



Aislamiento e identificación de *Bacillus* spp. del manglar: Características morfológicas, bioquímicas, fisiológicas y pruebas de inhibición

Isolation and identification of *Bacillus* spp. from mangrove: Morphological, biochemical, physiological characteristics and inhibition tests

Rodrigo Saavedra^{1*}; Ruth Vasquez¹; Lita Sorroza¹

1 Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Técnica de Machala, Av. Panamericana km 5½ Vía a Pasaje, Machala, Ecuador.

* Autor corresponsal: rsaavedra2@utmachala.edu.ec (R. Saavedra).

ORCID de los autores:

R. Saavedra: <https://orcid.org/0009-0004-9224-1801>

R. Vasquez: <https://orcid.org/0009-0009-6137-267X>

L. Sorroza <https://orcid.org/0000-0002-8829-0414>

RESUMEN

Las bacterias del género *Bacillus* son conocidas por sus beneficios en el campo de la acuicultura, ya que algunas cepas producen enzimas, antibióticos y compuestos bioactivos que promueven el control biológico, y un ecosistema equilibrado. En este estudio, se aislaron y caracterizaron morfológicamente cepas de *Bacillus* a partir de sedimentos del manglar de Puerto Hualtaco. Se recolectaron tres muestras de sedimento y se cultivaron en agar cromogénico durante 24 a 48 horas. Se realizaron pruebas bioquímicas, análisis de crecimiento a diferentes niveles de pH y salinidad, y se caracterizaron las bacterias según su morfología micro y macroscópica. Los resultados mostraron una gran diversidad en la forma y color de las colonias, una alta versatilidad metabólica y resistencia de las cepas a diferentes ambientes, lo que sugiere un gran potencial biotecnológico. Este estudio enriquece el conocimiento sobre la biodiversidad microbiana en los manglares y subraya la importancia de las bacterias *Bacillus* en estos ecosistemas.

Palabras clave: biodiversidad; cepas; ecosistema; microbiología; sedimento.

ABSTRACT

Bacteria of the *Bacillus* genus are known for their benefits in the field of aquaculture, as some strains produce enzymes, antibiotics and bioactive compounds that promote biological control and a balanced ecosystem. In this study, *Bacillus* strains were isolated and morphologically characterized from sediments of the mangrove swamp of Puerto Hualtaco. Three sediment samples were collected and cultured on chromogenic agar for 24 to 48 hours. Biochemical tests, growth analyzes at different pH and salinity levels were carried out, and the bacteria were characterized according to their micro and macroscopic morphology. The results showed a great diversity in the shape and color of the colonies, a high metabolic versatility and resistance of the strains to different environments, which suggests great biotechnological potential. This study enriches knowledge about microbial biodiversity in mangroves and underlines the importance of *Bacillus* bacteria in these ecosystems.

Keywords: biodiversity; strains; ecosystem; microbiology; sediment.

Recibido: 23-09-2024.
Aceptado: 10-12-2024.



Esta obra está publicada bajo la licencia [CC BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas de manglar se distribuyen por las costas tropicales y subtropicales (Carvajal-Oses et al., 2019). Este entorno se encuentra expuesto a continuos cambios causado por diferentes factores como: la disponibilidad de nutrientes, temperatura del agua, salinidad y niveles de oxígeno, lo que convierte a este tipo de ecosistemas en únicos al albergar una gran biodiversidad de microorganismos (Baskaran et al., 2023). Así mismo, destacan por presentar una alta productividad primaria, resultado de la actividad microbiana realizada por hongos, bacterias y arqueas, siendo estos organismos necesarios para mantener en buen funcionamiento los ecosistemas de manglar (García-Martínez et al., 2021).

El género *Bacillus* es predominante en los ecosistemas de manglar, se encuentra especialmente asociado con *Rhizophora mangle* y *Avicennia nítida* (Castro et al., 2014). Estas bacterias, son Gram positivas, catalasa positiva, formadoras de esporas, con forma de bastón, aeróbicas o anaerobias facultativas, se encuentran comúnmente en suelos ácidos, salino-alcinos o suelos desérticos (Alyousif, 2022; Soltani et al., 2019).

Estas bacterias desempeñan múltiples funciones ecológicas, incluyendo el control biológico me-

dante la producción de metabolitos y enzimas líticas, el reciclaje de nutrientes y la producción de ácidos orgánicos y antibióticos (Dame et al., 2021; Rojas-Badía et al., 2020).

El uso de medios cromogénicos permite la identificación y aislamiento de microorganismos específicos al producir colonias con formas y colores distintivos, facilitando la identificación rápida y reduciendo la necesidad de pruebas adicionales (Shaban et al., 2024). Estos medios utilizan sustratos cromogénicos (X-Gal o X-Glu, ONPG), los cuales, al ser metabolizados por microorganismos con sistemas enzimáticos específicos, liberan un colorante que se fija a las colonias microbianas, permitiendo su diferenciación (Granja et al., 2021; Leena Sankari et al., 2019).

A pesar de la alta diversidad microbiana en los manglares, la información sobre la variedad de bacterias *Bacillus* en estos ambientes es limitada. El objetivo de este estudio es llenar este vacío al proporcionar información sobre la identificación y caracterización de estas bacterias utilizando un medio cromogénico especializado. Al hacerlo, buscamos profundizar en la comprensión de su rol en estos ecosistemas y facilitar futuras investigaciones en este campo.

METODOLOGÍA

Área de estudio

El estudio se lo llevo a cabo en el manglar de la zona de Puerto Hualtaco, Huaquillas, El Oro, Ecuador. Las muestras de sedimento se recolectaron en tres sitios diferentes: Punto 1 (3°26'52.91"S, 80°13'24.86"W), Punto 2 (3°26'29.39"S, 80°13'4.66"W) y Punto 3 (3°25'22.08"S, 80°14'54.74"W).

Muestreo

Las muestras se recolectaron en la mañana, cuando la marea comenzaba a subir con temperatura

ambiental de 24 °C. Para la recolección, se utilizó la técnica de puntos sospechosos (Thomas et al., 2020). Las muestras se extrajeron a una profundidad de 10 cm del sedimento con una cuchara de jardín y se colocaron en bolsas ziploc. Luego, se almacenaron en una nevera corcho a 10 °C para su mantenimiento. Posteriormente, las muestras se trasladaron al Laboratorio de microbiología, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Técnica de Machala.

