

BACILLUS SUBTILIS Y SU UTILIZACIÓN EN LA BIOTECNOLOGÍA

Dr. M.V.Z Carlos Miguel Díaz Almeida¹

1. Universidad de Matanzas –Vía Blanca Km.3, Matanzas,
Cuba. carlos.almeida@umcc.cu

Resumen

La utilización de microorganismos en el control biológico de patógenos causantes de enfermedades en los cultivos, constituye una alternativa que contribuye al desarrollo de una agricultura sostenible, esto disminuye los efectos inherentes al uso de plaguicidas y químicos. *B. subtilis* es una bacteria Gram positiva, produce endospora las que son termorresistentes y también resiste a la desecación, la radiación, los ácidos y los desinfectantes químicos, produce enzimas hidrofílicas extracelulares permitiendo que el organismo emplee estos productos como fuente de carbono y electrones. Este bacillus se encuentra ampliamente distribuido en los agro-sistemas y una de sus principales aplicaciones es el control de enfermedades de cultivos agrícolas. Su capacidad para ser utilizado como agente de control biológico de plagas y enfermedades en plantas; así como su uso en la formulación de bioplaguicidas, que han sido incorporados a los programas de Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades.

Palabras claves: *B. subtilis*; agricultura; probióticos.

Introducción

La agricultura bajo el modelo de producción convencional resulta cada día menos sostenible, afectando la parte ambiental, económica y social de las zonas y regiones donde se practica. El uso indiscriminado de plaguicidas y fertilizantes químicos, sumado a la labranza inadecuada y la expansión de la frontera agrícola, ha generado desgaste en los ecosistemas (Barquero *et al.*, 2007). En el caso de la aplicación sistemática de productos químicos en la agricultura implica algunas dificultades como el resurgimiento de plagas primarias y secundarias, el desarrollo de resistencia genética, la contaminación del medio ambiente y afectaciones a la salud humana. Muchos de estos productos provocan daños irreparables sobre el sistema nervioso central, y otros están clasificados como carcinogénicos (Reinoso *et al.*, 2006).

La utilización de microorganismos en el control biológico de patógenos causantes de enfermedades en los cultivos, constituye una alternativa eficiente y ecológica que contribuye al desarrollo de una agricultura sostenible, ya que disminuye los efectos inherentes al uso de plaguicidas y productos químicos (Ruiz-Sánchez *et al.*, 2014). Algunas investigaciones se han enfocado en la búsqueda de microorganismos nativos que actúen bajo las condiciones ambientales de cada región y puedan usarse para restablecer las interacciones de la microbiota del suelo, al punto que sean empleados como biofertilizantes y/o biocontroladores (bioinsumos), que mitiguen el impacto ambiental de los agroquímicos y reduzcan los costos de producción (Orberá *et al.*, 2014). De acuerdo con (Compant *et al.*, 2005) el desarrollo de estos bioproductos para el control de enfermedades en las plantas, se encaminan a aspectos como la preservación ecológica de la interacción planta-microorganismo, las estrategias de aplicación de los inoculantes, el aislamiento de cepas nuevas y el descubrimiento de mecanismos de acción novedosos. Se enfatiza, además, en el uso de los agentes de biocontrol como parte de los programas de tratamiento integral de enfermedades y de la calidad de los suelos.

Se ha demostrado que las bacterias del género *Bacillus* presentan un gran potencial como antagonistas, principalmente por la gran cantidad de enzimas líticas, antibióticos y otras sustancias con actividad biocida, que son capaces de producir efectos de control sobre varias especies de organismos fitopatógenos (Sosa *et al.*, 2005; Castillo-Reyes *et al.*, 2015). El efecto biocontrolador de *Bacillus* spp. frente a *Fusarium* spp. bajo condiciones de invernadero en el cultivo de Romero (*Rosmarinus officinalis* L) fue evaluado por (Corrales *et al.*, 2011), obteniendo que todos los aislamientos de *Bacillus* spp., presentaron efecto biocontrolador sobre *Fusarium* spp. en romero al disminuir la severidad de la marchitez vascular en las plántulas por debajo del 50%, lo que valida los resultados obtenidos en las pruebas *in vitro* y lo señalado en la literatura acerca de estas bacterias.

B. subtilis, microorganismo cuyo hábitat natural es el suelo. Entre sus principales características se encuentra su capacidad para formar esporas en diversas condiciones de estrés, crecer en un intervalo amplio de temperaturas (desde 15 hasta 55°C) (Nancy *et al.*, 2012), su utilización en la última década ha estado en aumento por las múltiples funciones para la cual este se puede emplear, por eso el objetivo de este trabajo es una revisión de la literatura científica sobre *B. subtilis* y su utilización en la biotecnología.

Desarrollo

1. Características

La especie *B. subtilis* descubierta en 1835 por el botánico y microscopista alemán Christian Gottfried Ehrenberg y luego más tarde en 1872 profundizó en su conocimiento y fisiología el botánico y bacteriólogo alemán Ferdinand Cohn. Taxonómicamente según la segunda Edición del Manual Bergey's (1982). El género *Bacillus* pertenece a la familia I *Bacillaceae*, del orden I *Bacillales* de clase tres *Bacilli*, del *fillum* *BXIII firmicutes* del Dominio *bacteria*. En la primera edición del género es claramente diverso desde el punto

de vista fenotípico y genotípico. La diferenciación entre especies del género *Bacillus* se centró en los resultados en la fermentación de lactosa, sorbitol, manitol, melobiosis, hidrólisis de la urea, y descarboxilación de la lisina. (Anderson *et al.*, 2003).

B. subtilis se considera un grupo de bacterias muy similares (Grupo *B. subtilis*), que incluye a las siguientes especies: *B. subtilis sensu stricto*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. atrophaeus*, *B. vallismortis*, *B. pumilus*, *B. donorensis*, *B. mojavensis*, *B. axarquiensis*, *B. malacitensis*, *B. tequilensis*, y *B. venezuelensis*). Este grupo de bacterias grampositivas, aerobias y formadoras de esporas, es muy ubicuitario (agua, suelo en sus capas superiores, sedimentos acuáticos, aire, residuos vegetales, tracto digestivo de animales y personas). En las personas han llegado a encontrarse en concentraciones de hasta 10 esporas/gramo, que parece demasiado abundante como para proceder de su ingestión y más bien indica que se encuentran multiplicándose en el tubo digestivo (Biocrawler, 2006). Las especies pueden ser difíciles de diferenciar porque existen muy pocas características fenotípicas o bioquímicas que las diferencien. Por otra parte, la mayoría de estas especies poseen una elevada homología en el gen del 16S rRNA, a veces superior al 99%, por lo que la secuenciación de este gen tampoco permite diferenciarlas. Únicamente los métodos de hibridación ADN-ADN permiten encontrar homologías inferiores al 70%, por las diferencias existentes en otras regiones genómicas, lo que ha hecho que algunos autores han recomendado el análisis filogenético de varios locus genéticos (multilocus) para diferenciarlas (Kloepper *et al.*, 2005).

