



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

MAESTRÍA EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Tesis

Producción y caracterización parcial de metabolitos con actividad antimicrobiana, con potencial aplicación en la bioconservación de alimentos, mediante fermentaciones conducidas por bacterias *Xenorhabdus* spp.

**Para obtener el grado de
Maestro en Ciencia de los Alimentos**

P R E S E N T A

L. N. David Servando Macías Leon

Director

Dr. Norberto Chavarría Hernández

Comité tutorial

Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández

Dra. Ma. del Rocío López Cuellar

Tulancingo de Bravo, Hgo., México, 18 de enero del 2026



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias Agropecuarias

Institute of Agricultural Sciences

Área Académica de Ingeniería Agroindustrial e Ingeniería en Alimentos

Academic Area of Agroindustrial Engineering and Food Engineering

Asunto: Autorización de impresión de tesis

El Comité Tutorial de la Tesis titulada “Producción y caracterización parcial de metabolitos con actividad antimicrobiana, con potencial aplicación en la bioconservación de alimentos, mediante fermentaciones conducidas por bacterias *Xenorhabdus spp.*”, realizada por el sustentante David Servando Macias Leon con número de cuenta 146055 perteneciente al programa de Maestría en Ciencia de los Alimentos, una vez que ha revisado, analizado y evaluado el documento recepcional, y de acuerdo con lo estipulado en el Artículo 110 del Reglamento de Estudios de Posgrado, tiene a bien extender la presente:

AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

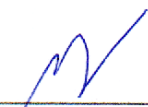
Por lo que el sustentante deberá cumplir los requisitos establecidos en el Reglamento de Estudios de Posgrado para la defensa oral en el examen de grado correspondiente.

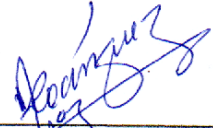
Atentamente

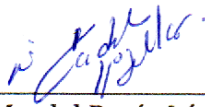
“Amor, Orden y Progreso”

Tulancingo de Bravo, Hidalgo, a 12 de enero de 2026

El Comité Tutorial

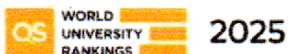

Dr. Norberto Chavarría
Hernández
Director


Dra. Adriana Inés
Rodríguez Hernández
Miembro del comité


Dra. Ma. del Rocío López
Cuellar
Miembro del comité



“Amor, Orden y Progreso”



Avenida Universidad #133, Col. San Miguel Huatengo.
C.P. 43775, Santiago Tulantepec de Lugo Guerrero,
Hidalgo, México
Teléfono 771 71 72000 Ext. 42068
maestria_alimentos@uaeh.edu.mx

uaeh.edu.mx

Dedicatoria

A mi Amanda, raíz y sostén, por la paciencia que acompaña, la fuerza que no se impone y la presencia que permanece cuando el camino se vuelve exigente. A mi hija, luz primera y horizonte constante, por transformar cada esfuerzo en sentido y cada meta en posibilidad.



Ciencia y Tecnología

Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación

Agradecimientos a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación por la beca otorgada para los estudios de maestría

Numero de solicitud rizoma: 652497e63f5df5214789b0cd

CVU: 1319005

Nomenclatura

$X_{\text{máx}}$, concentración máxima de biomasa; $\mu_{\text{máx}}$, velocidad específica máxima de crecimiento; OUR, tasa de consumo de oxígeno; mAU, mili unidades de absorbancia; DE, desviación estándar; MW, peso molecular; UFC, unidades formadoras de colonia; Xcn, xenocumacina; PAX, péptidos antimicrobianos de *Xenorhabdus*.