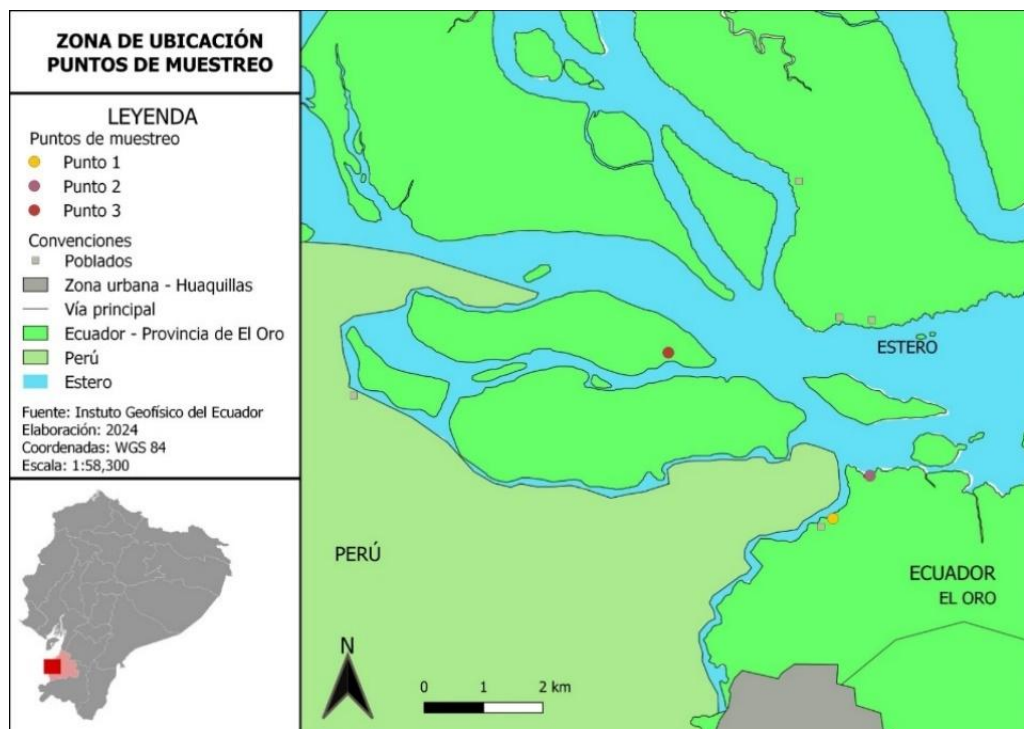


Figura 1. Mapa de ubicación de los puntos de muestreo en la zona de estudio.

Siembra y Aislamiento

Se empleó la metodología reportada por Harwood (1989) y Yilmaz et al. (2006). Para ello, se tomó 1 g de sedimento de cada muestra, se la colocó en 9 ml de solución salina al 1.5 % y se homogenizó por 2 minutos. Después, las muestras fueron calentadas a 80 °C en baño maría durante 10 minutos, seguido de diluciones seriadas desde 10^1 hasta 10^7 y se sembró 100 µl en placas con agar cromogénico (HiCrome™ Bacillus Agar Base), preparado según las indicaciones del fabricante (49 g/L) y esterilizado en autoclave (Modelo ALL-75X-120V) a 120 PSI durante 15 minutos. Las placas fueron colocadas en la incubadora (Incucell IC55 Eco) a 30 °C durante 24 a 48 h.

Para el aislamiento, se utilizó la técnica de estría cruzada para obtener colonias individuales y puras (Sánchez et al., 2017). Este medio selectivo facilita la identificación de colonias, lo que permite aislarlas de manera efectiva según su coloración. Además, se realizó tinción de Gram y de Schaeffer-Fulton para confirmar que las cepas aisladas son Gram positivas y producen esporas, características propias del género *Bacillus* (Jurado et al., 2021).

Caracterización morfológica

Se realizó una caracterización macro y microscópica de las bacterias siguiendo el protocolo descrito por Jackman (2012). Para la caracterización macroscópica, se describieron las colonias en términos de su forma, altura, margen, apariencia de la superficie y color. En cuanto a la caracterización microscópica, se hizo tinción de Gram y de esporas. Posteriormente, se observó al microscopio (Euromex trinocular BSCOPE BS.1153-EPLI) y se utilizó un objetivo de 100x con aceite de inmersión. La imagen fue capturada mediante un sistema de cámara conectada al microscopio para registrar su característica externa y medir su tamaño.

Pruebas bioquímicas

Se realizaron diversas pruebas bioquímicas, entre ellas la prueba de la catalasa. En esta prueba, se colocaron dos gotas de peróxido de hidrógeno al 30% sobre un portaobjetos. Con un asa bacteriológica, se tomó una muestra de una colonia pura y se la añadió al peróxido. La producción de burbujas indica una reacción catalasa positiva, mientras que la ausencia de una reacción negativa (Ali et al., 2020).

Se realizó el test de hidrólisis de gelatina utilizando una metodología propia. Para preparar el medio, se disolvieron 10 g de gelatina sin sabor (14% de proteína), 1 g de peptona (marca Bacto™) y 1 g de NaCl en 100 ml de agua destilada. La mezcla se esterilizó en autoclave a 120 PSI durante 15 minutos. Posteriormente, se distribuyeron 8 ml del medio en tubos de ensayo de 10 ml y se inoculó la bacteria utilizando un asa bacteriológica. Los tubos se incubaron a 30 °C durante 4 días. Luego, se refrigeraron durante 2 horas. La presencia de solidificación del medio indica que no se produjo hidrólisis de la gelatina, mientras que la ausencia de solidificación sugiere que la hidrólisis ha ocurrido.

Finalmente, se realizó la prueba de motilidad utilizando una metodología adaptada. Se prepararon 2,5 g de peptona de soya (marca HIMEDIA) y 0,4 g de agar en 100 ml de agua destilada y 1% NaCl. El medio fue esterilizado en autoclave a 120 PSI durante 15 minutos. Después de la esterilización, el medio se distribuyó en tubos de ensayo con 10 ml cada uno. Usando un asa bacteriológica con punta de aguja, se tomó una muestra de la bacteria y se inoculó de manera lineal en el medio de cultivo. Los tubos se incubaron durante 24 horas a 30 °C, luego de este tiempo se evaluó la motilidad. Si el medio presenta turbidez o crecimiento fuera de la línea de inoculación, el resultado se considera positivo, indicando la presencia de motilidad en la bacteria. Además, en esta prueba de motilidad también se evaluó la capacidad de formación de Biofilm (biopelícula), observando que el biofilm se manifestaba como una capa blanquecina en la parte superior adherida a las paredes del tubo.

Pruebas fisiológicas

Crecimiento a diferentes niveles de salinidad (0 y 7%): Para preparar el medio con 0% de salinidad, se utilizaron 2 g de agar y 1,5 g de peptona, mezclados con 100 ml de agua destilada en un matraz. Para el medio con 7% de salinidad, se emplearon 4,9 g de agar cromogénico y 6 g de NaCl (ya que el medio cromogénico contiene 1% de NaCl). Estos componentes se disolvieron en 100 ml de agua destilada. Después de preparar ambos medios, se esterilizaron en autoclave a 120 PSI durante 15 minutos. Tras la esterilización, los medios se vertieron en placas y se sembraron las bacterias por estrías. Las placas se incubaron a 30 °C durante 24 horas, luego se observó la presencia o ausencia de crecimiento.

Crecimiento a diferentes niveles de pH (6, 8 y 9): Para preparar el medio con un pH de 8 y 9 se utilizaron 4,9 g de agar cromogénico disueltos en 100 ml de agua destilada. Se midió el pH de la solución con un multiparámetro (Tri meter 3 en 1) y se ajustó el pH añadiendo bicarbonato de sodio hasta alcanzar los valores deseados. El mismo procedimiento se empleó para ajustar el medio a un pH de 9. Para preparar el medio con un pH de 6, se utilizó Soya Peptona (marca HIMEDIA), mezclando 2 g del medio en 100 ml de agua destilada y ajustando el pH con ácido clorhídrico al 1 % y la ayuda del multiparámetro hasta alcanzar el valor deseado. Una vez preparado los medios con los diferentes pH, se esterilizaron en autoclave a 120 PSI durante 15 minutos. Luego, el medio con pH 8 y 9 se vertió en placas, mientras que el medio con pH 6 se lo distribuyó en tubos de ensayo de 10 ml. Las bacterias se sembraron en los diferentes medios y se incubaron a 30 °C durante 24 horas. Finalmente, se observó la presencia o ausencia de crecimiento.

