

RESEARCH / INVESTIGACIÓN

Determinación microbiológica y molecular mediante PCR en tiempo real de dos bacterias del género *Bacillus* de interés agro biotecnológico

Microbiological and molecular determination by real-time PCR of two bacteria of the genus *Bacillus* of agro biotechnological interest

Viviana Chiluisa-Utreras¹, Michelle Campaña Verdesoto², Ramiro Daniel Acurio¹

DOI. 10.21931/RB/2020.05.02.4

Resumen: Se efectuó la comparación de curvas de crecimiento a diferentes rangos de pH, salinidad y temperatura, además se determinó el tamaño, forma y posición de endospora de dos diferentes cepas del género *Bacillus*. Para la identificación molecular se realizó la extracción de ácidos nucleicos, utilizando el kit High Pure PCR Template Preparation Kit de Roche® y posteriormente se analizaron las curvas de amplificación producto de la PCR en Tiempo Real.

Se realizaron cinéticas de crecimiento a cada uno de los cultivos de bacterias durante 72 horas y se analizaron estadísticamente las curvas mediante los métodos estadísticos ANOVA y Tukey para determinar significancia ($p < 0.001$). El análisis factorial para la variable "temperatura" no mostró una diferencia significativa entre cepas y tampoco con los valores fijados (28, 32, 37 °C), la variable "pH" si presentó una interacción con valores ($p < 0.0001$) entre cepas; la variable "salinidad" también presentó diferencia significativa entre cepas y con sus respectivas interacciones. En el análisis del área bajo la curva, la variable "temperatura" no mostró diferencia significativa, mientras que las variables "pH y salinidad" presentaron valores correspondientes a ($p < 0.0001$). Para la determinación molecular, se analizaron las curvas de amplificación, confirmando la presunción bioquímica de la cepa BM como *B. megaterium* mediante el análisis del gen *phaC*, así como también se pudo corroborar que la cepa BL corresponde a *B. licheniformis* al analizar el gen *lchAA*. La cinética bacteriana permitió establecer las horas clave para el análisis del crecimiento, confirmando que las características analizadas corresponden a especies pertenecientes a la familia *Bacillaceae*, con aplicación como controladores biológicos en la agricultura.

Palabras clave: *B. licheniformis*, *B. megaterium*, gen *lchAA*, gen *phaC*, PCR en Tiempo Real.

Abstract: The comparison of growth curves was carried out at different ranges of pH, salinity, and temperature, and the size, shape, and position of the endospore of two different strains of the genus *Bacillus* were also determined. For molecular identification, nucleic acid extraction was performed using the Roche® High Pure PCR Template Preparation Kit and the amplification curves resulting from Real-Time PCR were subsequently analyzed.

Growth kinetics were performed on each of the bacteria cultures for 72 hours and the curves were statistically analyzed using the statistical methods ANOVA and Tukey to determine significance ($p < 0.001$). The factorial analysis for the variable "temperature" did not show a significant difference between strains and neither with the fixed values (28, 32, 37 °C), the variable "pH" did show an interaction with values ($p < 0.0001$) between strains; the variable "salinity" also presented a significant difference between strains and with their respective interactions. In the analysis of the area under the curve, the variable "temperature" did not show a significant difference, while the variables "pH and salinity" presented values corresponding to ($p < 0.0001$). For molecular determination, the amplification curves were analyzed, confirming the biochemical presumption of the BM strain as *B. megaterium* through the analysis of the *phaC* gene, as well as it was possible to corroborate that the BL strain corresponds to *B. licheniformis* when analyzing the gene *lchAA*. Bacterial kinetics allowed establishing the key hours for growth analysis, confirming that the characteristics analyzed correspond to species belonging to the *Bacillaceae* family, with the application as biological controllers in agriculture.

Key words: *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *lchAA* gene, *phaC* gene, Real-time PCR.