Es una bacteria Gram positiva, produce endospora las que son termorresistentes y también resiste factores físicos perjudiciales como la desecación la radiación los ácidos y los desinfectantes químicos, produce enzimas hidrofílicas extracelulares que descomponen polisacáridos, ácidos nucleicos permitiendo que el organismo emplee estos productos como fuente de carbono y electrones, producen antibióticos como la bacitracina, polimixina, gramicidina y circulina, fermentan la caseína y el almidón, vive dentro de los límites de 55 a 70°C. Ha sido clasificada históricamente como un aerobio estricto, aunque recientes investigaciones han demostrado que esto no es correcto. (Biocrawler, 2006) .Es un gran controlador biológico, *B. subtilis* promueve el desarrollo de las plantas y previene las enfermedades del suelo causadas por *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium spp.*, *Verticillium spp.*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phytophthora capsici*, *Pythium spp.*, y el nematodo nodulador de raíces (*Meloidogyne spp.*) y *Rhizoctonia solani*, agente causal de la enfermedad denominada “mal del tallito” del algodonero (Kloepper *et al.*, 2005).

Según Ñacato y Valencia (2016), para la caracterización macroscópica correcta de colonias creadas por *B. subtilis* debe tener las siguientes características; colonias de color blanco o crema, tamaño aproximado de 2 a 4 mm de diámetro, aspecto liso, mucoso o rugoso y bordes ondulados o extendidos, descritas por Realpe, Hernández y Agudelo (2002) como se observa en la figura 1. Y para la caracterización microscópica debe tener las siguientes características; bacilos gram positivos de aproximadamente 0,8 mm de diámetro por 2 o 3

mm de largo con bordes redondeados, con la presencia de esporas esféricas y centrales que no deforman el bacilo como se observa en la figura 2.



Morfología microscópica de *Bacillus subtilis*

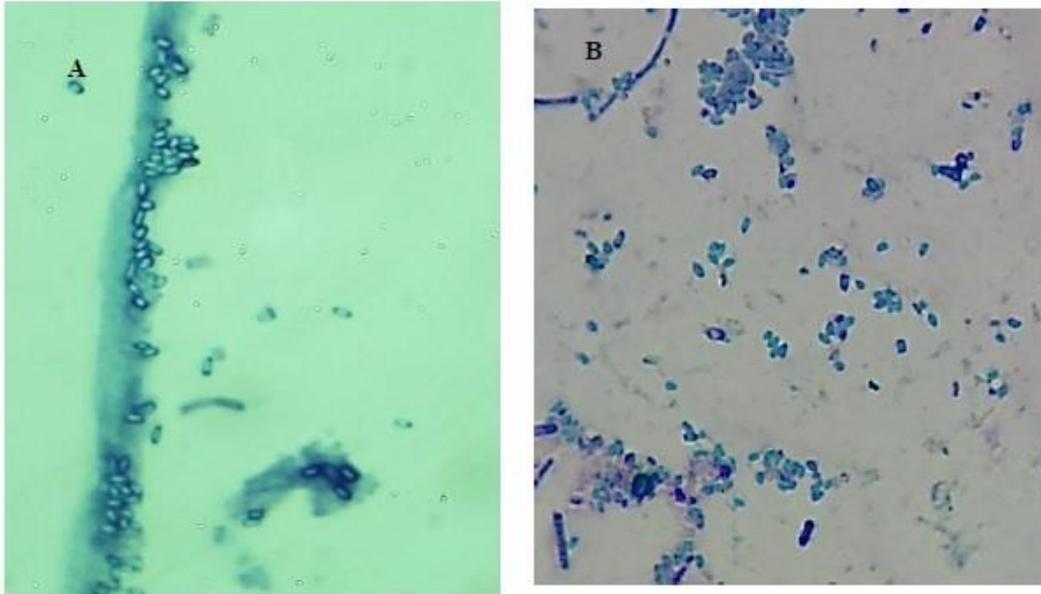


Fig. 2 (A) Morfología de *Bacillus* por tinción con azul de metileno, (B) Identificación de esporas por tinción con verde brillante

Elaborado por: Ñacato, C & Valencia, M, (2015).

1.1 Consideraciones metabólicas durante el crecimiento de *B. Subtilis*.

Durante el crecimiento de *B. subtilis*, sin limitación de oxígeno, se produce ácido acético como subproducto. Esto sucede como respuesta a un exceso en el flujo de entrada de glucosa y por tanto a un incremento en el flujo glicolítico a ácido pirúvico, el cual la célula es incapaz de utilizar en su totalidad para biosíntesis en el ciclo de Krebs (Phalakornkule *et al.*, 2000; Blencke *et al.*, 2003). Este fenómeno ocurre cuando existe glucosa en el medio en concentraciones suficientes para controlar, por medio de la proteína CcpA (proteína de control catabólica), regiones reguladoras CRE (elementos de respuesta catabólicos) en los promotores de algunos genes entre los cuales están *ackA* y *pta* (acetato cinasa y fosfotransacetilasa) de la vía de producción de ácido acético e incluyendo también algunos genes de las rutas del catabolismo de la glucosa (Prescan-Siedel *et al.*, 1999). En estudios

empleando modelos de flujos metabólicos desarrollados para la cepa 168 de *B. subtilis*, se encontró que en cultivo continuo limitado por glucosa, el flujo de carbono (milimoles de carbono/g_{Célula}-h) a través de la ruta de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y la síntesis de las enzimas que componen el ciclo, se incrementa conforme aumenta la velocidad de crecimiento, siendo drásticamente reprimidas solamente a velocidades de crecimiento muy altas como las que se observan en el crecimiento por lote (0,6 h⁻¹) y conforme la concentración de glucosa se incrementa (Goel *et al.*, 1993). La proteína CcpA también está involucrada en la fuerte represión que ocurre en casi todos los genes necesarios para el ciclo de Krebs (Tobisch, *et al.*, 1999).