Inhibición de *Vibrio* spp.

Para esta prueba de sensibilidad se utilizó agar Mueller Hinton (Marca Scharlau). Se pesaron 3,9 g del agar, 1% NaCl y se disolvió en 100 ml de agua destilada. La mezcla se esterilizó en autoclave a 120 PSI durante 15 minutos y luego se colocó en placas

petri. Para ver el efecto inhibitorio se empleó cepas de *Vibrios* totales aislados previamente de camarones con una concentración 10^8 UFC/ml (0.5 Macfarland). Se usó una varilla digrasky estéril para extender la bacteria por toda la superficie de

la placa. Luego con un asa bacteriológica estéril, se tomó cada cepa de *Bacillus* y se colocaron sobre la placa previamente inoculada con el patógeno y se incubaron a 30 °C durante 48 horas, para observar la formación de halos de inhibición.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio, se aislaron un total de ocho cepas bacterianas del ecosistema de manglar, identificadas mediante caracterización morfológicas y crecimiento en el medio cromogénico. Este medio de cultivo permitió observar características distintivas en la morfología de las colonias y coloración, lo que facilitó identificar a las bacterias. Las pruebas complementarias permitieron una evaluación exhaustiva de las bacterias, abarcando su actividad metabólica, capacidad de esporulación, y respuesta a diversas condiciones ambientales, entre otros aspectos relevantes.

Características morfológicas de las colonias de *Bacillus* aisladas

La Tabla 1 presenta figuras del crecimiento de las distintas cepas de *Bacillus* en placas de agar cromogénico. Además, detalla las características morfológicas de las colonias, facilitando su identificación y diferenciación, y proporciona una base sólida para comprender sus rasgos distintivos. La Tabla 1, fila a, presenta la cepa identificada como *B. thuringiensis* (Bt), la cual guarda una estrecha relación con *B. cereus* y *B. mycoides* (El-Arabi & Griffiths, 2021), lo que puede generar confusión en su identificación en medios cromogénicos. Sin embargo, *B. thuringiensis* se distingue por presentar bordes irregulares, a diferencia de *B. cereus*, que exhibe bordes redondeados bien definidos, según lo descrito en el manual del producto. Las características macroscópicas observadas en la Tabla 1, fila a, coinciden con las descritas en dicho manual. Además, la apariencia de las colonias es similar a la cepa aislada por Bahuguna et al. (2020), quienes emplearon el mismo medio cromogénico utilizado en este estudio y confirmaron la identidad de la cepa mediante análisis de 16S rRNA, RAPD-PCR, PCR específica para *B. thuringiensis* y tinción de proteínas cristalinas. Así mismo, Roy et al. (2022) aislaron esta cepa utilizando un medio cromogénico y confirmo su identidad por PCR multiplex como *B. thuringiensis*.

La Tabla 1, fila b, presenta la cepa identificada como *B. coagulans* (Bc), cuyas características macroscópicas coinciden con las descritas en el manual del medio cromogénico utilizado y en los estudios de Alippi & Abrahamovich (2019). Además, la figura de la fila b refleja la apariencia del aislado en medio cromogénico de la misma cepa, obtenida en trabajos previos de Roy et al. (2022) y Alippi (2019), quienes confirmaron la identidad de la cepa mediante secuenciación de 16S rRNA.

La Tabla 1, fila c, presenta la cepa identificada como *B. megaterium* (Bm), cuya apariencia es similar a la de los aislados en placa con medio cromogénico reportados por Roy et al. (2022) y Alippi (2019), quienes confirmaron su identidad mediante

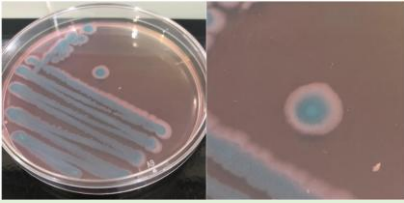
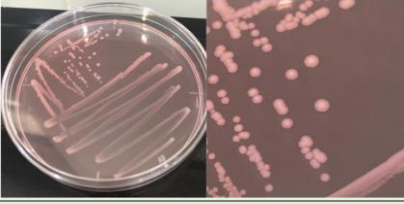


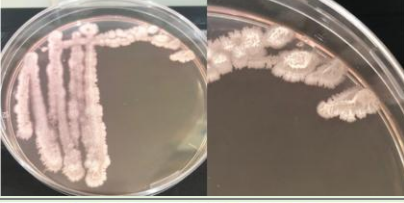
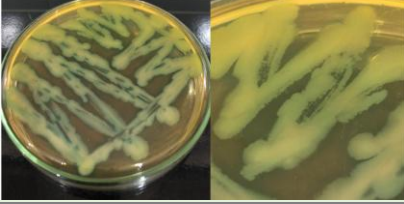
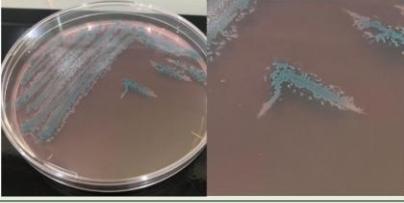

secuenciación de 16S rRNA. Las características macroscópicas de esta cepa coinciden con las descritas en el manual del medio cromogénico y con las observadas por Alippi & Abrahamovich (2019). En cuanto a las características microscópicas, las mediciones del tamaño bacteriano obtenidas en nuestro estudio coinciden con las de Sura & Hiremath (2019).

La Tabla 1, fila d, presenta la cepa identificada como *B. cereus* (Bce), cuyas características coinciden con las descritas en el manual del producto cromogénico y con las reportadas por Alippi & Abrahamovich (2019) y Constanza et al. (2014). Además, la apariencia de las colonias mostradas en esta fila coincide con la del aislado en placa realizado por Alippi (2019), quien confirmo la identidad de esta bacteria mediante secuenciación 16S rRNA.

La Tabla 1, fila e, presenta la cepa identificada como *B. velezensis* (Bv), cuya apariencia coincide con la reportada por Bahuguna et al. (2020), quienes aislaron esta cepa utilizando el mismo medio cromogénico que se empleó en nuestro estudio. Las características observadas por Bahuguna et al. (2020), Devi et al. (2019) y Ruiz-García et al. (2005), como colonias de color blanco, irregulares con forma arrugada, coinciden con las reportadas en nuestro trabajo. Bahuguna et al. (2020) confirmaron la identidad de esta cepa mediante secuenciación 16S rRNA, consolidando su identificación como *B. velezensis*.

La Tabla 1, fila f, presenta la cepa identificada como *B. licheniformis* (Bl), cuyas características coinciden con las descritas por Alippi & Abrahamovich (2019) y Bahuguna et al. (2020). Estos autores aislaron esta bacteria utilizando medio cromogénico, la caracterizaron y confirmaron su identidad mediante secuenciación 16S rRNA. Las características observadas en nuestro estudio, junto con la pigmentación amarilla del medio, coinciden con las reportadas por estos autores. En cuanto a la apariencia, esta cepa comparte similitudes con el aislado cultivado en medio cromogénico por Bahuguna et al. (2020). La Tabla 1, fila g, presenta la cepa identificada como *B. mycoides* (Bmy), la cual no ha sido previamente caracterizada en estudios que utilicen medio cromogénico ni descrita en el manual del producto. Sin embargo, al inocular la cepa en otro tipo de medio, se pudo identificar como *B. mycoides* debido a la forma rizoide de las colonias (Fig. 2), una característica común en esta cepa (Órdenes-Aenishanslins et al., 2014). Además, la coloración azulada observada en la cepa (figura de la Tabla 1, fila g) podría atribuirse a su estrecha relación con el grupo *B. cereus* (El-Arabi & Griffiths, 2021; Kumari & Sarkar, 2016).