Introducción

El género *Bacillus* forma parte de la familia *Bacillaceae*, está compuesto por bacilos gram positivos grandes, caracterizados por su capacidad de producir endosporas¹. El género incluye microorganismos aerobios estrictos y anaerobios facultativos; algunas especies son parásitas o patógenas para animales, principalmente insectos, ya que crecen bien en los medios comunes, fermentan carbohidratos y descomponen proteínas. Las técnicas microbiológicas brindan información sobre la morfología de las colonias, la cual es fundamental en la identificación preliminar para la diferenciación de los microorganismos, la observación del fenotipo permite ubicarlo dentro del género *Bacillus*, pero muchas veces no resulta

suficiente para una determinación precisa. Por esto, se acuden a técnicas más sofisticadas, como los ensayos moleculares basados en el análisis del genotipo de los microorganismos, que proporcionan información más específica al momento de hacer una amplificación². La presente investigación se llevó a cabo con el objetivo principal de identificar bacterias de interés agro biotecnológico, que presenten presunción bioquímica dentro del género *Bacillus*. Para efectuar la presente investigación se reactivaron dos cepas crio conservadas, se determinó la concentración inicial de las muestras mediante la técnica McFarland junto con la comparación de curvas de crecimiento a diferentes rangos de pH, salinidad y temperatura, además

¹ Grupo de investigación BIOARN, Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador.

² Laboratorios de Ciencias de la Vida "CIVABI", Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador.

se realizó la determinación de tamaño, forma y posición de endospora de las cepas. Se desarrolló la extracción de ácidos nucleicos, utilizando el kit "High Pure Template Preparation Kit" de Roche® con la finalidad de analizar las curvas de amplificación mediante regiones específicas producto de la PCR en Tiempo Real.

Materiales y métodos

La investigación se llevó a cabo en los Laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito, Campus el Girón con cepas bacterianas crio conservadas obtenidas del cepario del grupo de investigación Biotecnología Aplicada a los Recursos Naturales "BIOARN".

Reactivación de cepas bacterianas

El material biológico se obtuvo del Criobank codificado como BM (*Bacillus megaterium*) y BL (*Bacillus licheniformis*), cada perla se sembró en cajas Petri de 25 mL con medio Agar nutriente (AN) a 30 ± 2 °C por 24 horas³.

Resiembra de cepas

De las placas Petri con crecimiento bacteriano se realizó la siembra con un asa de metal, las muestras se suspendieron con 7 mL de medio Tryptic Soy Broth (TSB) siendo sus condiciones óptimas de crecimiento de 30 ± 2 °C y pH de $7 \pm 0,2$ en tubos de vidrio de 35 mL y con un tiempo de 24 horas³.

Caracterización microbiológica de cepas

Se seleccionaron colonias blanquecinas, de bordes regulares que se resembraron en forma individual en Agar nutriente para determinar tamaño, forma bacilar y además se realizó tinción de Gram positiva y la tinción de endosporas⁴.

Determinación de curvas de crecimiento

Se realizaron curvas de crecimiento a cada uno de los cultivos de bacterias (BM y BL) durante 72 horas; esto con el objetivo de evaluar la capacidad de desarrollo de los microorganismos después de haber estado en contacto con los analitos (NaCl, pH, temperatura). Se realizó 3 repeticiones con un total de 54 muestras. Para cada proceso se colocó 95 mL de caldo nutritivo (TSB) con 5 mL de inóculo (BM y BL) con un volumen final de 100 mL. Se determinaron las temperaturas de 28 °C, 32 °C y 37 °C. En el caso de las curvas para pH se establecieron tres diferentes rangos: uno ácido de 5, uno neutro de 7 y un básico de 8. La salinidad se midió en tres porcentajes correspondientes a 2 %, 4 % y 6 % de NaCl. Todos los ensayos se midieron mediante espectrofotometría mediante un lector de Elisa a una absorbancia de 495 nm cada dos horas, hasta llegar a un tiempo de 72 horas.

Extracción de ácidos nucleicos

Se colocó 200 µL de muestra (BM y BL) en un tubo eppendorf libre de nucleasas de 1.5 mL agregando 5 µL de lisozima e incubar 15 minutos a 37 °C. A continuación, se añadió 200 µL de Buffer de Unión (Binding Buffer) y 40 µL de Proteinasa K, se mezcló inmediatamente e incubó por 10 minutos a 70 °C.

Posterior a esto, se añadió 100 µL de etanol absoluto al 99 % y se mezcló bien; después, se pipeteó el contenido de la muestra en un Tubo con filtro (High Pure Spin Filter Tube) junto con un tubo colector, centrifugando por 1 minuto a 8000 xg. El residuo final en el tubo con filtro se procedió a lavar.

