ml de dicho cultivo e inocular caldo estéril. Fue puesto en incubación bajo las mismas condiciones previamente mencionadas durante un total de 48 horas. Se tomaron alícuotas de 1ml del medio a las 12, 24 y 48 horas de dicho cultivo, para llevar a cabo diluciones seriadas en agua destilada estéril y sembrar en cajas Petri con agar LB para el conteo de UFC.

De igual forma se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento de cada tratamiento en el equipo de espectrofotometría *Beckman Coulter* tomando lecturas con luz visible a una longitud de onda de 600 nm cada 60 minutos durante 24 horas, para comparar contra la cinética obtenida en caldo LB.

Tabla 1. Inductores y medios empleados para ensayo de esporulación.

Medio empleado	Tratamiento o inductor
Medio SM	Adición de sales específicas (listadas en subtema 5.1.1)
Medio mínimo FAM	Poca fuente de carbono / adición de sales específicas (listadas en subtema 5.1.2)
Medio LB	Decoyinina
Medio LB	Cafeína anhidra
Medio LB	Sobrenadante liofilizado
Medio LB (Control)	-
Caldo Nutritivo (Control)	-

5.1.1 Medio SM.

Se preparó este medio utilizando 8 g/L de caldo nutritivo, 0.25 g/L de $MgSO_4$, 1 g/L de KCl, en agua destilada. Una vez ajustado el pH a 7.2, se esterilizó en autoclave y se dejó enfriar para después adicionarlo con $FeSO_4$ 1mM, $MnCl_2$ 10mM y $Ca(NO_3)_2$ 1M esterilizadas por filtración.

5.1.2 Medio mínimo FAM.

Se preparó este medio mínimo empleando las sales $NaNO_3$ 10 mM, KH_2PO_4 4 mM, Na_2HPO_4 16 mM, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,4mM, $CaCl_2$ 60 mM y $(NH_4)_2SO_4$ 9,8 mM, sin agar, suplementado con aceite de oliva 1% v/v como única fuente de carbono. Como componente adicional, se agregaron 250 μ l de Tween 80 para facilitar la emulsión lipídica llevada a cabo por ultra agitación durante 15 minutos.

5.1.3 Inducción por metilxantinas (cafeína).

Se inocularon tubos conteniendo 20 ml de caldo LB estéril con la cepa de interés y se dejaron en incubación con una temperatura de 37° C, agitación de 150 rpm durante 4 horas. Una vez cumplido este periodo, se adicionaron 200 μ g/ml de la metilxantina seleccionada, cafeína anhidra marca ABREIKO.

5.1.4 Inducción por decoyinina.

Se utilizaron micro tubos con medio LB estéril para cultivar la cepa asilada a 37° C con agitación de 150 rpm durante 4 horas. Posteriormente se adicionaron 100 μ l de solución con decoyinina por cada 1000 μ l de cultivo.

5.1.5 Inducción por sobrenadante liofilizado.

Se llevó a cabo un proceso de centrifugación al sobrenadante de un cultivo de la cepa de interés de 72 horas en caldo LB, a 4000 rpm durante 20 minutos a 4° C. El sobrenadante

fue recuperado y filtrado en membranas de 0.45 μm , para luego ser liofilizado en equipo marca LABCONCO.

Luego de preparar nuevos tubos conteniendo 20 ml de caldo LB inoculado e incubado bajo las condiciones ya mencionadas durante 4 horas, se procedió a re suspender el liofilizado en agua destilada estéril y adicionar 50 μl por cada 5 ml de caldo de cultivo.

5.2 Eficiencia de la esporulación.

Para el conteo de esporas, se tomaron alícuotas de 1 ml de cada medio a las 12, 24 y 48 horas de cultivo, y se calentaron a 80 °C durante 15 a 20 minutos para eliminar células vegetativas, de manera que solo las esporas termorresistentes que pudieran estar presentes, puedan germinar en agar LB luego de las diluciones seriadas, basándose en lo realizado por Tu et al. (2020) y se compararon los resultado obtenidos entre los diferentes medios utilizados. De igual forma, se llevaron a cabo tinciones de Schaeffer–Fulton para detección de esporas.

6. Efecto de la esporulación inducida.

Se prepararon 3 cultivos de *Bacillus velezensis* en Caldo LB estéril, y se incubaron durante 24 horas a 35° C a 150 rpm. Pasado el periodo de incubación, dos de los cultivos fueron adicionados con inductores de la esporulación, decoyina y liofilizado libre de células, empleando la misma dosis y concentraciones de los protocolos de esporulación anteriores, para luego ser incubados de nuevo durante 24 horas. El tercer cultivo se mantuvo libre de inductores y su periodo de incubación fue de 48 horas para generar esporas de forma natural. Luego de esto, se tomaron alícuotas de 1 ml de los 3 cultivos y fueron sometidos a una temperatura de 80° C durante 20 min para eliminar células vegetativas. Las esporas recuperadas de cada tratamiento fueron inoculadas en medio base adicionado de emulsión lipídica sin Rodamina B, durante 24 horas a 35° C a 150 rpm. Al término de la incubación, las 3 muestras fueron centrifugadas a 4000 rpm durante 20 min a 4°C. El sobrenadante recuperado fue filtrado por membrana de 0.22 micras.

6.1 Curva estándar nitrofenol

Se colocaron 0.05 a 0.5 ml de una solución de p-nitrofenol al 0.5 mM en tubos de ensayo para diluir a 5 mL con Tris HCl al 0.1, pH 8.2. Se construyó una curva estándar midiendo la absorbancia a 410 nm utilizando como blanco Tris HCl (Ortiz et al., 2016)

Para calcular $\mu\text{mol p-nitrophenol/ml}$ se utiliza la formula:

$$(A410 - \text{intersección en } y) / (\text{pendiente} \times 3.5 \text{ ml mezcla de reacción})$$

6.2 Ensayo para cuantificación de actividad lipolítica

Basado en el protocolo empleado por Ortiz, E., (2016) se tomaron 500 mL del sobrenadante previamente obtenido, los cuales fueron mezclados con una solución de 1.25 mL de Tris HCl 0.1 M y 1.25 mL de p-nitrofenil palmitato 420 μM . Se utilizó agua como blanco; como control positivo una cepa de *Bacillus velezensis* sin tratamientos de esporulación y medio estéril como control negativo. Posteriormente se hicieron lecturas de cada muestra a 410 nm cada minuto por 15 minutos. Se utilizó la curva estándar de p-nitrofenol para convertir las absorbancias a mM de sustrato hidrolizado: $\mu\text{mol p-nitrophenol/ml}$ de mezcla de reacción = $(A410 - \text{intersección en } y) / (\text{pendiente} \times 3 \text{ ml mezcla de reacción})$.

Las Unidades Internacionales por Litro se determinaron utilizando la fórmula mostrada en la Figura 2, modificando el delta Abs/min por la última absorbancia registrada:

$$AL(\text{IU/L}) = \frac{\Delta\text{Abs}/\text{min} * VT * 1000}{17.91 * LP * VM}$$

Figura 2. $\Delta\text{abs}/\text{min}$ = cambio en la absorbancia por minuto. VT= volumen total de reacción en mL. 1000= factor de conversión para Litros. 17.91= coeficiente de extinción de p-nitrofenol. VM= volumen de muestra. (Ortiz, E., 2016)

7. Análisis estadístico.

Se realizaron análisis de varianza empleando ANOVA de dos o más factores para comparar las medias obtenidas de los diferentes tratamientos junto con los controles, empleando el programa SPSS para ello.

RESULTADOS

1. Caracterización microbiológica.

Los resultados obtenidos del aislamiento inicial permitieron identificar colonias redondas de color blanco o crema, con bordes irregulares y amplio crecimiento sobre agar nutritivo, mientras que la tinción de Gram realizada permitió determinar la presencia de bacilos Gram positivos, como se observa en la Figura 3.

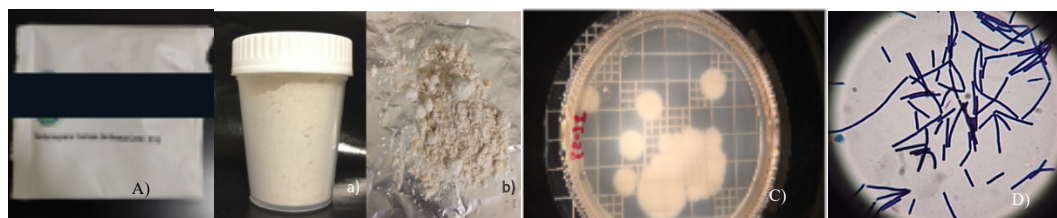


Figura 3. A y B) Producto comercial de consorcio bacteriano, presentación de empaque y polvo; C) morfología macroscópica de cepas aisladas; D) morfología microscópica, bacilos Gram(+).