Tabla 1
Representación visual y características de las colonias de *Bacillus* aisladas

ID	Figura	Características macroscópicas	Características microscópicas
a)		Color: Azul claro Forma: Irregular Margen: Irregular Altura: Plana Apariencia de la superficie: Lisa	Forma: Bastón Tamaño de la bacteria: 0,75-0,8 x 2-2,5 micras
b)		Color: Rosa Forma: Circular Margen: Entero Altura: Convexa Apariencia de la superficie: Lisa mucoide	Forma: Cocobacillus Tamaño de la bacteria: 0,5-0,6 x 0,65-1 micras
c)		Color: Amarillo Forma: Circular Margen: Entero Altura: Convexa Apariencia de la superficie: Lisa mucoide	Forma: Bastón Tamaño de la bacteria: 0,8- 0,9 x 3,5-4 micras
d)		Color: Azul oscuro Forma: Circular Margen: Entero Altura: Convexa Apariencia de la superficie: Lisa	Forma: Bacillus Tamaño de la bacteria: 0,70-0,75 x 1-1,5 micras
e)		Color: Blanco Forma: Irregular Margen: Irregular Altura: Elevada Apariencia de la superficie: Arrugada	Forma: Cocobacillus Tamaño de la bacteria: 0,55-0,6 x 1,5-2 micras
f)		Color: Verde Forma: Irregular Margen: Ondulados Altura: Plana Apariencia de la superficie: Lisa	Forma: Bastón Tamaño de la bacteria: 0,6-0,7 x 1,5-2,5 micras
g)		Color: Azul oscuro Forma: Rizoide Margen: Rizoide Altura: Plana Apariencia de la superficie: Lisa	Forma: Bastón Tamaño de la bacteria: 0,45-0,5 x 1-1,5 micras
h)		Color: Blanco en los bordes de la parte superior, con tonalidades anaranjadas en la base y en el centro de la colonia. Forma: Irregular Margen: Ondulados Altura: Umbonada Apariencia de la superficie: Rugosa	Forma: Bastón Tamaño de la bacteria: 0,5-0,6 x 1,5-2,5 micras

Nota: a): *Bacillus thuringiensis*, b): *Bacillus coagulans*, c): *Bacillus megaterium*, d): *Bacillus cereus*, e): *Bacillus velezensis*, f): *Bacillus licheniformis*, g): *Bacillus mycoides* y h): *Bacillus amyloliquefaciens*.



Figura 2. Apariencia de *B. mycoides* cultivado en un medio diferente.

La Tabla 1, fila h, presenta la cepa identificada como *B. amyloliquefaciens* (Ba), cuyas características y apariencia coinciden con las reportadas en los estudios de Alippi (2019) y Alippi & Abrahamovich (2019). En ambos estudios, se realizó análisis de secuenciación 16S rRNA para confirmar la identificación de la cepa.

Resultados de las pruebas realizadas

Todas las cepas son Gram positiva, presentaron esporas, fueron catalasa positiva, hidrolizan gelatina, son móviles, forman biofilm y crecen a pH 6 y 8. No obstante, solo Bt, Bc, Bv y Ba lograron crecer a pH 9. En cuanto a la salinidad, todas las cepas crecieron al 0% de salinidad, mientras que Bm, Bce, Bv, Bl y Ba lograron crecer al 7%. Respecto a la prueba de inhibición de *Vibrio* solo las cepas Bv, Bl y Ba mostraron capacidad para inhibir su crecimiento.

Los resultados obtenidos para *Bacillus thuringiensis* (Bt) coinciden con los hallazgos de Romero et al. (2017). Se confirma que esta bacteria es Gram positiva, con capacidad para formar esporas ovaladas, cada una asociada con un cristal paraesporal. Además, presenta una reacción positiva en las pruebas de hidrólisis de gelatina y catalasa. Los resultados de la prueba de motilidad son consistentes con los reportados en Rodríguez (2011), dado que el microorganismo creció más allá del área de punción. En cuanto al crecimiento en diferentes valores de pH, nuestra cepa mostró un crecimiento adecuado en pH 6, 8 y 9. Estos hallazgos concuerdan parcialmente con los reportados por Carrera (2010), observando crecimiento en un rango de pH de 5,5-8,5, con pH óptimo entre 6,5 y 7,5. Respecto al crecimiento en diferentes concentraciones de NaCl, nuestra bacteria mostró crecimiento positivo en 0% de NaCl, pero no en 7%. Estos resultados coinciden parcialmente con lo reportado por Rodríguez (2011), quien observó crecimiento en concentraciones de hasta 5% de NaCl, pero no en 7%. Romero et al. (2017) también reporta crecimiento en concentraciones de 1% y 5% de NaCl, lo que refuerza la idea de que concentraciones superiores a 5% pueden inhibir el crecimiento. Asimismo, nuestra cepa presentó

actividad de formación de biopelículas. Este hallazgo coincide con lo reportado por Zhao et al. (2024), quien señala que *B. thuringiensis* tiene la capacidad de formar biopelículas. En relación con la capacidad de inhibir *Vibrio* spp., nuestros hallazgos difieren de los reportados en Masitoh et al. (2016), que indican un alto potencial antibacteriano contra este patógeno. Esta discrepancia podría atribuirse a las variaciones en las cepas de *Vibrio* spp. utilizadas en los métodos de ensayo. En nuestro estudio se empleó *Vibri*os totales mientras que en el estudio de referencia se utilizó *Vibrio harveyi*.

Los resultados de *Bacillus coagulans* (Bc) concuerdan con la literatura en varios aspectos, como su carácter Gram positivo, la capacidad de formar esporas, la catalasa y la motilidad positivas, y la capacidad de hidrolizar gelatina, lo cual está en línea con los estudios de Zhou et al. (2020), Yanting et al. (2022), Carrera (2023) y Uono (2019). Además, *B. coagulans* mostró crecimiento con pH de 6, 8 y 9, lo que sugiere una amplia tolerancia al pH, capaz de crecer en ambientes ligeramente ácidos y alcalinos. Estos resultados coinciden con los hallazgos de Yanting et al. (2022), quienes reportaron crecimiento en condiciones de pH tan bajo como 3, y con Medda & Chandra (1980), quienes observaron un crecimiento óptimo en pH 8,5 aunque con una disminución de actividad en pH 9. Además, se observó crecimiento a NaCl 0%, pero no a 7%, lo que coincide con Medda & Chandra (1980), aunque difiere de Uono (2019), quien reportó crecimiento en medios con hasta 6,5% de NaCl. Por otro lado, nuestra cepa mostró formación de biofilm, pero no presentó actividad antimicrobiana contra *Vibri*os. Esto difiere parcialmente de lo reportado por Konuray & Erginkaya (2021), quienes describen la formación de biofilm y la actividad antimicrobiana en *B. coagulans*, aunque sin especificar su efectividad contra bacterias del género *Vibrio*. Además, no se han realizado estudios previos que evalúen su actividad antimicrobiana contra este género. Estas variaciones podrían reflejar la diversidad genotípica de *B. coagulans*.