Estudios del TCA en *B. subtilis*, utilizando glucosa-piruvato y nitrato en medio complejo y en condiciones anaerobias, han mostrado una drástica disminución en la actividad de varias enzimas del ciclo (Nakano *et al.*, 1998). Como alternativa metabólica se produce ácido acético, con la ventaja adicional de generar un ATP por cada molécula de acetato formada (Nakano *et al.*, 1998, Cruz-Ramos *et al.*, 2000). En *Escherichia coli* en condiciones anaerobias y con glucosa, el TCA es transformado a una forma no cíclica, consistiendo de una rama oxidativa y otra reductiva, cuyo fin es proveer de los intermediarios necesarios para la biosíntesis de proteínas (Prohl, *et al.*, 1998).

Por medio de la velocidad de crecimiento, de balances estequiométricos, de consumo de glucosa y la acumulación de los metabolitos formados en condiciones anaerobias, es posible calcular las velocidades específicas (flujo metabólico) y el porcentaje de la fuente de carbono que es catabolizada por la glicólisis y el ciclo de las pentosas, este procedimiento fue inicialmente propuesto por Papoutsakis y Meyer (1985). Haciendo uso de esta metodología, (Bulthuis *et al.*, 1991) cultivando a *Bacillus licheniformis* en condiciones anaeróbicas, por lotes o en continuo, encontraron que hasta un 52% de la glucosa es metabolizada por la vía de pentosas.

1.2 Esporulación y producción de enzimas hidrolíticas.

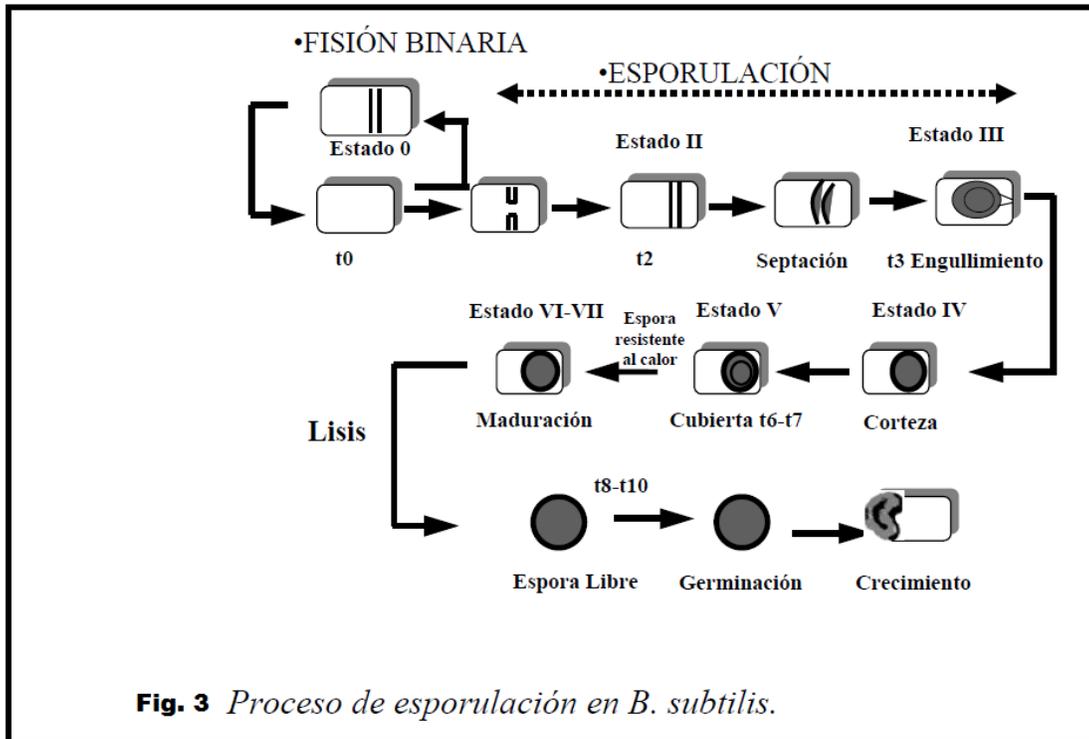
B. subtilis presenta un control temporal al terminar el crecimiento exponencial, lo que le permite llevar a cabo una serie de cambios tanto estructurales como metabólicos que culminan con la formación de esporas. La secuencia de eventos morfológicos que culminan con la formación de una spora libre, consta de siete estadios y se muestra en la figura 3 (Clements *et al.*, 2002).

Cuando se utiliza el medio de cultivo Schaeffer, la formación de una spora tarda de 8 a 10 horas. El estadio cero se inicia con una respuesta al agotamiento de nutrientes y a la producción de péptidos que sensan y responden a una alta concentración celular (Schneider *et al.*, 2002). En el estadio II se producen enzimas hidrolíticas, como las proteasas y amilasas, y termina con la formación de un septo en un polo de la célula, en el estadio siguiente (III) ocurre el engullimiento de la preespora, del IV al VII formación de la corteza, formación de la cubierta, maduración y lisis (Errington, 1993).

La duración de cada etapa es de aproximadamente de una hora (Stragier, 1991, Errington, 1993). Durante esta serie de eventos se forman dentro de un mismo cuerpo dos células; la célula madre y la preespora, las cuales mantienen una comunicación para poder en conjunto y de una forma metabólica ordenada, formar la espora. La transición de un estado al otro es gobernada por seis proteínas reguladoras llamadas factores sigma, que se unen a la ARN polimerasa y determina que promotores se reconocerán. Estos factores son: el factor sigma que ocurre durante el crecimiento vegetativo, σ_A , y cinco factores que se activan en cascada durante la esporulación, llamados σ_H , σ_F , σ_E , σ_G y σ_K (Stragier, 1991, Losick y Stragier, 1992, Kroos y Cutting, 1994).

En el estadio cero y debido a las señales antes mencionadas se activa, vía fosforilación, el regulador transcripcional codificado en *SpoOA*. El mecanismo por el cual *SpoOA* es fosforilado involucra una transferencia secuencial de fosfato inorgánico al través de una serie de reacciones conocidas como sistema “FOSFORRELEVADOR”. Al través de σ_A , *SpoOA* se produce durante el crecimiento vegetativo en bajas concentraciones, sin embargo al tiempo T_0 σ_H (producto de *SpoOH*) amplifica la señal para incrementar la producción de *SpoOA* y otros genes como *SpoOF* y *KinA*.