Para los lavados se armó un nuevo tubo colector, al cual se le añadió 500 µL de Buffer removedor de inhibidores (Inhi-

tor Removal Buffer), centrifugando por 1 minuto a 8000 xg. Posterior a esto, se removió el tubo colector y se armó uno nuevo, se añadió 500 µL de Buffer de lavado (Wash Buffer) centrifugando por 1 minuto a 8000 xg, este paso se lo realiza por duplicado.

Finalmente, para la elución del ADN se agregó 200 µL de Buffer de elución (Elution Buffer). El ADN se conservó a -20°C para su análisis posterior.

Amplificación mediante PCR en Tiempo Real

El protocolo que se estableció fue de 5 µL para cada muestra (BM y BL) y sus controles. Se añadió 10,2 µL de Agua grado Biología Molecular, 0,4 µL del Primer FW para BL *ACTGAA-GCGATTCGCAAGTT* y para BM *CGTGCAAGAGTGGGAAAAT*, 0,4 µL del Primer RW para BL *TCGCTTCATATTGTGCGTTC* y BM *TCGCAATATGATCACGGCTA* obtenidas de regiones específicas (*lchAA*) en el caso de *B. licheniformis* y (*phaC*) para *B. megaterium*. Para la elaboración de la Master Mix se utilizó el Kit LightCycle® Fast Start DNA MasterPLUS SYBR Green I.

Análisis Estadístico

Una estructura factorial permitió estudiar los efectos producidos por dos o más factores y sus interacciones. Los resultados previamente obtenidos sobre curvas de crecimiento a tres diferentes variables permitieron un análisis factorial de tratamientos, en este caso se seleccionó un diseño completamente al azar de 2x3 (correspondiente a 2 cepas y 3 niveles de un factor condicional, que corresponde a 6 tratamientos). La comparación de los resultados obtenidos se realizó mediante el test estadístico de ANOVA. Se calculó el área bajo la curva de crecimiento de la población bacteriana (ABCCP) acumulada en el tiempo⁵. Se compararon más de dos grupos entre sí, las diferencias entre éstos fueron determinadas con el test de Tukey y en todos los casos el límite de significancia fue fijado en 5 % ($p=0,05$)⁶. Para el análisis de los datos se utilizó el programa estadístico Infostat 2018⁷.

Resultados y discusión

Caracterización microbiológica de *B. licheniformis* y *B. megaterium*

Las colonias correspondientes a BM fueron identificadas de forma macroscópica como colonias circulares, con borde entero y de elevación convexa. Según Pérez & Mota (2008)⁸, la tinción de gram corresponde a bacilos grampositivos. Se definió el tamaño en colonias grandes con una determinación microscópica de 560 µm. Para la tinción de endospora según Nacato & Valencia (2016)⁹, se estableció endosporas muy visibles en posición terminal debido al gran tamaño de BM. La cepa BL, presentó características macroscópicas como: colonias irregulares, borde ondulado y con elevación plana. Mediante observación microscópica se constató un tamaño de 116 µm. Se implementó la misma metodología señalada en BM para la tinción de endosporas obteniendo un bacilo grampositivo, con endosporas centrales.

Curvas de crecimiento

Se efectuó la curva de crecimiento microbiano de BM y BL por medio de ensayos espectrofotométricos y dos análisis estadísticos siguiendo la metodología antes mencionada con tres variables: temperatura, pH y salinidad. La cepa BL para la variable "temperatura" presentó una fase de adaptación entre las 0 y 10 horas, mientras que a partir de las 24 hasta las 48