Índice general

Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Marco teórico	4
<i>Steinernema</i> spp.....	4
Ciclo de vida de <i>Steinernema</i> spp.....	4
<i>Xenorhabdus</i> spp.....	5
Diferenciación de fenotipo de bacterias del género <i>Xenorhabdus</i>	6
Metabolismo secundario en <i>Xenorhabdus</i>	6
Metabolitos con actividad antimicrobiana	7
Xenocumacinas.....	8
Péptidos PAX	9
Fermentación sumergida de <i>Xenorhabdus</i> spp.....	10
Justificación.....	13
Hipótesis.....	14
Objetivo general	15
Objetivos específicos	15
Materiales y Métodos	16
Microorganismos	16
Medios de cultivo	16
Fermentación de <i>X. nematophila</i>	16
Respirometría.....	17
Sobrenadante libre de células.....	17
Preparación de material para la separación de fases	17
Extracción líquido-líquido del fermento de <i>X. nematophila</i>	18
Concentración de la fase acuosa.....	18
Concentración de la fase orgánica.....	18
Cromatografía de permeación en gel.....	19
Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa	19
Cuantificación proteica	19
Placa Elisa.....	20
Prueba de inhibición por gota.....	20

Resultados y discusión.....	21
Cinética de crecimiento.....	21
Respirometría.....	23
Cuantificación de proteína.....	24
Cromatografía por filtración en gel.....	26
Placa Elisa.....	26
Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa.....	27
Inhibición por goteo.....	28
Conclusiones.....	31
Recomendaciones para trabajos futuros.....	31
Referencias.....	32
Anexos.....	39

Índice de Figuras

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Steinernema</i> spp.....	4
Figura 2. Larvas infectadas por <i>Steinernema carpocapsae</i> JAP 1.....	5
Figura 3. Separación de fases durante la extracción líquido-líquido	18
Figura 4. NanoDrop ND1000	19
Figura 5. Tinción Gram de <i>X. nematophila</i>	21
Figura 6. Cinética de crecimiento de <i>X. nematophila</i>	22
Figura 7. Tasa de respiración.....	23
Figura 8. Cromatogramas RP HPLC	28
Figura 9. Inhibición por gota	29

Índice de Tablas

Tabla 1. Metabolitos con actividad antimicrobiana producidos por <i>Xenorhabdus</i> spp.	8
Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria (μM) de xenocumacinas producidas por <i>Xenorhabdus nematophila</i>	9
Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria (μM) de pepitos PAX producidas por <i>Xenorhabdus nematophila</i>	10
Tabla 4. Condiciones frecuentemente usadas en fermentación de <i>Xenorhabdus</i> spp	10
Tabla 5. Recopilación de estudios de <i>Xenorhabdus</i> spp. de los últimos 5 años.....	11
Tabla 6. Cuantificación proteica del extracto acuoso de la fermentación de <i>Xenorhabdus nematophila</i>	24
Tabla 7. Cuantificación proteica del extracto orgánico de la fermentación de <i>Xenorhabdus nematophila</i>	25
Tabla 8. Cuantificación proteica de las fracciones obtenidas por cromatografía de permeación en gel.....	25
Tabla 9. Cuantificación proteica de las fracciones purificadas por RP HPLC	26
Tabla 10. Actividad antimicrobiana de las fracciones purificadas por RP HPLC.....	30

Resumen

Estudios anteriores han demostrado que las bacterias del género *Xenorhabdus* producen metabolitos con actividad antimicrobiana. En este trabajo se llevaron a cabo fermentaciones con un volumen de 30 mL a una temperatura de 28°C y 130 rpm en oscuridad por 72 horas. El medio de cultivo fue caldo de soya tripticasa adicionada con 0.5% p/v de extracto de levadura. La máxima tasa de crecimiento fue de 0.22 h⁻¹ y ocurrió a las 10 h, con una X_{máx} de 4.91 g/L (DE=0.25). La demanda de oxígeno (OUR) se encuentra en el rango de 10-100 mmol O₂ g⁻¹ h⁻¹. El sobrenadante libre de células de las 48 horas de fermentación fue el que presentó mayor actividad antimicrobiana contra los microorganismos evaluados. Posteriormente, la fracción acuosa se separó de la fracción orgánica utilizando acetato de etilo. La fracción acuosa, mostró mayor actividad antimicrobiana por lo que se procedió a su purificación la cual consistió de 2 etapas, en la primera etapa se concentró el sobrenadante libre de células de un volumen de 200 mL a 5 mL, el concentrado se colocó en una columna cromatográfica empacada con Bio-Gel P30, colectando 40 fracciones de 2 mL cada una, la velocidad de flujo fue de 0.66 mL/min. En la segunda etapa las fracciones que exhibieron mayor potencial antimicrobiano fueron purificadas usando RP HPLC. La fracción que eluyó entre el minuto 1.05 y 1.35, tuvo la mayor actividad antimicrobiana contra los microorganismos evaluados (*Listeria monocytogenes* CFQ-103, *Staphylococcus aureus* ATCC-25923, *Escherichia coli* ATCC-25922, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Candida parapsilosis*).