El fosforrelevador consiste básicamente de cuatro reacciones; inicialmente en respuesta a una señal, *KinA* se autofosforila y el resto del fosforrelevador consiste de tres reacciones subsecuentes en que se transfiere el fosfato, primero de *KinA-P* a *SpoOF* para producir *SpoOF-P*, de este a *SpoB* para producir *SpoB-P* y finalmente de este a *SpoOA* para producir *SpoOA-P*. El gen *KinB* es otro gen de por lo menos tres que codifican para una proteína con actividad similar a *KinA*. Además existen tres fosfatasas que inhiben la actividad del fosforrelevador; la fosfatasa *SpoOE* es específica para *SpoOA-P*, la *RapA* lo es para *SpoOF-P* al igual que *RapB* y sus funciones pudieran ser prolongar el estado de transición y así acumular suficiente *SpoOA* y estimular etapas posteriores o bien inhibir la acumulación de *SpoA-P* y contribuir a la inactivación del fosforrelevador en etapas posteriores del proceso de esporulación. *AbrB* es un gen que participa en la regulación de una variedad de procesos que están asociados con el final de la fase exponencial de crecimiento y principalmente inhibe esta expresión. *SpoOA-P* es el producto final del fosforrelevador y el más importante ya que activa y reprime la transcripción de muchos genes asociados a la esporulación, incluyéndose el mismo (Sonenshein, 2000).



Se sabe que la síntesis de diversas enzimas catabólicas en *B. subtilis* están sujetas a represión metabólica por glucosa, como son la síntesis de enzimas hidrolíticas extracelulares, y las del ciclo de Krebs (Tobisch *et al.*, 1999; Jin *et al.*, 1997). El proceso de formación de esporas también es reprimido por glucosa (Schaeffer *et al.*, 1965). La transcripción de las enzimas del ciclo de Krebs se induce durante la esporulación (Grossman, 1995) y son requeridas ya que permiten obtener la energía necesaria y los intermediarios esenciales para la esporulación, (Ireton *et al.*, 1995; Jin y Sonenstein, 1994).

Las enzimas extracelulares le sirven a *B. subtilis* para degradar y utilizar otros sustratos que puedan existir en su hábitat. Las proteasas forman parte de estas enzimas, las mayoritarias son la proteasa alcalina denominada subtilisina (AprE) y la proteasa neutra (NprE). Estudios sobre su regulación transcripcional sugieren que se lleva a cabo a través de la acción concertada de múltiples elementos de control, como son las proteínas AbrB, Hpr, DegU/DegS y SinR, entre otras. (Jan, 2000; Ferrari *et al.*, 1993).

1.3 Control del metabolismo anaerobio.

En *B. subtilis* se ha observado que muchos genes se inducen o se reprimen en el cambio de condiciones aeróbicas a anaeróbicas (Ye *et al.*, 2000). Se ha encontrado que la regulación se lleva a cabo por proteínas como es el caso de Fnr de *B. subtilis*, la cual es muy semejante a la de *E. coli*. Sin embargo el mecanismo de control es diferente, ya que es positivamente

regulada en respuesta a una baja concentración de oxígeno. Fnr activa varios genes entre los cuales están *narGHIIJ*, *narK*, *nirC*, *lctEP* y *alsSD* (nitrato reductasa, transportador de nitrito, formación de lactato y acetoina respectivamente) (Cruz-Ramos *et al.*, 1995; Marino *et al.*, 2001).

Los genes *fnr* y *narK* están estructuralmente situados en un operón policistronico hacia arriba del operon *narGHIIJ* en un locus denominado *nar*, que también incluye el gen *arfM* y el marco de lectura abierto *ywiC*. FNR de *B. subtilis* tiene una similitud del 20 y 24 % de residuos idénticos con FNR y Cap de *E. coli*. La regulación transcripcional de *fnr* (*fnr-narK*) es ejercida en dos sitios, una dependiente de FNR en el promotor del operón junto con *narK* y la otra mediada por *resD* y *resE* en el promotor interno. *resD-resE* son dos genes que codifican para proteínas que tienen similitud a los sistemas de dos componentes y que son requeridos para la activación transcripcional de *fnr* en condiciones de limitación de oxígeno (Nakano *et al.*, 1997).

La función de ResD esta directamente relacionada a funciones respiratorias (Sun *et al.*, 1996). La fermentación láctica (*lctE*) en *B. subtilis* es activada por *resD-resE*, *fnr* y *arfM* (Nakano *et al.*, 1997, Cruz *et al* 2000; Marino *et al.*, 2001) y su expresión es significativamente reducida en presencia de nitrato. *ArfM* es otro regulador en la cascada de reacciones que regulan el metabolismo anaerobio y que ejerce control sobre la expresión de *lctEP* y *alsSD*, su expresión es regulada a su vez por FNR. La formación de algunas de las enzimas del ciclo de Krebs en condiciones de respiración de nitratos se encuentran reprimidas y otras solo parcialmente, este control no es ejercido por Fnr, ResD-ResE y tampoco involucra a CcpA y CcpB (Nakano, *et al.*, 1998).

La regulación de la nitrito reductasa ha sido muy controvertida ya que se han usado diferentes cepas (168, derivadas y JH642) y condiciones en su estudio. Hoffman *et al.*, (1998) mostraron que la cepa JH642 es capaz de crecer anaeróticamente con nitrito como aceptor final de electrones, sin embargo no mostraron una dependencia de FNR para la expresión de la nitrito reductasa. Cuando usaron nitrato, ellos reportan que inmediatamente a la aparición de nitrito por la acción de la nitrato reductasa, se inicia la conversión a amonio por la nitrito reductasa. Nakano *et al.* (1998) también mostraron que la cepa JH642 podía crecer en condiciones anaeróbicas en presencia de nitrito. Clements *et al.*, (2002) no observaron crecimiento de una cepa derivada de la 168 en condiciones anaerobias utilizando nitrito.

Al ser una bacteria muy ubicuitaria, se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, encontrándose en las capas superiores del suelo y en el tubo digestivo de los animales, es relativamente fácil que contamine alimentos frescos, principalmente aquellos que pueden tomar contacto con el suelo, y en los de origen vegetal. Además, puede contaminar productos lácteos, carnes, alimentos infantiles, platos de arroz, especias y cereales). Sus esporas pueden sobrevivir a la cocción, a los procedimientos de pasteurización láctea o de los zumos de frutas, y a la preparación de comidas caseras, por lo que sus esporas pueden

germinar después y multiplicarse en forma vegetativa cuando las condiciones ambientales le son propicias.