horas se da una fase de latencia, a las 72 horas a la temperatura de 32 °C fue la primera en decaer. La cepa BM en cuanto a la temperatura tuvo una etapa de adaptación muy parecida a la cepa BL, pero en la etapa exponencial la temperatura de 28 °C dio una diferencia ya que se encontró entre los valores más bajos, lo que indicó que no fue la temperatura óptima para su crecimiento, pero sin embargo si logra crecer a dichas condiciones. Según Tortoló-Cabañas & Bell-García (2015)¹⁰, *B. megaterium* presenta buenos resultados de crecimiento entre las 45 y 48 horas. El pH en la cepa BL presentó una etapa de adaptación entre la hora 0 y 5; la fase exponencial se dio a partir de las 20 a las 48 horas notándose que a un pH de 5 se obtuvo el valor más alto. La hora de muerte se dio a las 72 horas siendo la curva de pH 5 la primera en decaer. Mientras que la cepa BM no presentó diferencia en cuanto a un rango de pH que favoreciera su crecimiento ya que en los tres casos se desarrolló de forma similar, notándose una fase exponencial entre las 24 a 48 horas y la fase de muerte a las 72 horas. En congruencia con otros estudios¹¹, se concluyó que el crecimiento celular de la cepa BL ocurría básicamente durante las primeras 24 horas. La salinidad se evidenció en la cepa BL con una fase de adaptación entre la hora 0 y 5, la fase exponencial se dio a partir de la hora 20 hasta la hora 60; la concentración de salinidad no influyó directamente en el crecimiento de BL ya que en los tres porcentajes de salinidad presentó un crecimiento sin diferencia significativa. La cepa BM tuvo una fase de adaptación entre la hora 0 hasta la hora 10 siendo la curva más alta de 4 % de salinidad, en la fase exponencial se logró evidenciar que a una concentración baja se dio el mayor pico de crecimiento que corresponde al 2 % de salinidad.

Análisis estadístico factorial

Se realizó un análisis factorial con tratamientos (tem-

peratura, pH y salinidad) mediante la prueba de Tukey con ($p < 0.05$)⁶, este valor se tomó como referencia para determinar si existe o no diferencia significativa con horas clave (hora 0, 5, 24, 48, y 72). La variable "temperatura" a la hora 0 presentó una diferencia significativa en cuanto al crecimiento entre cepas, pero no se dio una interacción entre las tres temperaturas y tampoco se presentó una diferencia significativa para la interacción cepa*temperatura. No se presentó una interacción entre cepa*temperatura en ninguna de las horas establecidas lo que indicó que la temperatura no influye directamente en el crecimiento de estas cepas. Montor-Antonio y otros (2013)¹², expresan que la cepa BL presenta una extensa aplicación en diversos procesos industriales debido a sus amplios rangos de operación de temperatura (25-90 °C). La variable "pH" obtuvo una interacción cepa*pH que denotó claramente que la cepa BM forma un solo grupo, sin diferencia en el crecimiento de los valores de pH y en el caso de la cepa BL se notó la diferencia que existe entre los valores de pH 7 y 8. Según, Pérez y otros (1998)¹³ el crecimiento de *Bacillus* está muy influenciado por el pH.

Análisis estadístico de área bajo la curva

El área bajo la curva arrojó resultados que se pueden observar en la Tabla 1. Para la variable "temperatura" existió una diferencia significativa entre cepas y en los tres valores establecidos no se encontró diferencia alguna ya que los tres se asignaron en un mismo grupo, es decir la temperatura no influyó directamente en el crecimiento de estas cepas. En cuanto a la variable "pH" si existió una diferencia significativa entre cepas siendo la cepa BL la que tuvo mayor crecimiento y en cuanto a los valores específicos (5, 7, 8 pH) es notable que a un pH de 8 ésta tuvo mejores resultados, además se dio una diferencia significativa para la interacción cepa*pH en la cual

	BM	BL	p-valor
CEPA	9107.05 ± 25.85 b	8848.98 ± 25.85 a	<0.0001
TEMPERATURA	28	8915.83 ± 31.65 a	0.08483
	32	8996.55 ± 31.65 a	
	37	8915.83 ± 31.65 a	
CEPA	6802.81 ± 23.79 a	6962.28 ± 23.79 b	0.0005
pH	5	6982.16 ± 29.13 b	0.0001
	7	6947.37 ± 29.13 b	
	8	6718.10 ± 29.13 a	
CEPA*pH	BM	BL	
5	7005.48 ± 41.20 b	6958.84 ± 41.20 b	<0.0001
7	6996.01 ± 41.20 b	6898.73 ± 41.20 b	
8	6406.95 ± 41.20 a	7029.25 ± 41.20 b	
CEPA	5499.35 ± 10.19 a	5549.12 ± 10.19 b	0.0048
SALINIDAD	2	5594.52 ± 12.47 c	<0.0001
	4	5523.86 ± 12.47 b	
	6	5454.31 ± 12.47 a	
CEPA*SALINIDAD	BM	BL	
2	5620.08 ± 17.64 d	5568.95 ± 17.64 cd	0.0012
4	5477.64 ± 17.64 ab	5570.09 ± 17.64 cd	
6	5400.31 ± 17.64 a	5508.31 ± 17.64 bc	