De igual forma, se observó la presencia de endosporas bacterianas luego de llevar a cabo la tinción con verde malaquita, como se aprecia en la Figura 4.

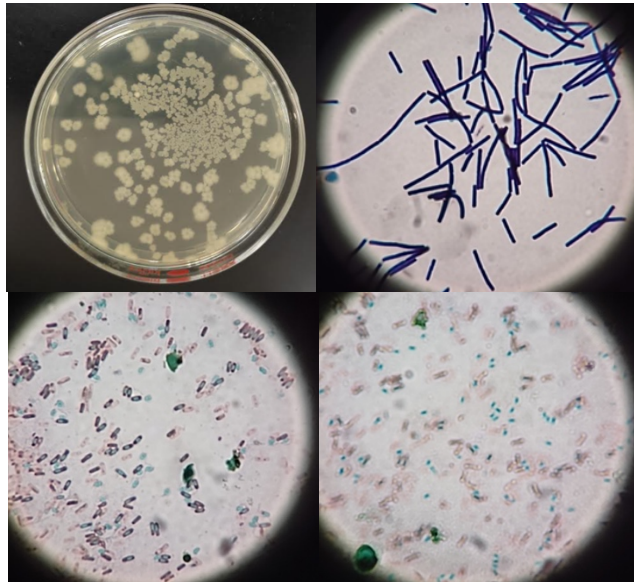


Figura 4. Presencia de endosporas bacterianas teñidas de color verde, luego de llevar a cabo la tinción de Schaeffer–Fulton con verde malaquita.

1.1 Actividad lipolítica.

El estriado simple realizado en cajas con agar Rodamina B demostraron crecimiento de algunas cepas con actividad lipolítica. Luego de cultivarlas en medio Agar Rodamina B al 0.02% p/v, se seleccionaron 3 con la mayor fluorescencia al ser observadas bajo luz UV a 350 nm, como se observa en la Figura 5. Estas tres cepas fueron utilizadas para el análisis semi-cuantitativo de la actividad de lipasas libre de células.

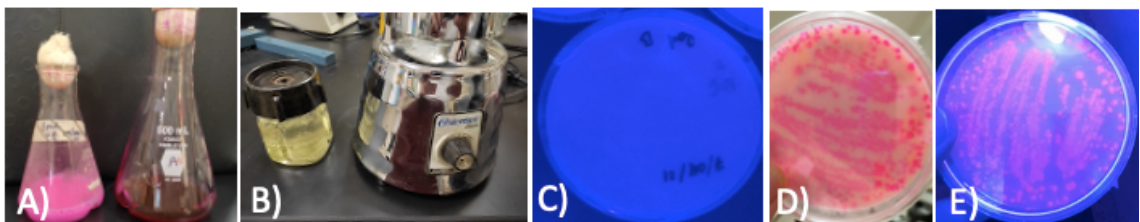


Figura 5. **A)** Medio agar Rodamina B al 0.02% p/v; **B)** Emulsión lipídica luego de agitación; **C)** Crecimiento de cepas sin actividad lipolítica; **D)** Crecimiento de cepas con actividad lipolítica; **E)** Fluorescencia de cepas con actividad lipolítica.

Los resultados obtenidos de la actividad de lipasas libre de células indicaron que, de las 3 cepas empleadas para el protocolo, el mayor diámetro obtenido de los halos de hidrolisis fue en promedio de 4 cm, tal y como se muestra en la Figura 6. Coincidentemente, dicha cepa fue la que presentó mayor fluorescencia en los ensayos con Rodamina B.

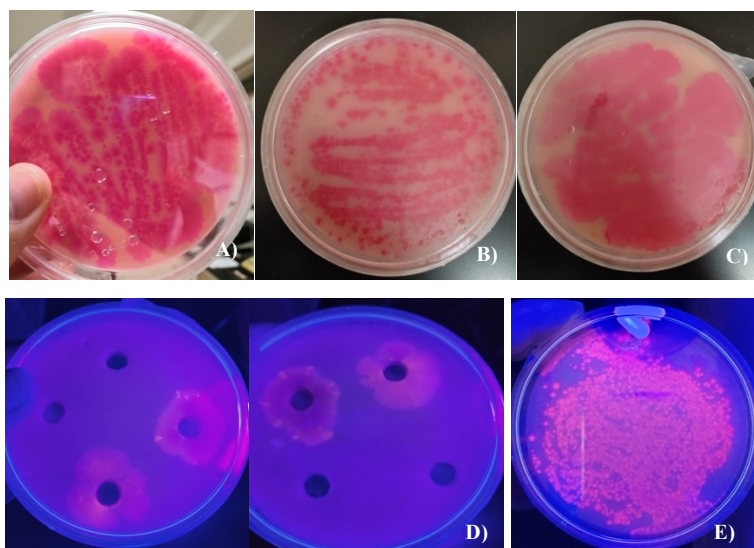


Figura 6. A, B y C) Cepas empleadas en el protocolo de actividad de lipasas libres de células; D) Halos de hidrolisis obtenidos durante el ensayo de lipasas; E) Cepa con mayor fluorescencia bajo luz UV 350 nm.

1.2 Cinética de crecimiento.

Los resultados obtenidos en la cinética de crecimiento de la cepa de *Bacillus sp.* seleccionada, cultivada en caldo LB y caldo nutritivo permitieron determinar un tiempo de duplicación de 1.7 horas en promedio. Las curvas de crecimiento graficadas se observan en la Figura 7.

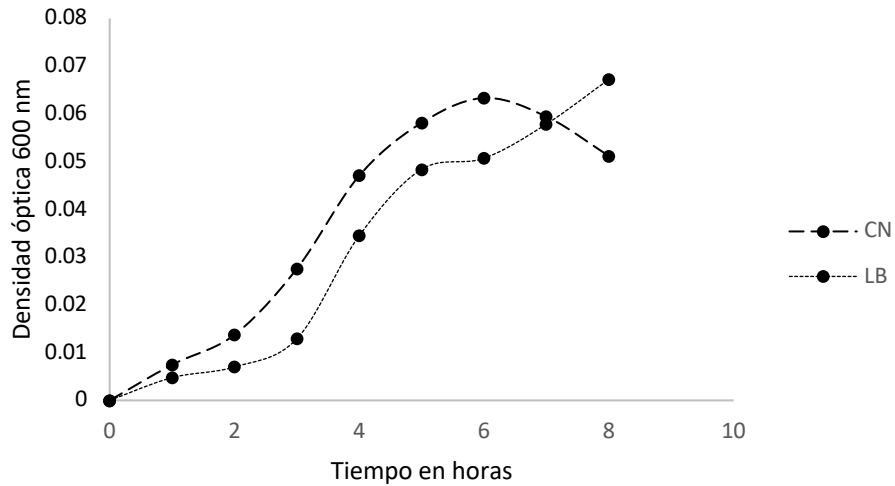


Figura 7. Cinética de crecimiento de la cepa de *Bacillus sp.* seleccionada y cultivada en caldo LB y caldo nutritivo.

2. Identificación molecular.

Se determinó que el microorganismo aislado del consorcio comercial y seleccionado por su actividad lipolítica es *Bacillus velezensis*, con un porcentaje de identidad del 99.73%.

3. Inducción de la esporulación.

Los resultados obtenidos durante los diferentes muestreos de los 5 tratamientos, demuestran que solo es posible acelerar la esporulación con decoyinina y sobrenadante liofilizado, ya que se observó la presencia de colonias en placas a partir de las 8 horas de haber agregado el inductor, es decir, 12 de cultivo en general. Los valores obtenidos de UFC/ml, así como UFC a partir de esporas / ml de todos los tratamientos se agrupan en la Tabla 2.

Tabla 2. Resultados obtenidos del conteo de UFC/ml con y sin tratamiento térmico.

Tratamiento	UFC/ml			UFC de esporas / ml		
	Hora			Hora		
	12	24	48	12	24	48
LB (control)	2.69E+08 _A	3.00E+08 _A	2.43E+08 _A	0 _A	0 _A	3.10E+07 _A
CN (control)	2.41E+08 _A	3.00E+08 _A	2.93E+08 _A	0 _A	0 _A	1.20E+07 _A
Medio SM	3.00E+08 _A	2.11E+08 _A	2.58E+08 _A	0 _A	0 _A	2.60E+07 _A
Medio min FAM	2.03E+08 _A	1.67E+06 _B	2.20E+07 _B	0 _A	0 _A	0 _B
Medio LB con cafeína	2.08E+08 _A	1.50E+08 _A	2.23E+08 _A	0 _A	0 _A	0 _B
Medio LB con decoyinina	2.27E+08 _A	3.00E+08 _A	3.00E+08 _A	2.67E+06 _B	3.00E+08 _B	3.90E+07 _A
Medio LB con liofilizado	3.00E+08 _A	3.00E+08 _A	3.00E+08 _A	6.67E+05 _C	3.00E+08 _B	1.09E+08 _A

Tabla 3. Porcentaje de esporulación obtenido en cada tratamiento.