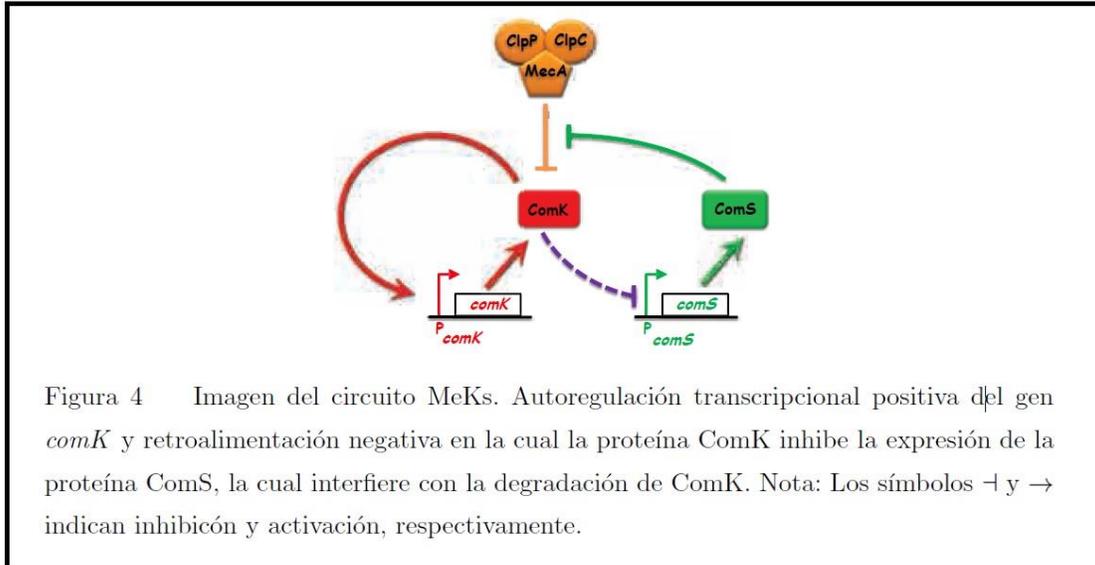
En general, se considera una especie no patógena, y se utiliza como probiótico en individuos sanos. Sin embargo, se han descrito casos aislados o agrupados en brotes con manifestaciones digestivas, como gastroenteritis, debidos al consumo de alimentos en los que ha proliferado, y atribuidos a la ingestión de una toxina preformada en el alimento (síndrome emético), o a la generación de la toxina a nivel digestivo (síndrome diarreico). No obstante, la información sobre las intoxicaciones alimentarias por esta especie es escasas, y sólo se ha descrito implicado en algunos brotes ocasionales. Se han encontrado en infecciones de pacientes inmunodeprimidos. En relación con los alimentos, los brotes de intoxicación alimentaria atribuibles a esta especie también han sido muy ocasional. Se ha descrito la producción de una toxina extracelular, la subtilina (*B. subtilis*) de escasa toxicidad y únicamente relacionada con el desarrollo de reacciones alérgicas en individuos que trabajan con cultivos industriales de esta especie. (IVAMI, 2019)

2. Utilización

2.1 Genética

Dependiendo de las condiciones de crecimiento, una subpoblación de células de *B. subtilis* comprendida entre el 1 y 10% entra en un estado transitorio denominado competencia, en el que adquieren la capacidad de incorporar ADN del exterior al medio intracelular (Grossman, 1995).

En la Fig. 4 se puede ver el circuito que regula la competencia en *B. subtilis*, al que se denomina circuito MeKS (Suel *et al.*, 2006). Los símbolos \vdash y \dashv indican inhibición y activación, respectivamente. El principal gen que regula la competencia, *comK*, es activado indirectamente por la proteína ComS, cuya producción viene determinada por los niveles de estrés. Esta proteína inhibe la degradación de ComK mediada por el complejo formado por MecA-ClpP-ClpC mediante unión competitiva, dando lugar a una realimentación indirecta globalmente negativa señalada en color púrpura en la figura.



La proteína ComK activa su propia transcripción (retroalimentación positiva en rojo) y se inicia el estado de competencia. Esta situación es transitoria, ya que el estado de competencia acaba cuando la producción de ComS finaliza debido a la degradación de esta proteína y a la inhibición del promotor de dicho gen, PComS por parte de ComK (línea púrpura punteada de ComK al promotor PComS) (Suel *et al.*, 2007). Este circuito de regulación funciona como un sistema excitable en el que una pequeña perturbación genera largas excursiones en el espacio de fases, que acaban devolviendo al sistema al estado inicial (Suel *et al.*, 2007).

El conocimiento genético y fisiológico que se tiene de *B. subtilis* facilita el desarrollo de sistemas de expresión genética más flexibles y controlables. Más aún, *B. subtilis* se considera en el estatus GRAS por sus siglas en inglés (Generally Regarded As Safe) es decir, que es considerada segura, por lo que no se espera que traiga consecuencias nocivas tras su consumo por humanos o animales (Ferreira *et al.*, 2005). Finalmente, la habilidad de crecer en un medio simple y barato a una alta tasa crecimiento convierten a *B. subtilis* en un candidato ideal para la producción de moléculas bioactivas integrando el gen heterólogo dentro de su cromosoma para incrementar la estabilidad de la expresión genética, y así llevar al desarrollo de inmunoestimuladores o inmunomoduladores, es decir, vacunas vivas que eliminen el riesgo de transmisión iatrogénica de enfermedades infecciosas por la eliminación del uso de jeringas (Nicholson *et al.*, 2000; Duc *et al.*, 2003; Oggioni *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2005).

2.2 Agricultura

El *B. subtilis* se encuentra ampliamente distribuido en los agro-sistemas y una de sus principales aplicaciones es el control de enfermedades de cultivos agrícolas. Su capacidad para ser utilizado como agente de control biológico de plagas y enfermedades en plantas;

así como su uso en la formulación de bioplaguicidas, que han sido incorporados a los programas de Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades. Además se analiza el uso de este en la agricultura bajo un enfoque de bioseguridad agrícola, así como los principales criterios indispensables de selección de agentes de control biológico promisorios, considerando cepas no patogénicas para el ser humano, y que no impacten negativamente a las comunidades microbianas de los agro-ecosistemas, como efecto secundario por su actividad biológica no específica contra un fitopatógeno en particular. (Villarreal *et al.*, 2018)

Bacillus subtilis es una de las bacterias más estudiadas en el mundo por su actividad antifúngica debido a la síntesis de metabolitos peptídicos de acción antibiótica (gramicidina, surfactin, iturin, y fengy cin). Su actividad antagonista se completa por su alta capacidad para colonizar la zona de la rizosfera (competencia espacial), su rápida asimilación de nutrientes y a la secreción de enzimas digestoras que degradan y matan por contacto directo a hongos y bacterias (quitinasas, celulasas, proteasas y glucanasas) los cuales les sirven de alimento. La potencialidad de aislados de *B. subtilis* en el control de las enfermedades provocadas por el hongo *Colletotrichum acutatum* en las plantaciones de tomate demostado por Kupper *et al.*, 2010 demuestran la utilidad de esta bacteria en ese sector.