Tabla 1. Valores de medias, error experimental y (p) del análisis de área bajo la curva para las variables "Temperatura, pH y Salinidad" de las cepas BM y BL.

se formaron claramente dos grupos entre las dos cepas de los cuales solo BM a un pH de 8 tuvo diferencia alguna. Para la variable "salinidad" se dio una diferencia significativa entre cepas notándose que la cepa BL es la que presenta mayor crecimiento y para los valores específicos (2, 4, 6 %) existió diferencia significativa entre las tres concentraciones de salinidad en el caso de las dos cepas. También existió diferencia para la interacción cepa*salinidad siendo la cepa BM la que presentó una diferencia entre las dos a una concentración del 6 % de NaCl.

Identificación molecular de *B. licheniformis* y *B. megaterium* mediante PCR en Tiempo Real

La cepa BM y BL fueron sometidas a estudio mediante la técnica PCR en Tiempo Real; en la Figura 1 se muestran los productos de amplificación de la cepa BL mientras transcurren los ciclos de la PCR. La cepa BL presentó una hibridación con los primers codificados utilizados en otros estudios¹⁴, que permitieron la amplificación del gen *lchAA* región que ha demostrado ser capaz de identificar de forma taxonómica a esta cepa ya que el operón de Lichenysin (*lchA*) es responsable de la síntesis de lichenysin en *B. licheniformis* y se confirmó la cepa BL correspondiente a *Bacillus licheniformis*. Además, se observan los resultados obtenidos en la amplificación de la cepa BM en la cual se da la hibridación del ADN molde mediante los cebadores específicos utilizados en estudios previos¹⁵, que permitieron la amplificación del gen *phaC* cuyas secuencias sirven para reconocer regiones únicas presentes, que fueron utilizadas para diseñar los cebadores indicando la singularidad de las secuencias de *phaC* en la identificación de *B. megaterium*. Con estos resultados se pudo confirmar la cepa BM como *B. megaterium*.

Existen estudios como el de Konzl (1997)¹⁶, que presenta a la PCR en Tiempo Real como la técnica adecuada para la caracterización molecular de genes de la bacitracina producido por *B. licheniformis*. Dado que los miembros del género bacteriano gram positivo *Bacillus* son bien conocidos por su potencial para secretar un número de enzimas de interés, no fue sorprendente que las cepas de estudio correspondientes a BL y BM aisladas mediante cebadores específicos, resultaron

ser miembros de este taxón. *B. licheniformis* es una bacteria que se puede aislar de varias fuentes: como el suelo, el agua y en los desperdicios¹⁷. En el caso de la cepa BL, este estudio se basó en la amplificación del gen *lchAA* para su identificación molecular, existe un estudio que ha demostrado que la cepa *B. licheniformis* ATCC 14580 y algunas otras cepas de *B. licheniformis* albergan el gen *lchAA*¹⁷.

Existen varios estudios implicados en la identificación de la cepa BM, este estudio se centró específicamente en el gen *phaC*. Algunos autores como Pramoda & Ajeet (2013)¹⁵ proponen utilizar el gen *polihidroxiclcanoato sintasa C* de *B. megaterium* para el diseño de cebadores que amplifican la región *phaC* para su identificación. Por otra parte Chen (1991)¹⁸ informa que muchas especies de *Bacillus* producen *pha* y desde entonces el gen para la síntesis de *pha* ha sido clonado a partir de *B. megaterium*.

Conclusiones

Las concentraciones bacterianas obtenidas mediante la técnica McFarland permitieron generar las curvas de crecimiento para establecer las horas clave en el análisis, confirmando que las características analizadas: forma, tamaño, tinción de gram y posición de endospora corresponden a especies pertenecientes a la familia *Bacillaceae*. Los modelos estadísticos ANOVA y Tukey permitieron el análisis particionado de los componentes para aprobar la hipótesis y con el análisis del área bajo la curva se concluye que los datos obtenidos frente a las variables planteadas presentan un alto grado de precisión. Finalmente la técnica molecular de PCR en Tiempo Real mediante las curvas de amplificación¹⁹, permitió confirmar la presunción bioquímica de la cepa BM que corresponde a *Bacillus megaterium* mediante el análisis de la región *phaC*; además se pudo corroborar que la cepa BL corresponde a *Bacillus licheniformis* al analizar la región *lchAA*.