Tratamiento	Porcentaje de esporulación		
	Hora		
	12	24	48
LB (control)	00.00 _A	00.00 _A	12.76 _A
CN (control)	00.00 _A	00.00 _A	4.1 _B
Medio SM	00.00 _A	00.00 _A	10.1 _C
Medio min FAM	00.00 _A	00.00 _A	00.00 _D
Medio LB con cafeína	00.00 _A	00.00 _A	00.00 _D
Medio LB con decoyinina	1.18 _B	100 _B	13 _A
Medio LB con liofilizado	0.22 _C	100 _B	36.33 _E

3.1 Medio SM.

Los resultados obtenidos del conteo en placa de UFC/mL del medio SM se observan en la Figura 8.

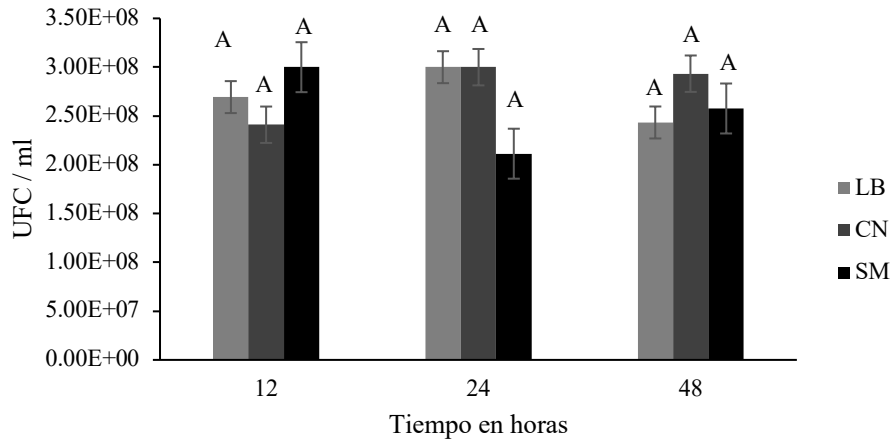


Figura 8. UFC/mL de medios SM, LB y CN sin tratamiento térmico a 12, 24 y 48 horas de cultivo.

Los resultados de la cinética de crecimiento del medio SM, junto con su comparación contra caldo LB, se observan en la figura 9.

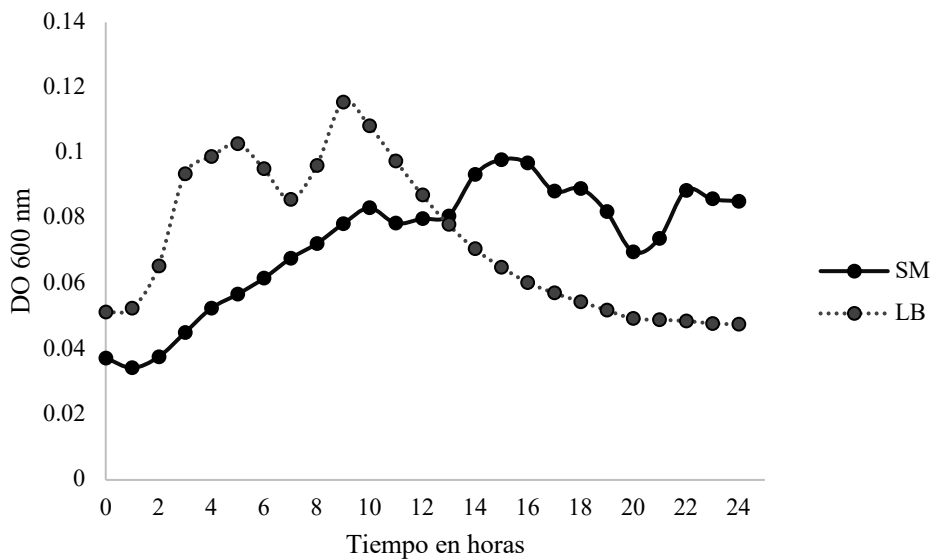


Figura 9. Cinética de crecimiento obtenida del medio SM comparada contra medio LB.

3.2 Medio mínimo FAM.

Los resultados obtenidos del conteo en placa de UFC/mL del medio mino FAM se observan en la Figura 10. No se obtuvieron esporas a las 3 diferentes horas de muestreo empleando este tratamiento. De igual forma, no fue posible realizar una cinética de crecimiento debido a turbidez del medio ocasionada por la emulsión lipídica, la cual impedía tomar lecturas con luz visible en el espectrofotómetro.

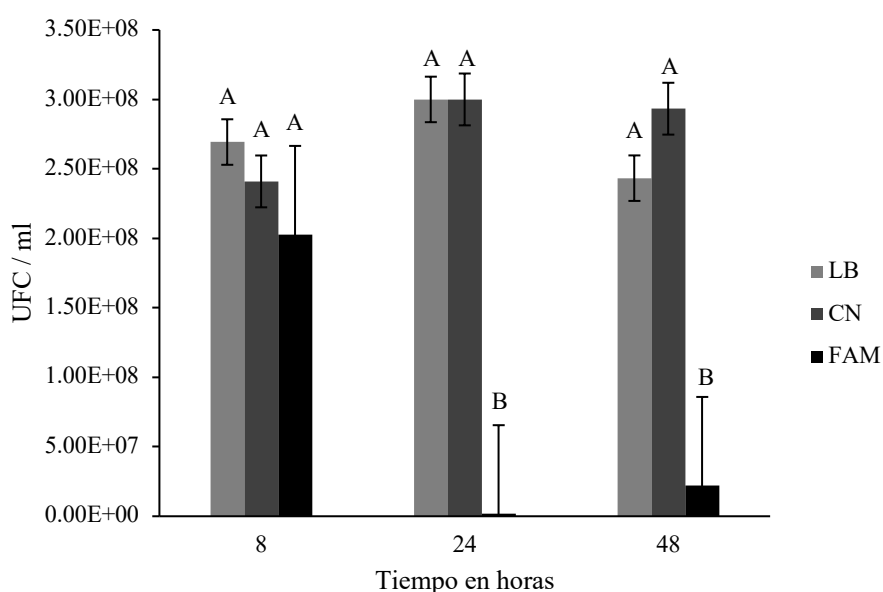


Figura 10. UFC/mL de los medios FAM, LB y CN sin tratamiento térmico, a 12, 24 y 48 horas de cultivo.

3.3 Metilxantina (cafeína).

Los resultados obtenidos del conteo en placa de UFC/mL del medio LB con cafeína anhidra, así como el comportamiento observado en la cinética de crecimiento, se observan en la Figura 11 y 12 respectivamente. No se obtuvieron esporas a las 3 diferentes horas de muestreo empleando este tratamiento.

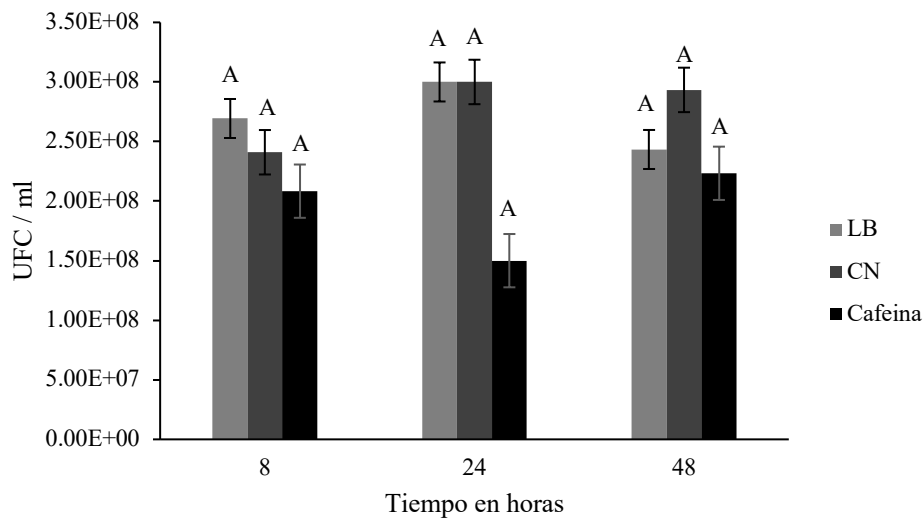


Figura 11. UFC/mL de los medios LB con cafeína, LB y CN sin tratamiento térmico, a 12, 24 y 48 horas de cultivo.