2.3 Alimentación animal

Tras la selección y caracterización de cepas de *Bacillus* con la capacidad de producir enzimas tipo proteasas, carbohidrasas (galactosidasas, amilasas, glucosidasas) y lipasas mediante diversos ensayos sensitivos en placas de Petri, Ochoa y Olmos (2006) comprobaron los efectos probióticos de *B. subtilis*, probando en primer lugar la sobrevivencia de la bacteria, viabilidad y comportamiento metabólicamente activo al incluirla en un alimento para camarón, el cual mostró brindar el mismo crecimiento que el alimento comercial pero requiriendo menores costos de producción, mejorando el factor de conversión alimentario (FCA) y, aunque no mostró diferencia significativa en la sobrevivencia respecto a los otros tratamientos probados, sí marcó una diferencia al someterse los organismos a una prueba de resistencia al estrés por baja concentración de oxígeno. Con este trabajo se demostró que *B. subtilis* tiene potencial como probiótico ayudando al hospedero a incrementar su resistencia al estrés (Ochoa, 2006).

Duc *et al.*, (2004) caracterizaron cinco productos probióticos comerciales y una cepa de *B. subtilis* para su aplicación en humanos, encontrando evidencias de colonización, inmunoestimulación y actividad antimicrobial, *B. subtilis* mostró no colonizar el tracto intestinal de los ratones inoculados y el desarrollo tanto de la célula vegetativa como esporas. Al probar la respuesta de las citocinas con los probióticos encontraron una producción temprana de IFN- γ y TNF- α en los órganos linfoides secundarios además de inducir la producción de la citosina proinflamatoria IL-6. Comprobado el efecto probiótico de *B. subtilis* se sugiere su empleo en las dietas de organismos de interés acuicultural, sin embargo, es necesario establecer la mejor forma de administración, dosificación y calidad,

pues hay productos comercializados como *B. subtilis* probiótico cuando en realidad se trata de productos basados en otras especies de *Bacillus* y no propiamente de la especie que realmente tiene esta propiedad (Green *et al.*, 1999).

Estos cultivos producen sus efectos probióticos, principalmente, por la exclusión de microorganismos potencialmente patógenos, el estímulo a la respuesta inmunológica y la prevención de enfermedades infecciosas (Spring *et al.*, 1996; Nomoto, 2005; Hamid *et al.*, 2006; Bocourt *et al.*, 2007). En ese sentido Milián (2008) encontró una mejora en estos indicadores cuando empleó un cultivo de *B. subtilis* durante todo el ciclo de cría en pollos de ceba. Igual resultado fue obtenido por Opalinski *et al.*, (2007) en pollos de ceba.

Conclusiones

El uso del *B. subtilis* en la actualidad ofrece grandes potencialidades para la biotecnología, es una bacteria que se puede usar en disímiles campos de esta. El conocimiento genético y fisiológico que se tiene de *B. subtilis* facilita el desarrollo de sistemas de expresión genética más flexibles y controlables. Instituye un método de prevención o control de plagas para el cultivo, beneficiaria en gran manera como aditivo alimenticio por las funciones probióticas que realiza.

Referencias bibliográficas

ANDERSON, T.H. Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality. *Ag. Ecosys. Environ.*, vol. 98, 2003, pp.285-293.

BARQUERO, L., CAMPOS, S., TOBAR, M., GUERRERO, A., SÁNCHEZ, J., & LANDINEZ, L. Informe de vigilancia tecnológica. Bioinsumos. Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología (COLCIENCIAS). Bogotá, Colombia: Cargraphics. 2007.

Biocrawler. 2006. http://www.biocrawler.com/encyclopedia/Bacillus_subtilis

BLENCKE, H.M., HOMUTH, G., LUDWIG, H., MADER, U., HECKER, M., STULKE, J. Transcriptional profiling of gene expression in response to glucose in *B. subtilis*: regulation of the central metabolic pathways. *Met. Eng.*, vol. 5, 2003, pp.133-149.

BOCOURT, R.Z., RODRÍGUEZ, Y., GARCÍA Y. Metodología para la evaluación de productos probióticos en la respuesta fisiológica y productiva de animales de interés económico. II Congreso de Producción Animal Tropical. Instituto de Ciencia Animal, La Habana, Cuba. 2007.

BULTHUIS, B.A., ROMMENS, C., KONINGSTEIN, G.M., STOUTHAMER, A.H. Formation of fermentation products and extracellular protease producing during anaerobic growth of *Bacillus licheniformis* in chemostat and batch culture. *A. van Leewenhoek*, vol. 60, 199, pp.1355-371.

CASTILLO-REYES, F., HERNÁNDEZ-CASTILLO, F., GALLEGOS-MORALES, G., FLORES-OLIVAS, A., RODRÍGUEZ-HERRERA, R., & AGUILAR, C. Efectividad in vitro de Bacillus y polifenoles de plantas nativas de México sobre Rhizoctonia-Solani. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 2015, pp.549-562.

CLEMENTS L, BS MILLER, U.L. Streips Comparative growth analysis of the facultative anaerobes *B. subtilis*, *Bacillus licheniformis*, and *Escherichia coli*. Syst. Appl. Microbiol., vol. 25, 2002, pp.284-286.

COMPANT, S., DUFFY, B., NOWAK, J., CLÉMENT, C., & BARKA, E. Use of Plant Growth Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. Appl Environ Microbiol., no.9, vol.71, 2005, pp. 4951-4959.

CORRALES, L., SÁNCHEZ, L., CUERVO, J., BAUTISTA, D., GONZÁLEZ, L., & GUEVARA, M. Evaluación del efecto biocontrolador de Bacillus spp., frente a Fusarium spp., bajo condiciones de invernadero en Rosmarinus officinalis L. NOVA-Publicación Científica en Ciencias Biomédica, no.13, vol. 8, 2011, pp. 63-75.

CRUZ-RAMOS H, L BOURSIER, I MOSZER, F KUNST, A DANCHIN, P GLASER. Anaerobic transcription activation in *B. subtilis*: identification of distinct FNR-dependent and -independent regulatory mechanisms. EMBO J. 14: 5984-5994.

Cruz-Ramos H, T Hoffmann, M Marino, H Nedjari, E Presecan-Siedel, O Dreesen, P Glaser, D Jahn 2000. Fermentative metabolism of *B. subtilis*: physiology and regulation of gene expresión. J. Bacteriol., vol.182, 1995, pp.3072-3080.