Los resultados obtenidos en este estudio para *Bacillus megaterium* (Bm) muestran una concordancia general con los reportados por Sura & Hiremath (2019) y Sosa et al. (2011). Coincidimos en que la bacteria es Gram positiva y presenta esporas. La actividad catalasa fue positiva en ambos estudios, lo que refuerza la identidad de la cepa. La hidrólisis de gelatina fue parcial, ya que la cepa logró hidrolizar solo una parte de la gelatina, dejando el resto sin hidrolizar; esto podría haber sucedido debido a que la cepa presenta una capacidad enzimática lenta para hidrolizar la gelatina. El crecimiento en concentraciones de NaCl al 7% fue consistente tanto en nuestro estudio como en el de Sosa et al. (2011). En cuanto a la motilidad, obtuvimos resultados positivos que son similares a los reportados por Sura & Hiremath (2019). También se obtuvo presencia de Biofilm, lo cual coincide con Komunikasi et al. (2021). Por último, la cepa *Bacillus megaterium* no mostró una capacidad inhibitoria significativa contra *Vibri*os.

Sin embargo, Viet Cuong et al. (2014) reportó que *B. megaterium* si exhiben actividad antimicrobiana contra este patógeno. Esta discrepancia podría deberse a la variabilidad genética entre las cepas, que puede influir en la producción de metabolitos antimicrobianos.

Los resultados obtenidos para *Bacillus cereus* (Bce) corroboran los datos reportados por Pérez (2012), confirmando que se trata de un bacilo Gram positivo, formador de esporas, con motilidad y catalasa positivas, con capacidad para hidrolizar gelatina. Estos hallazgos son consistentes con la caracterización observada en este estudio. En cuanto al rango de pH, *B. cereus* exhibe un crecimiento óptimo en pH de 6 y 8, pero no en 9, lo cual concuerda parcialmente con los datos reportados por King et al. (2007), quienes indicaron que crecen en un rango de pH de 5 a 8,8.

Respecto a la tolerancia a NaCl, la cepa mostró un crecimiento óptimo en condiciones de 0 y 7% NaCl. Este resultado es consistente con los datos de Portales (2020), quienes también encontraron que *B. cereus* crece adecuadamente en ausencia de sal, pero presenta una tolerancia limitada a concentraciones superiores al 7% NaCl. En cuanto a la formación de biofilm, nuestra cepa mostró capacidad para formar biofilm, lo que coincide con los hallazgos de Wijman et al. (2007), quienes reportaron que *B. cereus* puede formar biofilms. Y con respecto a la capacidad de la cepa para inhibir *Vibrios*, estos resultados difieren de los reportados por Masitoh et al. (2016), que señala que la cepa posee un potencial antibacteriano significativo contra bacterias de este género. Las diferencias observadas podrían atribuirse al uso de distintas cepas de *Vibrio* spp. en nuestro estudio. En el trabajo referenciado se empleó *Vibrio harveyi*, mientras que en el presente estudio se utilizó *Vibrios* totales.

Los resultados obtenidos para *Bacillus velezensis* (Bv) son coherentes con estudios previos, ya que la cepa mostró ser Gram positiva, catalasa positiva, formadora de esporas, motilidad positiva y capaz de hidrolizar gelatina (Ruiz-García et al., 2005). Además, presentó crecimiento a concentraciones de NaCl de 0% y 7%, así como valores de pH 6, 8 y 9, lo cual es consistente con lo reportado por Li et al. (2020), quienes observaron que esta especie puede crecer en concentraciones de NaCl cercanas al 0% y superiores al 6% y en un rango de pH de 5 a 9, aunque con un crecimiento más lento. Asimismo, nuestra cepa mostró actividad antibacteriana y formación de biopelículas, coincidiendo con los hallazgos de Rabbee et al. (2019) y Devi et al. (2019). Por último, se confirmó la inhibición de *Vibrio* spp., lo que respalda el potencial antimicrobiano de *B. velezensis*, con lo documentado por Li et al. (2020).

Los resultados obtenidos para *Bacillus licheniformis* (Bl) coinciden en gran medida con estudios previos, confirmando su carácter Gram positivo, catalasa y motilidad positivas, capacidad para formar esporas, la hidrolisis positiva de gelatina (Sosa et al., 2011; Vivas et al., 2008). La cepa mostró crecimiento en valores de pH de 6 y 8, pero no a pH 9. Estos resultados coinciden parcialmente con los

reportados por Rosabal et al. (2021), quienes mencionan que el crecimiento aumenta con el pH. Sin embargo, en nuestro estudio, el crecimiento se detuvo a pH 9, lo que sugiere una limitación en condiciones más alcalinas. Además, la cepa presentó tolerancia a concentraciones de NaCl de 7% (Sosa et al., 2011; Vivas et al., 2008), y también a 0%, aunque el crecimiento en 0% de NaCl no ha sido reportado previamente. Este crecimiento en ausencia de sal es una observación inesperada, dado que en los manglares la salinidad suele ser alta. Asimismo, se observó formación de biofilm y actividad antimicrobiana contra *Vibrios*, resultados que coinciden con los hallazgos de Shleeva et al. (2023). Esto refuerza el potencial de la cepa para el control biológico de patógenos en ambientes acuáticos.

Los resultados obtenidos para *Bacillus mycoides* (Bmy) coinciden con los resultados por Najafi et al. (2010), confirmando que esta bacteria es Gram positiva, catalasa positiva, motilidad positiva y con capacidad para formar esporas e hidrolizar gelatina. Con relación al crecimiento a diferente salinidad, nuestros datos revelan que la bacteria creció en concentración de NaCl del 0%, pero no en 7%. Estos resultados contrastan parcialmente con los hallazgos de Ali et al. (2022), quienes indicaron que *B. mycoides* puede tolerar y mostrar crecimiento significativo en concentraciones de NaCl del 0% hasta 3%. La ausencia de crecimiento en 7% de NaCl en nuestro estudio podría deberse a que *B. mycoides* no tolera concentraciones tan altas de sal, lo que es consistente con el rango de tolerancia reportado por Ali et al. (2022). Además, nuestro estudio mostró la formación de biopelículas, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Ali et al. (2022). Y en cuanto a la inhibición de *Vibrios*, Ambas et al. (2013) indican que esta cepa posee propiedades antibacterianas contra el género *Vibrio*. Sin embargo, nuestros resultados muestran que *B. mycoides* no exhibe actividad antibacteriana contra este patógeno, lo que puede deberse a la variabilidad genética que existe en las bacterias.

Los resultados obtenidos para *Bacillus amyloliquefaciens* (Ba) son similares con estudios previos. Esta bacteria se presenta como Gram positiva, formadora de esporas, catalasa positiva, motilidad positiva y también presenta la capacidad de hidrolizar gelatina Guillén-Cruz et al. (2006). En nuestros resultados, la bacteria mostró un crecimiento óptimo en pH entre 6, 8 y 9 y en concentraciones de NaCl de 0% y 7%. Estos hallazgos concuerdan con los reportados por Montor-Antonio et al. (2014), quienes observaron un crecimiento en un intervalo de 1-11,5 sugiriendo que la cepa estudiada puede sobrevivir y desarrollarse en un amplio rango de pH. En cuanto al crecimiento en diferentes salinidades se reporta un crecimiento en concentraciones de hasta 7% de NaCl, pero con una rápida disminución del crecimiento después del 3% de NaCl, cuyos datos también se confirman con Afrin & Bhuiyan (2023). Además, esta cepa bacteriana mostró una notable actividad antibacteriana y capacidad para formar biopelículas, lo cual concuerda con los

resultados de Ley-López et al. (2021). La capacidad de nuestra cepa para inhibir *Vibrio* spp. coincide con los resultados reportados por Afrin & Bhuiyan (2023), indicando un amplio espectro de actividad antimicrobiana frente a patógenos del género *Vibrio* spp. Estos hallazgos resaltan el potencial de esta cepa para aplicaciones en la prevención y control de infecciones asociadas con estos microorganismos patógenos.