Acknowledgements

A la Ing. Alejandra Medrano por su apoyo en la Investigación.

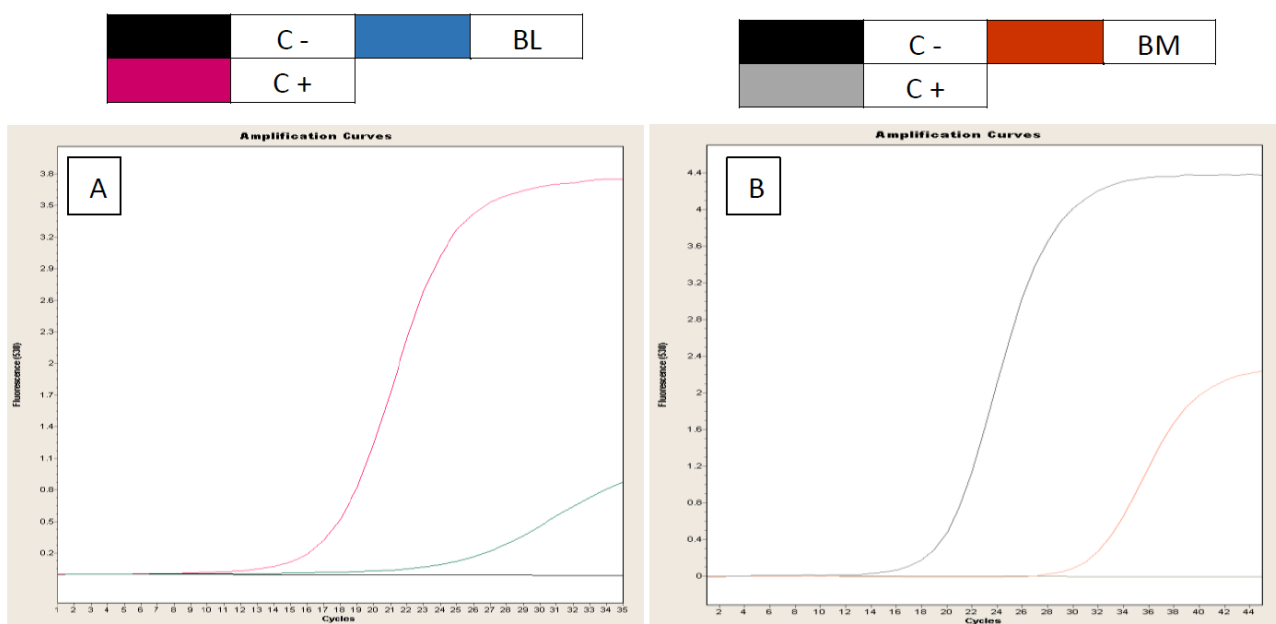


Figura 1. A) Curva de amplificación PCR en Tiempo Real con SYBR Green de la cepa BL: fluorescencia vs ciclos. C-: control negativo; C+: *Bacillus licheniformis* ATCC®14580. B) Curva de amplificación PCR en Tiempo Real con SYBR Green de la cepa BM: fluorescencia vs ciclos. C-: control negativo; C+: *Bacillus megaterium* ATCC®14581. En equipo PCR LightCycler® 2.0.