CUERVO, J. Aislamiento y caracterización de Bacillus sp. como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. Trabajo de grado en opción a Lic. En Microbiología. 2010, 70p

DUC, L., HONG, H., BARBOSA, T., HENRIQUES A. Y CUTTING, S.M. Characterization of Bacillus Probiotics Available for Human Use. Applied and Environmental Microbiology, no.4, vol.70, 2004, pp. 2161–2171.

Duc, L.H., H. Hong, N. Fairwather, E. Ricca y S.M. Cutting. 2003. Bacterial Spores as Vaccine Vehicles. Infection and Immunity, 71(5): 2810-2818.

ERRINGTON, J. *B. subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. Microbiol. Rev., vol. 57, 1993, pp. 1-33.

ESPINOSA, J. J. Caracterización del proceso de crecimiento de *B. subtilis* bajo condiciones anaerobias. Obtener el título de Doctor en Biotecnología. 2005, 90p

FERRARI, E., JARNAGIN, A.S., SCHMIDT, B.F. Commercial production of extracellular enzymes. Cap. 62, pp. 917-937. En *B. subtilis* and other gram-positive bacteria, ed. AL Sonenhshein, Pub. ASM, Washington, EUA. 1993

FERREIRA, L., FERREIRA, R., Y SCHUMANN, W. Bacillus subtilis As a Tool For Vaccine Development : From Antigen Factories To Delivery Vectors. Anais da Academia Brasileira de Ciências, no. 1, vol.77, 2005, pp. 113-124.

GOEL, A., FERRONCE, J., JEONG, J. y ATAAL, M.M. Analysis of metabolic fluxes in batch and continuous cultures of *B. subtilis*. Biotechnol. Bioeng., vol. 42, 1993, pp.686-696.

GROSSMAN, A.D. Genetic networks controlling the initiation of sporulation and the development of genetic competence in *B. subtilis*. Ann. Rev. Genetics, vol. 29, 1995, pp. 477-508.

HAMID, R., HAGHIGHI, J.G., CARLTON, L., GYLES, M., HAYES, A., HUAIJUN, Z., BABAK, S., CHAMBERS, R.J. AND SHAYAN, S. Probiotics Stimulate Production of Natural Antibodies in Chickens. Clin. Vaccine Immunol, no.9, vol. 13, 2006, pp. 975–980.

HOFFMAN, T, TROUP, B., SZABO, A., HUNGERER, C., JAHN, D. The anaerobic life of *B. subtilis*: cloning of the genes encoding the respiratory nitrate reductase system. FEMS Microbiol. Lett., vol.131, 1998, pp.219-225.

IRETON, K, J SHENGFA, NG, D GROSSMAN, AL SONENSHEIM. Krebs Cycle function is required for activation of the SpoOA transcription factor in *B. subtilis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 92, 1995, pp.2845-2849.

IVAM, I. Instituto Valenciano de Microbiología. *B. subtilis* (grupo de especies *B. subtilis*): cultivo cualitativo y cuantitativo, identificación y detección de toxinas. 2019. Disponible en: <https://www.ivami.com/es/microbiologia-de-alimentos/642-bacillus-subti>.

JAN, J. “Diseño y construcción de cepas de *B. subtilis* sobre productoras de proteínas heterólogas” tesis de Doctorado en Ciencias Bioquímicas. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. 2000.

JIN, S.A.L. Sonenstein Identification of two distinct *B. subtilis* citrate synthase genes. J. Bact., vol. 176, 1994, pp. 4669-4679.

JIN, S., LEVIN, P.A., MATSUNO, K., GROSSMAN, A.D. Y SONENSHEIN, A.L. Deletion of the *B. subtilis isocitrate* dehydrogenase gene causes a block at stage I of sporulation. J. Bacteriol., vol. 179, 1997, pp.4725-4732.

JOSEPH, W., KLOEPPER, CHOONG-MIN, R.Y., CHIA-HUI H, U., ROBERT, U., LOCYAND, D. Estudio de los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal inducido por rizobacterias en *Arabidopsis thaliana*. Plant and Soil., vol. 26, 2005, pp.285-292.

KROOS, L., CUTTING, S. Intracellular and intercompartmental communication during *B. subtilis* sporulation. En Regulation of bacterial differentiation, Cap. 8, pp. 115-180. Edit. P Piggot, et. al, American Society for Microbiology, Washington. 1994

LOSICK, R. AND STRAGIER, P. Crisscross regulation of cell-type-specific gene expression during development in *B. subtilis*. Nature, vol. 355, 1992, pp.601-604.

MARINO, M, CRUZ-RAMOS, H., HOFFMAN, T., GLASER, P., JAHN, D. Modulation of anaerobic energy metabolism of *B. subtilis* by arfM (*ywiD*). J. Bacteriol., vol.183, 2001, pp.6815-6821.

- MILIAN, G. Obtención de cultivos de *Bacillus* spp. y sus endosporas. Evaluación de su actividad probiótica en pollos (*Gallus gallus domesticus*). Tesis en Opción al Grado Científico de Doctora en Ciencia Veterinarias. Universidad Agraria de la Habana. Cuba. 2009.
- NAKANO, M.M., ZUBER, P. Anaerobic growth of a “strict aerobe” (*B. subtilis*). Ann. Rev. Microbiol., vol. 52, 1998, pp.165-190.
- NAKANO, M.M., ZUBER, P., SONENSHEIN, A.L. Anaerobic regulation of *B. subtilis* Krebs cycle genes. J. Bacteriol., vol.180, 1998, pp.3304-3311.
- NAKANO, M.M., DAILLY, Y.P., ZUBER, P., CLARK, D.P. Characterization of anaerobic fermentation growth of *B. subtilis*: identification of fermentation end products and genes required for growth. J. Bacteriol., vol. 179, 1997, pp. 6749-6755.
- NICHOLSON, W., MUNAKATA, N., HORNECK, G., MELOSH, H. Y SETLOW, P. Resistance of *Bacillus* Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. Microbiology and Molecular Biology Reviews, no.3, vol.64, 2000, pp.548-572.
- NOMOTO, K. Prevention of infection by probiotics. Journal of Biological Science Bioengineering, no.6, vol. 100, pp. 2005 583-592.
- ÑACATO, C. A Y VALENCIA, M. F. Aislamiento, identificación y pruebas in vitro de cepas autóctonas de *B. subtilis* como agente de biocontrol de *Alternaria* spp. en Brassica oleracea. Obtención del título de Ingeniería en biotecnología de los recursos naturales, 2016.
- OCHOA, J. L. Desarrollo de Probióticos para la Camaronicultura. Tesis de Doctorado. CICESE. Ensenada, Baja California. 2006. 89 pp.
- OCHOA, J. Y OLMOS, J. The Functional Property of Bacillus For Shrimp Feeds. Food Microbiology, no.5, vol. 23, 2006, pp.19-525.
- OGGIONI, M., CIABATTINI, A., CUPPONE, A. Y POZZI, G. *Bacillus* Spores for Vaccine Delivery. Vaccine, vol. 21, 2003, pp. S2/96-S2/101.
- OPALINSKI, M., MAIORKA, A., DAHLKE, F., CUNHA, F., VARGAS, F. Y CARDOZO, E. On the use of a probiotic (*Bacillus subtilis*-strain DSM 17299) as growth promoter in broiler diets. Rev. Brasileira de CiênciaAvícola, no. 2, vol. 9, 2007, pp 1-3.
- ORBERÁ, T., SERRAT, M., & ORTEGA, E. Potencialidades de la cepa SR/B-16 de *Bacillus subtilis* para el control de enfermedades causadas por hongos en cultivos de interés agrícola. Biotecnología Aplicada, vol. 31, 2014, pp.7-12.
- PAPOUTSAKIS, E.T. Y MEYER, C.L. Equations and calculations of product yields and preferred pathways for butanediol and mixed-acid fermentations. Biotechnol. Bioeng., vol. 27, 1985, pp. 50-66.