Todas las características observadas desempeñan un papel crucial en el ecosistema de manglar. Por ejemplo, la prueba de Shaeffer-Fulton permitió identificar la presencia de esporas en las bacterias aisladas, estas permiten a las cepas dispersarse y sobrevivir en condiciones desfavorables, como la falta de nutrientes o factores climáticos extremos, manteniéndose viables por largos periodos de tiempo (Mawarda et al., 2022). La enzima catalasa, con sus propiedades antioxidantes, protege a las bacterias contra el estrés oxidativo y puede ayudar a las plantas del manglar a tolerar cambios bruscos de salinidad y pH, factores comunes en estos ecosistemas (Saeed et al., 2023). La capacidad de

producir proteasas, evidenciada a través de la hidrólisis de gelatina, es crucial para descomponer materia orgánica en los sedimentos, facilitando el reciclaje de nutrientes y fomentando interacciones ecológicas importantes (Afrin et al., 2024). Por su parte, las bacterias que inhiben el crecimiento de *Vibrios* pueden actuar como controladores biológicos en el manglar, limitando la proliferación de patógenos peligrosos para la fauna acuática y manteniendo el equilibrio del ecosistema (Chen et al., 2024). La capacidad de crecer bajo diferentes niveles de salinidad y pH refleja su adaptación a las condiciones extremas del manglar, permitiéndoles participar en procesos como la descomposición de materia orgánica y la biorremediación de contaminantes. Además, la formación de biopelículas, estructuras extracelulares que protegen a las bacterias de la radiación UV y de la acidez, contribuye a su resistencia frente a las fluctuaciones ambientales, favoreciendo su supervivencia y manteniendo la funcionalidad del ecosistema (Tran et al., 2022).

CONCLUSIONES

Este estudio proporciona avances significativos en la comprensión del género *Bacillus* en ecosistemas de manglar. Los resultados destacan la adaptabilidad de estas bacterias a condiciones ambientales extremas, subrayando la importancia de los manglares como hábitats para microorganismos con potencial biotecnológico. El uso del medio cromogénico ha demostrado ser una herramienta eficaz para la identificación de *Bacillus*, lo que abre nuevas oportunidades para su aplicación.

Futuras investigaciones podrían centrarse en ampliar el conocimiento sobre la interacción de estas bacterias con su entorno y otros microorganismos, así como explorar su aplicación biotecnológica en diversos sectores productivos, abriendo nuevas posibilidades en el aprovechamiento de la biodiversidad microbiana de los manglares.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi más sincero agradecimiento a la Ing. Acuar. Angie Cueva por su valioso apoyo y colaboración durante el proceso de experimentación de este trabajo. Su

compromiso y disposición fueron fundamentales para el desarrollo de este artículo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afrin, S., & Bhuiyan, M. N. I. (2023). Antagonistic activity of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* against multidrug resistant *Serratia rubidaea*. *Current Research in Microbial Sciences*, 5, 100206. <https://doi.org/10.1016/J.CRMICR.2023.100206>
- Afrin, S., Tamanna, T., Shahajadi, U. F., Bhowmik, B., Jui, A. H., Miah, Md. A. S., & Bhuiyan, M. N. I. (2024). Characterization of protease-producing bacteria from garden soil and antagonistic activity against pathogenic bacteria. *The Microbe*, 4, 100123. <https://doi.org/10.1016/J.MICROB.2024.100123>
- Ali, B., Wang, X., Saleem, M. H., Azeem, M. A., Afridi, M. S., Nadeem, M., Ghazal, M., Batool, T., Qayyum, A., Alatawi, A., & Ali, S. (2022). *Bacillus mycoides* PM35 Reinforces Photosynthetic Efficiency, Antioxidant Defense, Expression of Stress-Responsive Genes, and Ameliorates the Effects of Salinity Stress in Maize. *Life*, 12(2), 219. <https://doi.org/10.3390/LIFE12020219/S1>
- Ali, M. A. M., Musa, R., Ali, A. A., Ali, Y., & Hamadnalla, H. M. Y. (2020). Isolation and Identification of Bacteria From Dried Fermented Leaves of *Cassia obtusifolia* L. (Kawal). *Clinical Medicine and Medical Research*, 1(1), 16–20. <http://clinicalmedicine.in/index.php/cmmr/article/view/6>
- Alippi, A. M. (2019). Data associated with the characterization and presumptive identification of *Bacillus* and related species isolated from honey samples by using HiCrome Bacillus agar. *Data in Brief*, 25, 104206. <https://doi.org/10.1016/J.DIB.2019.104206>
- Alippi, A. M., & Abrahamovich, E. (2019). HiCrome Bacillus agar for presumptive identification of *Bacillus* and related species isolated from honey samples. *International Journal of Food Microbiology*, 305, 108245. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2019.108245>
- Alyousif, N. A. (2022). Distribution, occurrence and molecular characterization of *Bacillus* related species isolated from different soil in Basrah Province, Iraq. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 23(2), 679–686. <https://doi.org/10.13057/BIODIV/D230209>
- Ambas, I., Suriawan, A., & Fotedar, R. (2013). Immunological responses of customised probiotics-fed marron, *Cherax tenuimanus*, (Smith 1912) when challenged with *Vibrio mimicus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(2), 262–270. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2013.04.026>
- Bahuguna, A., Joe, A.-R., Kumar, V., Lee, J. S., Kim, S.-Y., Moon, J.-Y., Cho, S.-K., Cho, H., & Kim, M. (2020). Study on the Identification Methods for Effective Microorganisms in Commercially Available Organic Agriculture Materials. *Microorganisms*, 8(10), 1568. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8101568>
- Baskaran, V., Mahalakshmi, A., & Prabavathy, V. R. (2023). Mangroves: A hotspot for novel bacterial and archaeal diversity. *Rhizosphere*, 27, 100748. <https://doi.org/10.1016/J.RHISPH.2023.100748>
- Carrera, M. de L. (2010). Producción de *Bacillus thuringiensis*, Berliner a Nivel de Laboratorio [Tesis para la obtención del título de Doctora en Bioquímica Farmacia, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo].
- Carrera, R. (2023). Aislamiento e identificación bioquímica de una cepa bacteriana para su aplicación en el tratamiento de agua residual [Universidad Autónoma del Estado de Morelos].