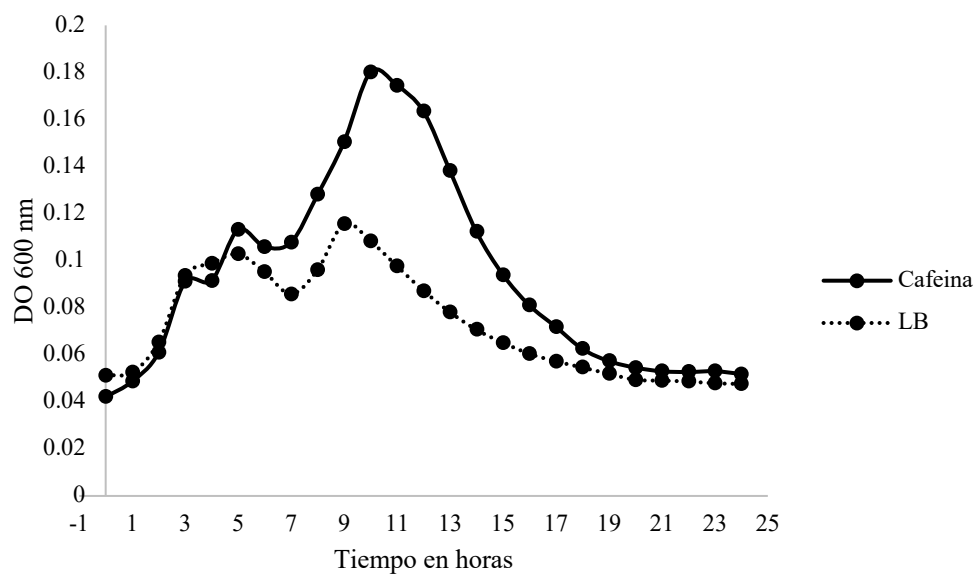


Figura 12. Cinética de crecimiento obtenida del medio LB con cafeína comparada contra medio LB.

3.4 Decoyinina.

Los resultados obtenidos del conteo en placa de UFC/mL del medio LB con decoyinina, se observan en la Figura 13.

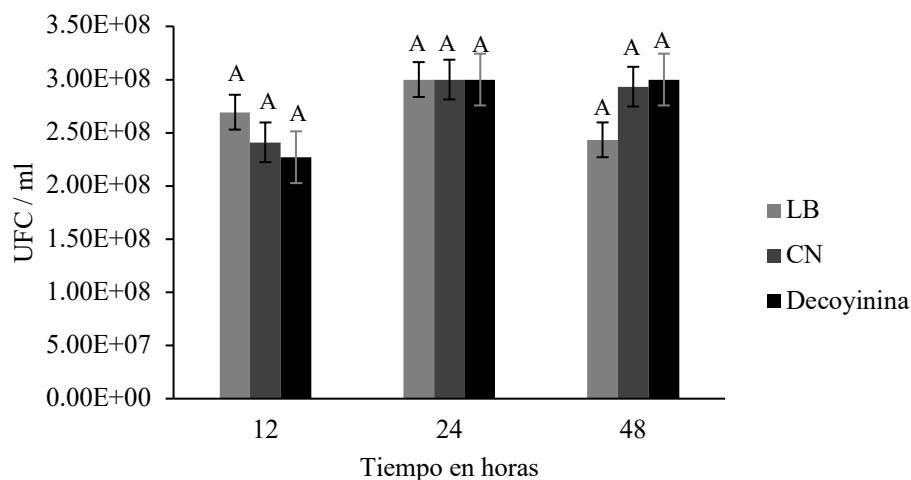


Figura 13. UFC/mL de los medios LB con decoyinina, LB y CN sin tratamiento térmico, a 12, 24 y 48 horas de cultivo

Los resultados de la cinética de crecimiento del medio LB con decoyinina, junto con su comparación contra caldo LB control, se observan en la figura 14.

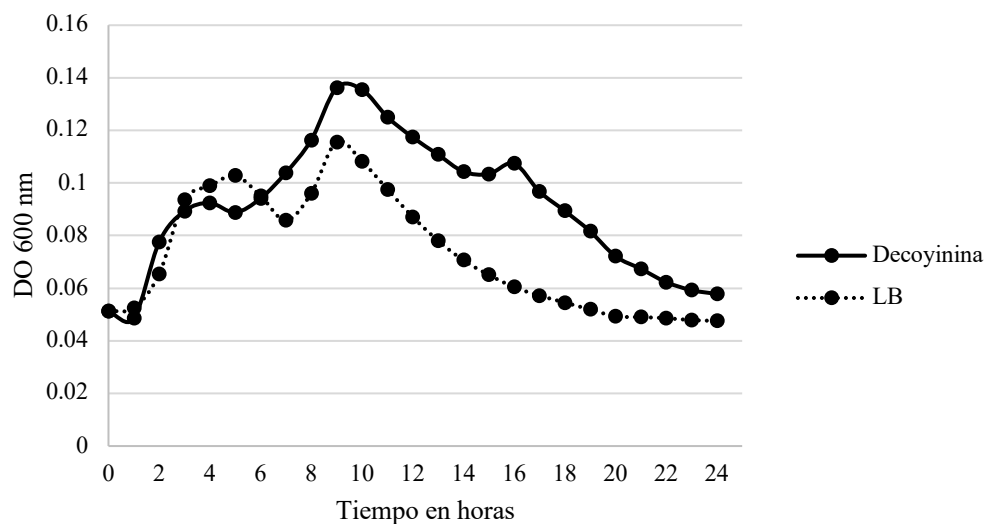


Figura 14. Cinética de crecimiento obtenida del medio LB con decoyinina comparada contra medio LB.

3.5 Sobrenadante liofilizado.

Los resultados obtenidos del conteo en placa de UFC/mL del medio LB con liofilizado re suspendido en agua se observan en la Figura 15.

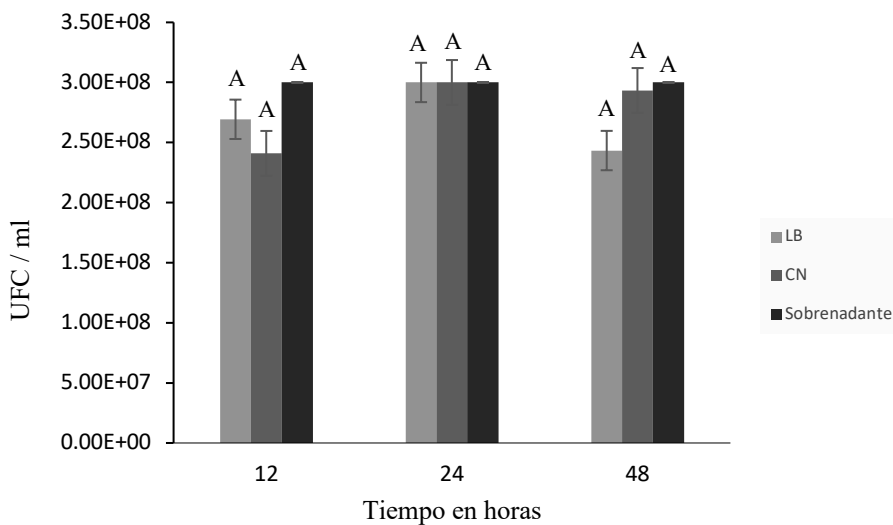


Figura 15. UFC/mL de los medios LB con sobrenadante liofilizado, LB y CN sin tratamiento térmico, a 12, 24 y 48 horas de cultivo.

Los resultados de la cinética de crecimiento del medio LB con decoyina, junto con su comparación contra caldo LB control, se observan en la figura 16.

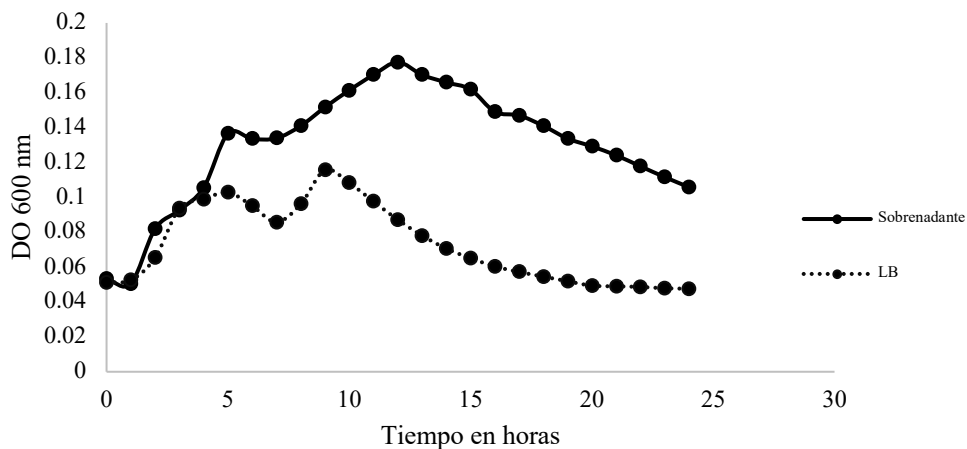


Figura 16. Cinética de crecimiento obtenida del medio LB con sobrenadante liofilizado comparada contra medio LB.