PHALAKORNKULE, C., FRY, B., ZHU, T., KOPESSEL, K., ATTAI, M.M. Y DOMACH, M.M. ¹³C NMR Evidence for pyruvate kinase flux attenuation underlying suppressed acid formation in *B. subtilis*. *Biotechnol. Prog.*, vol. 16, 2000, pp. 169-175.

PRESCAN-SIEDEL, E., GALINIER, A., LONGIN, R., DEUTSCHER, J., ANCHIN, A., DGLASER, P., MARTIN-VERSTRAETE, I., Catabolite regulation of the *pta* gene as part of carbon flow pathways in *B. subtilis*. *J. Bacteriol.*, vol. 181, 1999, pp.6889-6897.

PROHL, C., WACKWITZ, B., VLAD, D., UDEN, G. Functional citric acid cycle in an *arcA* mutant of *Escherichia coli* during growth with nitrate under anoxic conditions. *Arch. Microbiol.*, vol. 170, 1998, pp.1-7.

REALPE, M.E., HERNÁNDEZ, C.A., & AGUDELO, C.I. *Revista biomedica*. Obtenido de Especies del género Bacillus: Especies del género Bacillus: morfología macroscópica y microscópica (enero de 2002). Disponible en: <http://www.revistabiomedica.org>

REINOSO POZO, Y., CASADESÚS ROMERO, L., GARCÍA SUÁREZ, A., GUTIÉRREZ PÉREZ, J., & ÁLVAREZ-RIVERA, V. Aislamiento, selección e identificación de bacterias del género Bacillus antagonistas de *Pectobacterium carotovorum*. *Fitosanidad.*, no. 3, vol.10, 2006, pp.187-191.

RUIZ-SÁNCHEZ, E., MEJÍA-BAUTISTA, M., CRISTÓBAL-ALEJO, J., VALENCIA-BOTÍN, A., & REYES RAMÍREZ, A. Actividad antagónica de filtrados de *Bacillus subtilis* contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). *Rev. Mex. Cienc. Agríc.*, no.7, vol. 5, 2014, pp.1325-1332.

SCHAEFFER, P., MILLET, J., AUBERT, J. Catabolite repression of bacterial sporulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 54, 1965, pp.704-711.

SCHNEIDER, K.B., PALMER, T.M., GROSSMAN, A.D. Characterization of *comQ* and *comX*, two genes required for production of ComX pheromone in *B. subtilis*. *J. Bacteriol.*, no. 4, vol. 184, 2002, pp.10-419.

SONENSHEIN, A.L. Control of sporulation initiation in *B. subtilis* *Curr Opin Microbiol.*, vol. 3, 2000, pp.561-566.

SOSA, A., PAZOS, V., & TORRES, D. Aislamiento y selección de bacterias pertenecientes al género Bacillus con potencialidades para el control biológico en semilleros de tabaco. *Centro Agrícola*, no. 3, vol.32, 2005, pp.25- 29.

SOTO. N. M., LÓPEZ. S. E. Y MURGUÍA, C. A. Eficacia de la cepa nativa de *Bacillus subtilis* como agente supresor del nematodo del nudo *Meloidogyne* spp. en cultivo de *Capsicum annuum* (ají pimiento piquillo). 2012.

SPRING, P., K. DAWSON, K. NEWMAN Y C. WENKS. Effect of Mannan Oligosaccharide on Different Cecal Parameters and on Cecal Concentration on Enteric Bacteria in Challenged Broiler Chicks. Seventeenth Annual Meeting of the Southern Poultry Science Society. World Congress Center Atlanta. Georgia. January 22-23, 1996. 60p.

- STRAGIER, P. Dances with sigmas. *The EMBO J.*, vol. 10, 1991, pp. 3559-3566.
- SUEL, G.M., GARCIA-OJALVO, J., LIBERMAN, L.M., & ELOWITZ, M.B. Anexcitable gene regulatory circuit induces transient cellular differentiation. *Nature*, no.7083, vol.440, 2006, pp.545-50.
- SUEL, G. M., KULKARNI, R. P., DWORKIN, J., GARCIA-OJALVO, J., & ELOWITZ, M. B. Tunability and noise dependence in differentiation dynamics. *Science (New York, N.Y.)*, no. 5819, vol.315, 2007, pp. 1716-9.
- SUN G, SHARKOVA, E., CHESNUT, R., BIRKEY, S., DUGGAN, M.F. SOROKIN, A., PUJIC, P., EHRLICH, S.D. HULETT, M.F. Regulators of aerobic and anaerobic respiration in *B. subtilis*. *J. Bacteriol.*, vol. 178, 1996, pp.1374-1385.
- TOBISCH, S., ZUHLKE, D., BERNHARDT, J., STULKE, J., HECKER, M. Role of CcpA in regulation of the central pathways of carbon catabolism in *B. subtilis*. *J. Bacteriol.*, no. 181, 1999, pp.6996-7004.
- VILLARREAL, M. F., VILLA, E.D, CIRA, L.A., ESTRADA, M.I. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista del Instituto Tecnológico de Sonora*, vol.20, 2017, pp. 24-36.
- YE, R.W., TAO, W., BEDZYK, L., YOUNG, T., CHEN, M., LI, L. Global gene expression profiles of *B. subtilis* grown under anaerobic conditions. *J. Bacteriol.*, vol.182, 2000, pp.4458-4465.