- Carvajal-Oses, M., Herrera-Ulloa, A., Valdés-Rodríguez, B., & Campos-Rodríguez, R. (2019). Manglares y sus Servicios Ecosistémicos: hacia un Desarrollo Sostenible. *Gestión y Ambiente*, 22(2), 277–290. <https://doi.org/10.15446/ga.v22n2.80639>
- Castro, R. A., Quecine, M. C., Lacava, P. T., Batista, B. D., Luvizotto, D. M., Marcon, J., Ferreira, A., Melo, I. S., & Azevedo, J. L. (2014). Isolation and enzyme bioprospection of endophytic bacteria associated with plants of Brazilian mangrove ecosystem. *SpringerPlus*, 3(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-382>
- Chen, Y. A., Chiu, W. C., Wang, T. Y., Wong, H. C., & Tang, C. T. (2024). Isolation and characterization of an antimicrobial *Bacillus subtilis* strain O-741 against *Vibrio parahaemolyticus*. *PLOS ONE*, 19(4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0299015>
- Constanza, L., Ramírez, C., Consuelo, L., Leal, S., Yurieth, Z., Galvez, A., Estefanía, V., & Burbano, M. (2014). *Bacillus*: género bacteriano que demuestra ser un importante solubilizador de fosfato. *Nova*, 12(22), 165–178.
- Dame, Z. T., Rahman, M., & Islam, T. (2021). Bacilli as sources of agrobiotechnology: recent advances and future directions. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 14(2), 246–271. <https://doi.org/10.1080/17518253.2021.1905080>
- Devi, S., Kiesewalter, H. T., Kovács, R., Frisvad, J. C., Weber, T., Larsen, T. O., Kovács, Á. T., & Ding, L. (2019). Depiction of secondary metabolites and antifungal activity of *Bacillus velezensis* DTU001. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 4(3), 142–149. <https://doi.org/10.1016/J.SYNBIO.2019.08.002>
- El-Arabi, T. F., & Griffiths, M. W. (2021). *Bacillus cereus*. In *Foodborne Infections and Intoxications* (pp. 431–437). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819519-2.00011-6>
- García-Martínez, Y. A., Heredia, G., Guzmán-Guillermo, J., Valenzuela, R., & Raymundo, T. (2021). Hongos asociados al mangle rojo *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae) en la Reserva de la Biosfera Isla Cozumel, Quintana Roo, México. *Acta Botánica Mexicana*, 128, 1–27. <https://doi.org/10.21829/ABM128.2021.1792>
- Granja, B. M., Fidelis, C. E., Garcia, B. L. N., & dos Santos, M. V. (2021). Evaluation of chromogenic culture media for rapid identification of microorganisms isolated from cows with clinical and subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 104(8), 9115–9129. <https://doi.org/10.3168/JDS.2020-19513>
- Guillén-Cruz, R., Hernández-Castillo, F., Gallegos-Morales, G., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar-González, C., Padrón-Corral, E., & Reyes-Valdés, M. (2006). *Bacillus* spp. como Biocontrol en un Suelo Infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian y su Efecto en el Desarrollo y Rendimiento del Cultivo de Chile (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(2), 105–114.
- Harwood, C. R. (1989). *Bacillus* (C. R. Harwood, Ed.; BTHA, Vol. 2). Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4899-3502-1>
- Jackman, J. (2012). The Microbe: The Basics of Structure, Morphology, and Physiology as They Relate to Microbial Characterization and Attribution. In *Chemical and Physical Signatures for Microbial Forensics* (pp. 13–34). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-219-3_2
- Jurado, H., Fajardo, I., & Parreño, J. (2021). *Procedimientos de laboratorio de Microbiología Zootécnica* (1ª ed.).
- King, N. J., Whyte, R., & Hudson, J. A. (2007). Presence and Significance of *Bacillus cereus* in Dehydrated Potato Products. *Journal of Food Protection*, 70(2), 514–520. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.2.514>
- Komunikasi, M., Pengembangan, D., Lingkungan, T., Ramadhani, A. N., Harimawan, A., & Devianto, H. (2021). Biofilm Formation and Bio Corrosion of Carbon Steel in Diesel-Biodiesel Storage Tank. *Jurnal Presipitasi: Media Komunikasi Dan Pengembangan Teknik Lingkungan*, 18(1), 45–55. <https://doi.org/10.14710/PRESIPITASI.V18I1.45-55>
- Konuray, G., & Erginkaya, Z. (2021). Identification and characterization of *Bacillus coagulans* strains for probiotic activity and safety. *LWT*, 151, 112233. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.112233>
- Kumari, S., & Sarkar, P. K. (2016). *Bacillus cereus* hazard and control in industrial dairy processing environment. *Food Control*, 69, 20–29. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2016.04.012>
- Leena Sankari, S., Mahalakshmi, K., & Naveen Kumar, V. (2019). Chromogenic medium versus PCR-RFLP in the speciation of *Candida*: A comparative study. *BMC Research Notes*, 12(1), 1–4. <https://doi.org/10.1186/S13104-019-4710-5>
- Ley-López, N., Heredia, J., San Martín-Hernández, C., Ibarra-Rodríguez, J., & García-Estrada, S. (2021). Modified Staining for observation of flagella in *Bacillus amyloliquefaciens* by optical microscopy. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 24(2). <https://doi.org/10.56369/taes.3508>
- Li, X., Gao, X., Zhang, S., Jiang, Z., Yang, H., Liu, X. D., Jiang, Q., & Zhang, X. (2020). Characterization of a *Bacillus velezensis* with antibacterial activity and inhibitory effect on common aquatic pathogens. *Aquaculture*, 523, 735165. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2020.735165>
- Masitoh, M. M., Hariati, A. M., & Fadjar, M. (2016). Antimicrobial Activity of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* on Pathogenic *Vibrio harveyi* in *Litopenaeus vannamei*. *Journal Homepage: J. Life Sci. Biomed*, 6(1), 10–14.
- Mawarda, P. C., Mallon, C. A., Le Roux, X., van Elsland, J. D., & Salles, J. F. (2022). Interactions between Bacterial Inoculants and Native Soil Bacterial Community: The Case of Spore-forming *Bacillus* spp. *FEMS Microbiology Ecology*, 98(12), 1–11. <https://doi.org/10.1093/FEMSEC/FIAC127>
- Medda, S., & Chandra, A. K. (1980). New Strains of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus coagulans* producing Thermostable α -Amylase Active at Alkaline pH. *Journal of Applied Bacteriology*, 48(1), 47–58. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.1980.TB05205.X>
- Montor-Antonio, J. J., Olvera-Carranza, C., Reyes-Duarte, D., Sachman-Ruiz, B., Ramírez-Coutiño, L., & Del Moral, S. (2014). Caracterización bioquímica de Amij33, una amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* aislada de suelos cultivados con caña de azúcar en la región del Papaloapan. *Nova Scientia*, 6(12), 39–59.
- Najafi, A. R., Rahimpour, M. R., Jahanmiri, A. H., Roostaazad, R., Arabian, D., & Ghobadi, Z. (2010). Enhancing biosurfactant production from an indigenous strain of *Bacillus mycoides* by optimizing the growth conditions using a response surface methodology. *Chemical Engineering Journal*, 163(3), 188–194. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2010.06.044>
- Órdenes-Aenishanslins, N. A., Saona, L. A., Durán-Toro, V. M., Monrás, J. P., Bravo, D. M., & Pérez-Donoso, J. M. (2014). Use of titanium dioxide nanoparticles biosynthesized by *Bacillus mycoides* in quantum dot sensitized solar cells. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S12934-014-0090-7>
- Pérez, I. (2012). *Bacillus cereus* y su papel en las intoxicaciones alimentarias. *Revista Cubana de Salud Pública*, 38(1), 98–108.
- Portales, S. (2020). Calidad Microbiológica del pan: *Bacillus cereus* [Universidad de Valladolid. Facultad de Medicina].
- Rabbee, M. F., Sarafat, M., Choi, J., Hwang, B. S., Jeong, S. C., & Baek, K. hyun. (2019). *Bacillus velezensis*: A Valuable Member of Bioactive Molecules within Plant Microbiomes. *Molecules* 2019, Vol. 24, Page 1046, 24(6), 1046. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24061046>
- Rodríguez, R. (2011). Evaluación de lactonasas producidas por *Bacillus Thuringiensis* subsp. *Kurstaki* como reductor en la formación de biopelícula generada a partir de diferentes tipos de lodos de aguas residuales [Tesis para la obtención del título de Ingeniera Química, Universidad de los Andes].
- Rojas-Badía, M. M., Bello-González, M. A., Ríos-Rocafull, Y., Lugo-Moya, D., & Rodríguez-Sánchez, J. (2020). Utilización de cepas de *Bacillus* como promotores de crecimiento en hortalizas comerciales. *Acta Agronómica*, 69(1), 54–60. <https://doi.org/10.15446/ACAG.V69N1.79606>
- Romero, J., Canales, E., Meneses, P., & Herbozo, S. (2017). Aislamiento e identificación de *Bacillus Thuringiensis* en cultivos de plátano, para la producción de bioinsecticidas. *Big Bang Faustiniiano*, 6(1). <https://doi.org/10.51431/BBF.V6I1.48>
- Rosabal, D., Sola, M., & Pons, S. (2021). Efecto del pH en el crecimiento de *Bacillus* sp. en un medio con melaza de caña (Original). *Revista Granmense De Desarrollo Local*, 5(4), 252–261.
- Roy, S., Saha, A., Khan, S. I., Hasan, M. M., Karim, M. Z., Hoq, M. M., & Khan, S. N. (2022). Identification and Differentiation of Closely Related Members of *Bacillus cereus* group by Multiplex PCR. *Bangladesh Journal of Microbiology*, 39(1), 21–29. <https://doi.org/10.3329/BJMV.V39I1.64055>
- Ruiz-García, C., Béjar, V., Martínez-Checa, F., Llamas, I., & Quesada, E. (2005). *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1), 191–195. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.63310-0>
- Saeed, S. W. Z., Naseer, I., Zahir, Z. A., Hilger, T., Shahid, S., Iqbal, Z., & Ahmad, M. (2023). *Bacillus* Strains with Catalase Enzyme Improve the Physiology and Growth of Rice (*Oryza sativa* L.). *Stresses* 2023, Vol. 3, Pages 736-748, 3(4), 736–748. <https://doi.org/10.3390/STRESSES3040050>
- Sánchez, E. P., Núñez, D., Cruz, R. O., Torres, M. A., & Herrera, E. V. (2017). Simulación y Conteo de Unidades Formadoras de Colonias. *Revista Electrónica de Computación, Informática, Biomédica y Electrónica*, 6(1), 97–111. <https://doi.org/10.32870/RECIBE.V6I1.70>
- Shaban, A. D., Kadhim, K. F., Shaaban, A. D., & Lafta, S. J. (2024). Improving Fungal Product Yield through Fast, Eco-friendly, and Cost-effective Chrom Genic Media Technology. *Uttar Pradesh Journal of Zoology*, 45(17), 477–486. <https://doi.org/10.56557/UPJZ/2024/V45I174392>
- Shleeva, M. O., Kondratieva, D. A., & Kaprelyants, A. S. (2023). *Bacillus licheniformis*: A Producer of Antimicrobial Substances, including Antimycobacterials, Which Are Feasible for Medical Applications. *Pharmaceutics*, 15(7). <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS15071893>