3.6 Comparación de la esporulación.

Los resultados obtenidos demuestran que existe una diferencia significativa entre las UFC a partir de esporas / ml entre tratamiento con decoyinina y el tratamiento con sobrenadante liofilizado a las 12 horas de cultivo, tal y como se observa en la Figura 17. Por otra parte, se puede observar en la Figura 18 que no existe diferencia significativa entre las UFC a partir de esporas / ml entre tratamiento del tratamiento con sobrenadante liofilizado y decoyinina a las 24 horas de cultivo.

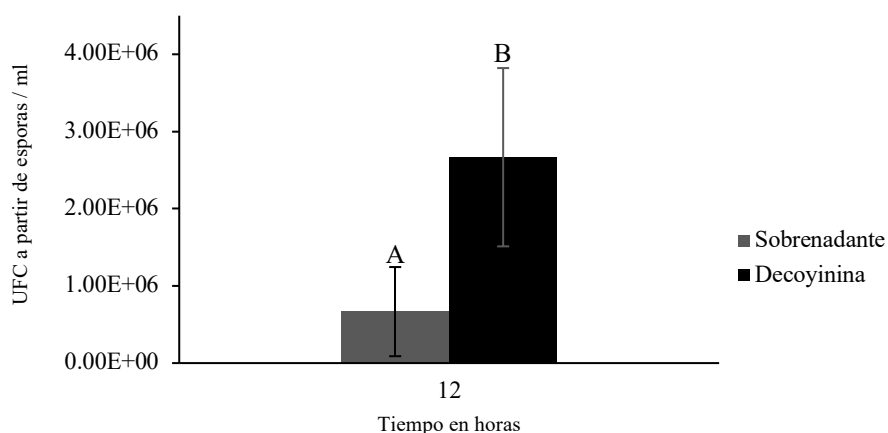


Figura 17. Comparación de los resultados obtenidos de la esporulación inducida obtenidos a las 12 horas de cultivo.

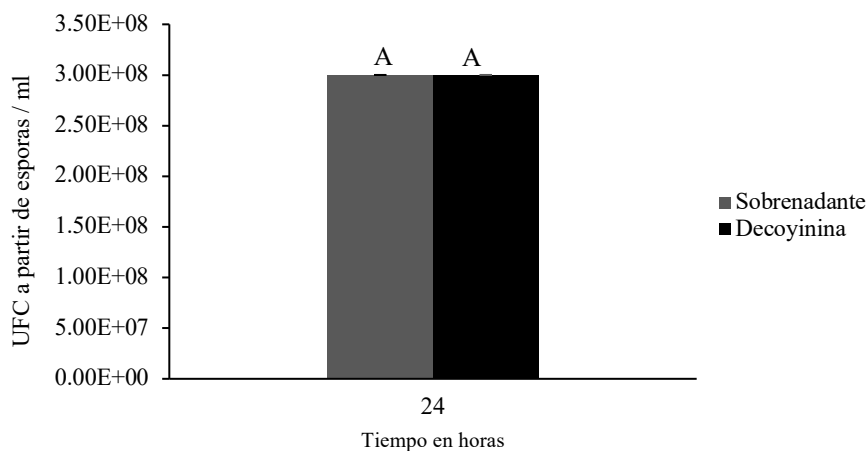


Figura 18. Comparación de los resultados obtenidos de la esporulación inducida obtenidos a las 24 horas de cultivo.

Los resultados obtenidos del conteo de UFC a partir de esporas a las 48 horas, demuestran que no existe diferencia significativa entre los tratamientos con decoyinina, sobrenadante liofilizado, medio SM y los controles caldo LB y caldo nutritivo, como se observa en la Figura 19.

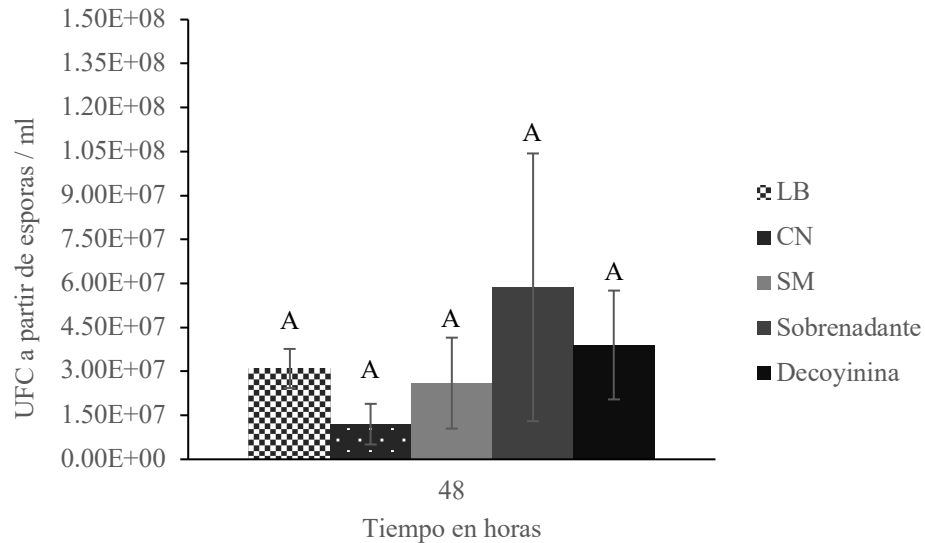


Figura 19. Comparación de los resultados obtenidos de la esporulación inducida obtenidos a las 48 horas de cultivo.

4. Efecto de esporulación inducida.

La curva estándar obtenida se observa en la Figura 20. De igual forma, se obtuvieron curvas para las muestras tratadas con los inductores decoyinina (Figura 21) y sobrenadante liofilizado (Figura 22), junto con la muestra control sin inductores de esporulación (Figura 23). Los resultados obtenidos de la actividad enzimática de las lipasas expresado en IU/L se muestra en la Tabla 4.

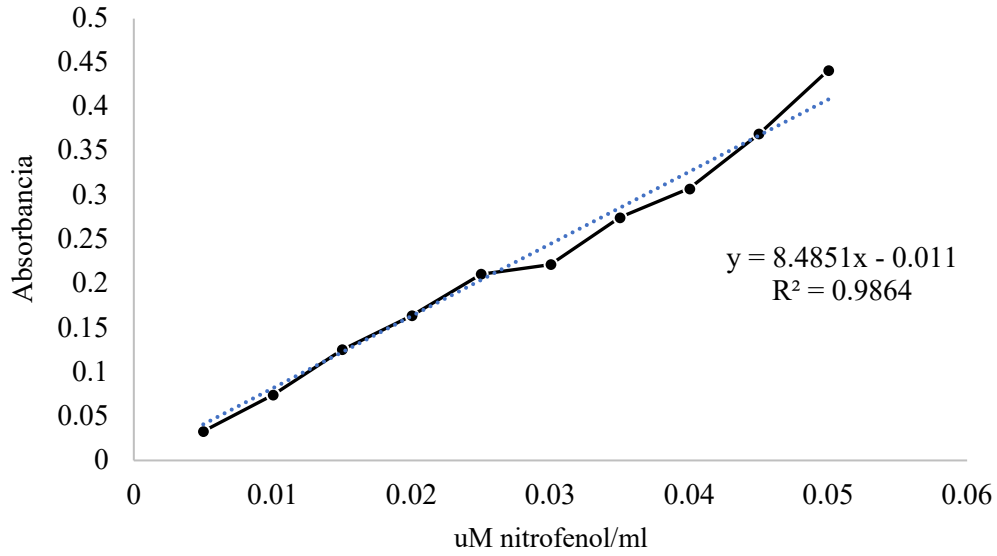


Figura 20. Curva estándar de p-nitrofenol.

Tabla 4. Actividad enzimática de las lipasas expresada en IU/L.

Muestra	$AL(IU/L) = \frac{\text{ultima abs} * VT * 1000}{17.91 * LP * VM}$	Comparación entre Tratamientos
Inducción de esporulación con Decoyinina	14.23 _A	Sobrenadante Liofilizado
		Sin inducción
Inducción de esporulación con Sobrenadante liofilizado	6.06 _B	Decoyinina
		Sin inducción
Sin inducción de la esporulación	23.1 _C	Decoyinina
		Sobrenadante liofilizado

DISCUSIÓN

Con base en las características macro y microscópicas mencionadas, se infirió que se trabajaba con un microorganismo del género *Bacillus*, sumado a esto, el rango de temperatura de incubación utilizado para determinar si presentaban actividad lipolítica es muy cercana a la temperatura óptima reportada para las lipasas de organismos como *Bacillus subtilis* de 35 °C (Morcelle & Valle, 2012).