Referencias bibliográficas

1. Macedo M. Temas de Bacteriología y Virología Médica [Internet]. Montevideo: Universidad de la República; 2008. 646 p. Available from: http://www.enfermeriaaps.com/portal/?wpfb_dl=4348%0Ahttp://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/enterovirus.pdf
2. Sosa-López A, Álvarez-Rivera V, Torres-Campos D, Casadesús-Romero L. Identificación y caracterización de seis aislados pertenecientes al género *Bacillus* promisorios para el control de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad*. 2012;15(1):39–43.
3. Egas C, Tinajero M. Aislamiento de microorganismo capaces de producir antibióticos, a partir de suelos de Regiones Naturales del Ecuador [Internet]. Tesis. Universidad Politécnica Salesiana; 2016. Available from: <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>
4. Reyes A, Ruiz E, Yam C, Dzul M. Selección De *Bacillus* Spp . Con Actividad Antagón Goid . En Diferentes Medios De Cultivo. *Fitosanidad* [Internet]. 2011;15(2):112–21. Available from: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=2091/209122297007>
5. Cecilia B, Gustavo G, Guillermo G, Alejandra B. Componentes de resistencia a *Xanthomonas vesicatoria* raza T2 en genotipos de tomate en condiciones de invernadero y cámara de crecimiento. *Agrociencia Uruguay*. 2014;18(1):86–96.
6. Giacomino N, Notaro U, Cerra M, Gumiy D, Stiefel S, Baroni E, et al. Actividad antibacteriana in vitro de Cefalexina sobre *Escherichia coli* en suero y orina de canino. *FAVE Sección Ciencias Vet*. 2014;11(1/2):15–30.
7. Balzarini M, Gonzalez L, Tablada M, Casanoves F, Di Rienzo J, Robledo C. *Infostat: manual del usuario*. Córdoba: Editorial Brujas. Brujas; 2008.
8. Pérez M, Mota M. Morfología y Estructura Bacteriana. In: TEMAS DE BACTERIOLOGÍA Y VIROLOGÍA MÉDICA. 2008. p. 48–60.
9. Nacato C, Valencia M. Aislamiento, identificación y pruebas in vitro de cepas autóctonas de *Bacillus subtilis* como agente de biocontrol de *Alternaria* spp en *Brassica oleracea* var. *Itálica*. [Internet]. Tesis. Universidad Politécnica Salesiana; 2016. Available from: <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>
10. Tortoló-cabañas K, Bell-garcía A. Producción de proteínas recombinantes en *Bacillus megaterium*: estado del arte. *ICIDCA Sobre los Deriv la Caña Azúcar* [Internet]. 2015;49(1):22–6. Available from: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=2231/223136961004>
11. Cascante J. Fermentación de bacterias del género *Bacillus* en altas concentraciones de oxígeno. *J Chem Inf Model*. 2013;53(9):1689–99.
12. Montor-Antonio J, Olvera-Carranza C, Reyes-Duarte D, Sachman-Ruiz B, Ramírez-Coutiño L, Del Moral S. Biochemical characterization of AmiJ33 an amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* isolated of sugarcane soils at the Papaloapan region *Revista Electrónica Nova Scientia* Caracterización bioquímica de AmiJ33 , una amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens*. *Nov Sci*. 2013;6(12):39–59.
13. Gonzalez RA, Pérez M, Florido G, Piad R, González G, Sol G. Isolation and characterization of strains of *Bacillus* spp. Production of proteolytic enzymes for the production of protein hydrolysates. *Rev Av Científica*. 1998 Jan 1;1:2–9.
14. Madslie EH, Rønning HT, Lindbäck T, Hassel B, Andersson MA, Granum PE. Lichenysin is produced by most *Bacillus licheniformis* strains. *J Appl Microbiol*. 2013 Oct;115(4):1068–80.
15. Nayak PK, Mohanty AK, Gaonkar T, Kumar A, Bhosle SN, Garg S. Rapid Identification of Polyhydroxyalkanoate Accumulating Members of Bacillales Using Internal Primers for phaC Gene of *Bacillus megaterium*. *ISRN Bacteriol*. 2013;2013:1–12.
16. Konzl D, Klenzl A, Schbrgendorfe K, Marahiell M. The bacitracin biosynthesis operon of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716: molecular characterization of three multi-modular peptide synthetases. *Chem Biol* [Internet]. 1997 [cited 2019 Dec 2];4(12):27–37. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9427658>
17. Waldeck J, Daum G, Bisping B, Meinhardt F. Isolation and molecular characterization of chitinase-deficient *Bacillus licheniformis* strains capable of deproteinization of shrimp shell waste to obtain highly viscous chitin. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(12):7879–85.
18. Chen G. Occurrence of poly-D(-)-3-hydroxyalkanoates in the genus *Bacillus*. *FEMS Microbiol Lett*. 1991 Nov 15;84(2):173–6.
19. Chiluisa-Utreras V, Echeverría A. Identificación y cuantificación de *Salmonella* sp. y ADNr 16S bacteriano mediante PCR en tiempo real en muestras de alimentos. *BIONATURA*. 2017; 1-6.

Received: 31 Enero 2020

Accepted: 4 Abril 2020