- Soltani, M., Ghosh, K., Hoseinifar, S. H., Kumar, V., Lymbery, A. J., Roy, S., & Ringø, E. (2019). Genus *Bacillus*, promising probiotics in aquaculture: Aquatic animal origin, bio-active components, bioremediation and efficacy in fish and shellfish. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 27(3), 331–379. <https://doi.org/10.1080/23308249.2019.1597010>
- Sosa, A. I., Álvarez-Rivera, V. P., Torres, D., & Casadesús, L. (2011). Identificación y caracterización de seis aislados pertenecientes al género *Bacillus* promisorios para el control de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad*, 15(6), 39–44.
- Sura, N. K., & Hiremath, L. (2019). Isolation of *Bacillus megaterium* and its Commercial Importance. *International Journal of ChemTech Research*, 12(04), 30–36. <https://doi.org/10.20902/IJCTR.2019.120405>
- Thomas, D., Schütze, B., Heinze, W. M., & Steinmetz, Z. (2020). Sample Preparation Techniques for the Analysis of Microplastics in Soil—A Review. *Sustainability*, 12(21), 9074. <https://doi.org/10.3390/SU12219074>
- Tran, C., Cock, I. E., Chen, X., & Feng, Y. (2022). Antimicrobial *Bacillus*: Metabolites and Their Mode of Action. *Antibiotics*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS11010088/S1>
- Uono, M. T. (2019). Desenvolvimento tecnológico do *Bacillus coagulans* BVB5 como potencial cepa probiótica [Universidade de São Paulo]. <https://doi.org/10.11606/D.9.2019.TDE-07062019-171021>
- Viet Cuong, P., Thi Kim Cuc, N., Thi Quyen, V., Thanh Binh, P., Van Kiem, P., Hoai Nam, N., & Tien Dat, N. (2014). Antimicrobial Constituents from the *Bacillus megaterium* LC Isolated from Marine Sponge *Haliclona oculata*. *Natural Product Sciences*, 20(3), 202–205.
- Vivas, M., Martínez, M. S., García-Gil, F., & Salgado Brito, R. (2008). Identificación y caracterización de una bacteria degradadora de parafinas. *Revista de Investigación de La Universidad Simón Bolívar*, 7, 2.
- Wijman, J. G. E., De Leeuw, P. P. L. A., Moezelaar, R., Zwietering, M. H., & Abee, T. (2007). Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: Formation, sporulation, and dispersion. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(5), 1481–1488. <https://doi.org/10.1128/AEM.01781-06>
- Yanting, S., Yu, K., Yan, Z., Dongxuan, Z., Chang, L., Chuanzhou, B., Xiaojing, Z., Jing, B., & Hongxing, Q. (2022). Isolation, Identification and Stress Resistance Analysis of *Bacillus coagulans* from Chickens. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 49(11), 4187–4196. <https://doi.org/10.16431/J.CNKI.1671-7236.2022.11.009>
- Yilmaz, M., Soran, H., & Beyatli, Y. (2006). Antimicrobial activities of some *Bacillus* spp. strains isolated from the soil. *Microbiological Research*, 161(2), 127–131. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2005.07.001>
- Zhao, X., Höfte, M., Spanoghe, P., Rajkovic, A., & Uyttendaele, M. (2024). Biofilm-forming Ability of *Bacillus thuringiensis* Strains from Biopesticides on Polystyrene and their Attachment on Spinach. *Journal of Food Protection*, 87(8), 100321. <https://doi.org/10.1016/J.JFP.2024.100321>
- Zhou, Y., Zeng, Z., Xu, Y., Ying, J., Wang, B., Majeed, M., Majeed, S., Pande, A., & Li, W. (2020). Application of *Bacillus coagulans* in Animal Husbandry and Its Underlying Mechanisms. *Animals*, 10(3), 454. <https://doi.org/10.3390/ANI10030454>