De acuerdo con Calvo & Zúñiga (2010), una de las características más comunes en muchas de las colonias formadas por cepas del género *Bacillus*, es su forma irregular y color crema, con bordes irregulares que pueden ser de forma aserrada, lobulada, digitiforme y ondulada. De igual forma, está reportado que las colonias presentan la característica de formar un anillo concéntrico y borde irregular en el centro. Esto concuerda con los resultados observados durante el aislamiento de la cepa de interés. Cabe destacar que, aunque la tinción de Gram indicó consistentemente que se trataba de un microorganismo Gram (+), la coloración final de la bacteria luego de realizar tinciones podía variar dependiendo del tiempo de incubación de la misma. Este tipo de cambio en la tinción de un microorganismo fue descrito por Beveridge, (1990), quien determinó que algunos microorganismos comenzaban como Gram positivos durante la fase lag y exponencial de su crecimiento, pero conforme aumentaba la duplicación se presentaba un desgaste y reducción en la capa de peptidoglicano, por lo que comenzaban a presentarse más bacterias Gram (-) y las denominó Gram variables. Sin embargo, el autor también resalta el hecho de que no todas las bacterias de género *Bacillus* presentan esta variabilidad, por lo que un estudio más detallado sobre este tema y la cepa empleada en este proyecto es necesario.

Los resultados arrojados por la identificación molecular confirmaron que se trataba de un microorganismo del género *Bacillus*, e indicaron que se trataba de una cepa de *Bacillus velezensis*, la cual fue descrita originalmente en el 2005 determinando que es un “sinónimo heterotípico posterior” de *Bacillus amyloliquefaciens* (Wang et al., 2008) y rápidamente fue seleccionada como un excelente candidato para aplicaciones biotecnológicas y de

biocontrol gracias a su capacidad biopesticida, ya que es capaz de producir metabolitos secundarios tales como los lipopéptidos cíclicos surfactina [Leu7] C14 y [Leu7] surfactina C15, los cuales presentan una buena actividad contra fitopatógenos (Grady et al., 2019).

Su interés biotecnológico también puede extenderse a la producción de lipasas, ya que de acuerdo con Ortiz et al., (2016), dentro de los microorganismos Gram positivos, uno de los géneros de mayor importancia en la producción de estas enzimas es *Bacillus*, con diversas especies reportadas como fuertes productoras de dicha enzima, entre las cuales destacan *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus stearothermophilus* y *Bacillus alcalophilus*. Por otra parte, algunos reportes indican que cepas de *B. velezensis* S3-1 son buenas productoras de proteasas y otras enzimas importantes para fines agrícolas como la ACC desaminasa, también encontraron que no son capaces de producir lipasas, quitinasas y celulasas (Lu et al., 2020). Sin embargo, gracias al aislamiento y caracterización realizado en este trabajo, se demostró que *Bacillus velezensis* es también una buena opción para la producción de lipasas.

El uso del medio mínimo FAM suplementado con aceite de oliva como única fuente de carbono permitió observar la actividad lipolítica extracelular de la cepa de *Bacillus velezensis*. Los halos de hidrólisis formados alrededor de los pozos presentaron la fluorescencia característica de los medios con Rodamina B, ya que esta reportado que al hidrolizar los enlaces éster carboxil de las moléculas de triacilglicerol del aceite, se recuperan ácidos grasos y glicerol. Los ácidos grasos se unen a la Rodamina B y producen la coloración anaranjada o rosa intenso con fluorescencia al examinarse bajo luz UV (Pedroza et al., 2017).

Se optó por emplear este medio FAM con Rodamina B, y no otros medios como el agar tributirina, debido a que se buscaba ver la actividad de lipasas “verdaderas” o también llamadas “auténticas”, las cuales a diferencia de otras enzimas como las carboxilesterasas, las cutinasas, las fosfolipasas y las lipoproteínas lipasas, actúan sobre sustratos específicos de acilgliceroles y otros esteres con ácidos grasos de cadena de 10 o más átomos de carbono, como el aceite de oliva, mientras que el resto de las enzimas mencionadas actúa

sobre sustratos de cadena corta menores de 10 átomos de carbono, como la tributaria (Ruiz & Dias, 2005).

De acuerdo a lo reportado, las bacterias del género *Bacillus* presentan un buen crecimiento en medio Luria-Bertani, sin embargo, para la producción de esporas se recomienda emplear medios específicos y diseñados para obtener una alta densidad celular y un alto porcentaje de conversión de esporas a partir de células vegetativas, como es el medio SM, el cual puede presentar un rendimiento superior a medios químicamente definidos (Monteiro et al., 2014). A pesar de la información reportada, los resultados obtenidos demostraron que no existe diferencia significativa entre el índice de UFC/mL a partir de esporas al cultivar la cepa de *Bacillus velezensis* en caldo LB, caldo nutritivo y medio SM.

La adición de sales para inducir la esporulación no es un tema nuevo, ya que desde hace décadas se ha reportado el efecto directo de componentes como el manganeso capaz de inducir la esporulación en *Bacillus megaterium* (Weinberg, 1964) y que en su ausencia *Bacillus subtilis* no era capaz de esporular (Vasanth & Freese, 1979), así como el efecto de medios de esporulación con elevadas concentraciones de fosfato, magnesio, calcio y manganeso sobre la termo resistencia de las esporas. De igual forma, se comprobó que la presencia de calcio y manganeso en el medio incrementaban la resistencia de las esporas a las altas temperaturas, altas concentraciones de fosfato la disminuían, y el manganeso no tenía ningún efecto (El-Bisi & Ordal, 1956).

Sin embargo, en publicaciones más recientes, Sinnelä et al., (2019) encontraron que al emplear diferentes medios de esporulación, obtenían los resultados más bajos en cepas de *B. subtilis* y *B. coagulans* cuando las concentraciones de calcio y magnesio eran más elevadas, caso contrario a las cepas de *B. licheniformis* y *B. cereus*, por lo que concluyen que el efecto de la adición de sales en el medio dependerá de las diferentes cepas de *Bacillus* empleadas, ya que su porcentaje más alto de esporulación fue en medio sin adición de sales.

Incluso si la presencia de concentraciones elevadas de calcio y magnesio favorecieran a *Bacillus velezensis*, la esporulación vería su mayor rendimiento a las 48 horas, tal y como se observó en nuestros resultados, lo cual se asemeja con los reportados por Monteiro et

al., (2014). La inhibición de la esporulación en el medio mínimo FAM puede deberse a factores similares, ya que se encontraba altamente suplementado por sales.

En el caso de la cafeína la inhibición se debe a factores distintos. Aunque Sacks & Thompson, (1977) reportaron que las metilxantinas inducen un alto rendimiento de esporas en *Clostridium perfringens* utilizando un rango de 100 to 1,000 ug/ml de cafeína, no se observó el mismo efecto en *Bacillus velezensis*.

De acuerdo con Al-Janabi, (2011) los compuestos de purina son tipos especiales de alcaloides, de entre los cuales la cafeína se considera uno de los miembros más importantes, Estos compuestos de purina demostraron tener efectos antibacterianos en las cepas de *Bacillus subtilis*, además de efectos negativos sobre la tasa de esporulación y el desarrollo morfológico de las células bacterianas. Heinze et al., (1978) reportaron que, aunque algunos otros inhibidores parciales del crecimiento bacteriano como el metotrexato pueden inducir la esporulación, solo lo hacen en ausencia de purinas y no cuando estas últimas están presentes. También reportan que los inhibidores de la síntesis de ADN, ARN, proteínas, entre otros, no pueden inducir la esporulación a ninguna concentración. Aun y cuando algunas metilxantinas como la teofilina lograron inducir la esporulación, solo tuvieron un efecto débil, por lo que el uso de cafeína como inductor de tipo metilxantina no es un tratamiento adecuado para acelerar la esporulación.

Como se mencionó anteriormente, se ha comprobado que cepas como *Bacillus subtilis* al ser expuestas a decoyina, desencadenan un estricto control de la transcripción mediante la inhibición de GMP sintasa, es decir, una inanición de aminoácidos. Sin embargo, en estudios más recientes empleando microarreglos, se ha demostrado que la decoyina también da lugar a la esporulación al inducir directamente la expresión de los genes de kinA y kinB, involucrados en la fosforilación de Sp0A que, como se mencionó anteriormente, conduce a la formación de esporas (Tojo et al., 2013).

En el caso del sobrenadante liofilizado, la esporulación se ve favorecida por un factor de esporulación presente en el tratamiento. Los primeros reportes publicados por Grossmann et al (1988) indicaron que en *B. subtilis* existía un control para la formación de esporas

mediado por un factor extracelular que era requerido para el control del proceso. Desde entonces se ha establecido que este factor puede ser detectado por el sistema codificado por el gene *spoOK* (Rudner et al., 1991). Este tipo de factores extracelulares que pueden ser detectado por células bacterianas cercanas se conocen moléculas del quorum-sensing (QSMs), las cuales ayudan a las bacterias a adaptarse y sobrevivir en su ambiente. Algunos ejemplos incluyen al pentapeptido ERGMT, también conocido como factor de esporulencia y competencia (CSF), el cual se ha visto induce algunos mecanismos de resistencia, como la síntesis de proteínas Hsps de choque térmico (Okamoto et al., 2012). Sin embargo, las 3 actividades principales de CSF son dependientes de su concentración e incluyen estimular la expresión de genes activados por el factor de transcripción ComA, cuando CSF está en bajas concentraciones, y la inhibición de la expresión de esos mismos genes junto con estimular la esporulación, cuando se encuentra en altas concentraciones. De acuerdo con Perchat et al., (2016), también se ha determinado que los factores NprR-NprX actúan como un sistema de regulación o sistema de quorum-sensing en bacilos Gram (+), en donde NprX es el péptido señal necesario para dar inicio a la esporulación, ya que en su ausencia NprR inhibe la expresión de genes regulados por Spo0A al impedir la fosforilación de Spo0F.

Como se mencionó anteriormente, la cepa aislada de *Bacillus velezensis* presentó la mayor actividad lipolítica en las pruebas semi-cuantitativas realizadas durante el protocolo. Para identificar si existe alguna diferencia entre dicha actividad enzimática después de inducir y acelerar la esporulación, se realizó un ensayo de actividad enzimática de las lipasas, ya que esta misma es la principal actividad de interés de la cepa comercial y es necesario corroborar que no se ve afectada por los tratamientos. Esto debido a los reportes por parte de Tu et al., (2020), los cuales encontraron que al sobre expresar el gen *kinA* para inducir una esporulación temprana, se alteraba el proteoma de la bacteria, ocasionando efectos como un incremento en la resistencia térmica, mayor grosor del córtex y un retraso en la germinación de la espora.

Aunque los valores obtenidos en IU/L mostrados en la Tabla 4 presentaron diferencia significativa entre tratamientos, y la actividad enzimática se haya visto muy disminuida

en comparación con el cultivo sin inductor de la esporulación, no representa un efecto negativo para la cepa comercial ni para el uso de los protocolos mencionados para obtener esporas en menor tiempo. De acuerdo con Massadeh & Sabra, (2011), la producción de lipasas de diferentes cepas de *Bacillus* puede verse afectada por la presencia de aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de soya, Tween 80 en diferentes concentraciones, glicerol y glucosa, así como el pH del medio de cultivo y la fase de crecimiento de las bacterias. De igual forma, Ortiz, E., (2016) encontró que la actividad enzimática de las lipasas bacterianas se ve afectada por el pH del medio, al comparar las UI/L de lipasas de 3 diferentes cepas cultivadas en pH de 7, 8 y 9 cada una. Sin embargo, el incremento o disminución de la actividad enzimática en base al pH, dependerá de la cepa bacteriana. Igualmente, la actividad de las lipasas dependerá de la fase de crecimiento o periodo de incubación de las bacterias. Se ha demostrado que las esporas provenientes de organismos como *Bacillus subtilis* presentan una proteína muy involucrada en su proceso de germinación llamada YcsK, la cual actúa como una lipasa hidrolizando fosfolípidos, por lo que se propuso llamarla LipC (Masayama et al., 2007). Luego de la germinación, se ha reportado que la actividad enzimática de las lipasas puede variar y alcanzar su punto máximo de actividad a las 24 horas en microorganismos como *Bacillus stearothermophilus*, cuando su índice máximo de crecimiento se encuentra a las 72 horas de cultivo (lo que indica que las lipasas son necesarias para las primeras etapas de crecimiento), mientras que en cepas como *B. megaterium* AKG-1 alcanzan la producción óptima de lipasas hasta después de las primeras 34 horas de cultivo con un punto máximo de crecimiento a las 27 horas (Massadeh & Sabra, 2011). De igual forma, Ortiz, E., (2016) encontró diferencia entre los periodos de incubación para alcanzar la actividad óptima de las lipasas de 3 diferentes cepas bacterianas, la primera de ellas alcanzando una actividad de 480 UI/L a las 120 horas, la segunda de 219 UI/L a las 48 horas, y la tercera 259 UI/L a las 96 horas de cultivo.

Aun y con los numerosos reportes de la capacidad del género *Bacillus* para producir lipasas, algunos estudios indican que diversas cepas de dicho género bacteriano no son buenas productoras de esta enzima o no son capaces de producirlas bajo las condiciones de cultivo específicas de su investigación, como en lo reportado por Mehta et al., (2019),

los cuales indicaron como negativa la presencia de lipasas en cultivos de diversas cepas de *Bacillus*, entre otras cepas esporulantes, las cuales ocasionan el deterioro de productos lácticos a diferentes temperaturas, como se puede observar en la Figura 24.

Es por esto que, a pesar de que la actividad enzimática de las lipasas se viera reducida por los diferentes tratamientos de esporulación temprana, el valor comercial de la cepa de interés no disminuye, ya que dicha actividad puede verse mejorada bajo las condiciones adecuadas de cultivo.

Spore-forming strain	Proteolytic activity	Lipolytic activity	Phospholipid-degrading activity
<i>Paenibacillus xylanolyticus</i> DBC	—	+	—
<i>Paenibacillus polymyxa</i> DBC1	+	—	—
<i>P. polymyxa</i> SD	+	+	+
<i>Bacillus pumilus</i> DBC1	+	—	+
<i>B. pumilus</i> DBC2	+	+	—
<i>B. pumilus</i> DBC3	—	—	—
<i>B. pumilus</i> DBC4	+	—	—
<i>Bacillus licheniformis</i> DBC1	+	+	+
<i>B. licheniformis</i> DBC2	+	+	—
<i>B. licheniformis</i> DBC3	+	—	—
<i>B. licheniformis</i> DBC4	+	—	+
<i>B. licheniformis</i> DBC5	+	—	+
<i>B. licheniformis</i> DBC6	+	—	—
<i>B. licheniformis</i> DBC7	+	—	+
<i>B. licheniformis</i> DBC8	+	—	+
<i>B. licheniformis</i> K1	+	—	+
<i>Bacillus mojavenensis</i> BC	+	—	—
<i>B. mojavenensis</i> DBC1	+	—	—
<i>Bacillus marisflavi</i> DBC	+	—	—
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DBC	+	—	—
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> DBC1	—	—	—
<i>Bacillus cereus</i> DBC	+	—	+
<i>Bacillus mycoides</i> DBC	—	—	+
<i>Bacillus coagulans</i> SD	+	—	—
<i>Bacillus subtilis</i> DBC	+	—	—

¹+ = positive result; — = negative result.

Figura 24. Pruebas de cepas formadoras de esporas para determinar sus actividades causantes de deterioro a la temperatura de fermentación del yogur de 42 °C; tomada y modificada de Mehta et al., (2019).

CONCLUSIÓN

La cepa aislada del consorcio comercial con mayor actividad lipolítica, fue identificada como *Bacillus velezensis*.

De los 5 tratamientos empleados para la inducir la esporulación, solo el uso de decoyinina y sobrenadante liofilizado permitieron obtener esporas resistentes a las 12 horas de cultivo.

Los medios SM diseñados para obtener alto rendimientos de esporas, no tuvieron diferencia significativa en el porcentaje de esporulación al compararse con cultivo en caldo LB y caldo nutritivo, y solo permiten obtener esporas a las 48 horas.

La cafeína y el medio mínimo FAM no permiten la producción de esporas incluso a las 48 horas de cultivo.

No existe diferencia significativa entre las medias obtenidas de UFC a partir de esporas / ml, con inducción por decoyinina y sobrenadante liofilizado a las 24 horas, por lo que podemos concluir que ambos tratamientos son efectivos, pero debido a su elevado costo no es posible recomendarlos para acelerar procesos de producción industrial.

Existe una diferencia significativa en la actividad enzimática de las lipasas después de inducir la esporulación por decoyinina y sobrenadante liofilizado al compararse con el cultivo sin inductor de esporulación, mostrando una reducción en los valores de IU/L. Sin embargo, esto no representa un riesgo para el producto comercial ya que la actividad de las lipasas puede verse mejorara dependiendo de diversos factores ambientales y tiempo de cultivo de la cepa.

BIBLIOGRAFÍA

- Beveridge, T. J. (1990). Mechanism of gram variability in select bacteria. *Journal of Bacteriology*, 172(3), 1609–1620. <https://doi.org/10.1128/jb.172.3.1609-1620.1990>
- Bioformula, S. R. (2015). *Microcat*® -sr. <https://www.moneratec.com/wp-content/uploads/2019/08/SR-Data-Sheet.pdf>
- Calvo, P., & Zúñiga, D. (2010). Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. Aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología Aplicada*, 9(1–2), 31. <https://doi.org/10.21704/rea.v9i1-2.393>
- Chastanet, A., Vitkup, D., Yuan, G.-C., Norman, T. M., Liu, J. S., & Losick, R. M. (2010). Broadly heterogeneous activation of the master regulator for sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(18), 8486–8491. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002499107>
- Claassens, S., Van Rensburg, L., Riedel, K. J., Bezuidenhout, J. J., & Van Rensburg, P. J. J. (2006). Evaluation of the efficiency of various commercial products for the bioremediation of hydrocarbon contaminated soil. *Environmentalist*, 26(1), 51–62. <https://doi.org/10.1007/s10669-006-5358-y>
- Dembek, M., Willing, S. E., Hong, H. A., Hosseini, S., Salgado, P. S., & Cutting, S. M. (2017). Inducible expression of spo0a as a universal tool for studying sporulation in *Clostridium difficile*. *Frontiers in Microbiology*, 8(SEP), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01793>
- El-Bisi, h. M., & Ordal, Z. J. (1956). The effect of certain sporulation conditions on the thermal death rate of *Bacillus coagulans* var. *Thermoacidurans*. *Journal of Bacteriology*, 71(1), 1–9. <https://doi.org/10.1128/jb.71.1.1-9.1956>
- Eugenia, G. O. L., Isela, Q. Z., & Katiushka, A. Eacute valo N. Ntilde o. (2016). Detection of extracellular enzymatic activity in microorganisms isolated from waste vegetable oil contaminated soil using plate methodologies. *African Journal of Biotechnology*, 15(11), 408–416. <https://doi.org/10.5897/ajb2015.14991>
- Eugenia Guadalupe Ortiz Lechuga. (2016). *Catalizadores químicos y biológicos para la producción de biodiesel a partir de aceites vegetales residuales* (Vol. 41).

Universidad Autónoma de Nuevo León.

- Fujita, M., & Losick, R. (2005). Evidence that entry into sporulation in *Bacillus subtilis* is mediated by gradual activation of a master regulator. *Genes Dev.*, *19*, 2236–2244. <https://doi.org/10.1101/gad.1335705.of>
- Grady, E. N., macdonald, J., Ho, M. T., Weselowski, B., mcdowell, T., Solomon, O., Renaud, J., & Yuan, Z. C. (2019). Characterization and complete genome analysis of the surfactin-producing, plant-protecting bacterium *Bacillus velezensis* 9D-6. *BMC Microbiology*, *19*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1380-8>
- Heyndrickx, M. (2011). The Importance of Endospore-Forming Bacteria Originating from Soil for Contamination of Industrial Food Processing. *Applied and Environmental Soil Science*, *2011*, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2011/561975>
- Julia Pedroza-Padilla, C., Romero-tabarez, Maga., & Orduz, S. (2017). Actividad lipolítica de microorganismos aislados de aguas residuales contaminadas con grasas. *Biología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, *15*(1), 36–4436. <http://dx.doi.org/10.18684/BSAA>
- Lee, N. K., Kim, W. S., & Paik, H. D. (2019). *Bacillus* strains as human probiotics: characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier. *Food Science and Biotechnology*, *28*(5), 1297–1305. <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00691-9>
- Leyva, S. (2016). *Aislamiento, caracterización e identificación molecular de microorganismos productores de lipasas nativos del estado de Sinaloa*. <http://www.cienciasinaloa.ipn.mx/jspui/handle/123456789/117>
- Lu, K., Jin, Q., Lin, Y., Lu, W., Li, S., Zhou, C., Jin, J., Jiang, Q., Ling, L., & Xiao, M. (2020). Cell-Free Fermentation Broth of *Bacillus velezensis* Strain S3-1 Improves Pak Choi Nutritional Quality and Changes the Bacterial Community Structure of the Rhizosphere Soil. *Frontiers in Microbiology*, *11*(September). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02043>
- Mancilla, X. P., & Castaño, D. M. (2013). Formación de endosporas en *Clostridium* y su interacción con el proceso de solventogénesis Endospore formation in *Clostridium* and its interaction with solventogenesis. *Rev. Colomb. Biotecnol*, *XV*(1), 180–188. <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v15n1/v15n1a20.pdf>
- Masayama, A., Kuwana, R., Takamatsu, H., Hemmi, H., Yoshimura, T., Watabe, K., &

- Moriyama, R. (2007). A novel lipolytic enzyme, ycsk (lipc), located in the spore coat of *Bacillus subtilis*, is involved in spore germination. *Journal of Bacteriology*, *189*(6), 2369–2375. <https://doi.org/10.1128/JB.01527-06>
- Massadeh, M. I., & Sabra, F. M. (2011). Production and characterization of lipase from *Bacillus stearothermophilus*. *African Journal of Biotechnology*, *10*(61), 13139–13146. <https://doi.org/10.4314/ajb.v10i61>
- Mehta, D. S., Metzger, L. E., Hassan, A. N., Nelson, B. K., & Patel, H. A. (2019). The ability of spore formers to degrade milk proteins, fat, phospholipids, common stabilizers, and exopolysaccharides. *Journal of Dairy Science*, *102*(12), 10799–10813. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16623>
- Monteiro, S. M. S., Clemente, J. J., Carrondo, M. J. T., & Cunha, A. E. (2014). Enhanced Spore Production of *Bacillus subtilis*; Grown in a Chemically Defined Medium. *Advances in Microbiology*, *04*(08), 444–454. <https://doi.org/10.4236/aim.2014.48049>
- Okamoto, K., Fujiya, M., Nata, T., Ueno, N., Inaba, Y., Ishikawa, C., Ito, T., Moriichi, K., Tanabe, H., Mizukami, Y., Chang, E. B., & Kohgo, Y. (2012). Competence and sporulation factor derived from *Bacillus subtilis* improves epithelial cell injury in intestinal inflammation via immunomodulation and cytoprotection. *International Journal of Colorectal Disease*, *27*(8), 1039–1046. <https://doi.org/10.1007/s00384-012-1416-8>
- Palmeros, B., Güereca, L., Alagón, A., & Soberón-Chávez, G. (1994). Biochemical characterization of the lipolytic activity of *Pseudomonas aeruginosa* IGB 83. *Process Biochemistry*, *29*(3), 207–212. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(94\)85005-4](https://doi.org/10.1016/0032-9592(94)85005-4)
- Pedroza, C., Romero, M., & Orduz, S. (2017). Actividad lipolítica de microorganismos aislados de aguas residuales contaminadas con grasas. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, *15*(1), 36–4436. <http://dx.doi.org/10.18684/BSAA>
- Ruiz, C., & Dias, P. (2005). Microbial lipases with interest in biotechnology and infectious diseases: isolation, characterization and inhibition by natural substances [Universitat de Barcelona]. <http://hdl.handle.net/2445/42397>
- Sella, S. R. B. R., Vandenbergh, L. P. S., & Soccol, C. R. (2014). Life cycle and spore

- resistance of spore-forming *Bacillus atrophaeus*. *Microbiological Research*, 169(12), 931–939. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.05.001>
- Silva, F., Boon N., Verstraete, W. (2015). The industrial markets of sporulating bacteria. *South Asian Academic Research Journals*, May 2014. https://www.researchgate.net/publication/262611797_The_industrial_market_of_sporulating_bacteria/link/54b775450cf2bd04be33940d/download
- Stephens, C. (1998). Bacterial sporulation: A question of commitment? *Current Biology*, 8(2), 45–48. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(98\)70031-4](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(98)70031-4)
- Tu, Z., Abhyankar, W. R., Swarge, B. N., van der Wel, N., Kramer, G., Brul, S., & de Koning, L. J. (2020). Artificial sporulation induction (ASI) by kina overexpression affects the proteomes and properties of *Bacillus subtilis* spores. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms21124315>
- Vasantha, N., & Freese, E. (1979). The role of manganese in growth and sporulation of *Bacillus subtilis*. *Journal of General Microbiology*, 112(2), 329–336. <https://doi.org/10.1099/00221287-112-2-329>
- Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & De los Santos-Villalobos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(1), 95–130. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>
- Vishnoi, M., Narula, J., Devi, S. N., Dao, H. A., Igoshin, O. A., & Fujita, M. (2013). Triggering sporulation in *Bacillus subtilis* with artificial two-component systems reveals the importance of proper Spo0A activation dynamics. *Molecular Microbiology*, 90(1), 181–194. <https://doi.org/10.1111/mmi.12357>
- Wang, L. T., Lee, F. L., Tai, C. J., & Kuo, H. P. (2008). *Bacillus velezensis* is a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(3), 671–675. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65191-0>
- Weinberg, E. D. (1964). Manganese Requirement for Sporulation and Other Secondary Biosynthetic. *Applied Microbiology*, 12(5), 436–441. <https://doi.org/10.1128/aem.12.5.436-441.1964>

Zhu, X., Suidan, M. T., & Venosa, A. D. (2004). *Literature Review on the Use of Commercial Bioremediation Agents for Cleanup of Oil-Contaminated Estuarine Environments*. July.