Abstract

Previous studies have shown that *Xenorhabdus* species produce metabolites with antimicrobial activity. In this work, fermentations were carried out in 30-mL cultures incubated at 28 °C and 130 rpm in darkness for 72 hours. The culture medium consisted of tryptic soy broth supplemented with 0.5% (w/v) yeast extract. The maximum growth rate was 0.22 h⁻¹, occurring at 10 hours, with an X_{max} of 4.91 g/L (SD = 0.25). The oxygen uptake rate (OUR) fell within the expected range of 10–100 mmol O₂ g⁻¹ h⁻¹.

The cell-free supernatant collected at 48 hours exhibited the strongest antimicrobial activity against the microorganisms tested. The aqueous phase was then separated from the organic phase using ethyl acetate. Because the aqueous fraction showed superior antimicrobial activity, it was selected for purification, which involved two stages. In the first stage, 200 mL of cell-free supernatant were concentrated to 5 mL and loaded onto a Bio-Gel P30 gel-filtration column. Forty fractions of 2 mL each were collected at a flow rate of 0.66 mL/min. In the second stage, the fractions with the highest antimicrobial potential were further purified by RP HPLC.

The fraction eluting between 1.05 and 1.35 minutes showed the greatest antimicrobial activity against the evaluated microorganisms (*Listeria monocytogenes* CFQ-103, *Staphylococcus aureus* ATCC-25923, *Escherichia coli* ATCC-25922, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Candida albicans* ATCC-10231, and *Candida parapsilosis*).

Introducción

La contaminación alimentaria ocurre cuando existe la presencia de cualquier materia ajena al alimento, lo que conlleva a la pérdida de su calidad, ya sea para el consumo humano o animal (Barreto et al., 2010). Relacionado con esto, se han descrito más de 250 tipos de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), las cuales pueden clasificarse en químicas, físicas o biológicas. Dentro de estas últimas se encuentran como causa una amplia variedad de bacterias que son las principales responsables de la transmisión de ETAs en los países en vías de desarrollo (Rosas, 2007).

Las ETAs se producen por la ingestión de alimentos o bebidas contaminadas con microorganismos patógenos que afectan, de forma individual o colectiva, la salud del consumidor (González Flores et al., 2005). Estas enfermedades se caracterizan, en su mayoría, por causar síntomas gastrointestinales como dolor abdominal, náuseas, vómito, diarrea y fiebre. Sin embargo, en algunos casos pueden presentarse complicaciones severas a causa de la infección, tales como sepsis, meningitis o incluso la muerte (Schneider et al., 2004; Bax et al., 1998).

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) del año 2024, cada año hasta 600 millones de personas en todo el mundo enferman por consumir alimentos contaminados, de las cuales aproximadamente 420,000 mueren a causa de ETAs. Además, la OMS reporta que, en los países de ingresos bajos y medianos, se pierden anualmente un aproximado de 110 000 millones de dólares en productividad y gastos médicos a causa de los alimentos insalubres.

Las características propias del alimento influyen en la facilidad con la que pueden ser invadidos por microorganismos patógenos asociados a ETAs (Rodríguez et al., 2011). Algunos autores señalan que la cantidad de proteína presente en el alimento incrementa el riesgo de crecimiento de microorganismos patógenos; por ejemplo, en alimentos como carne, huevo y pescado crudo. Otros investigadores, en cambio, asocian la actividad del agua como el principal factor determinante para el desarrollo microbiano en los alimentos (Chambers & DeLeo, 2009).

Entre las medidas sugeridas por el Programa Conjunto de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y de la OMS, para garantizar la inocuidad alimentaria se incluyen las buenas prácticas agrícolas, las buenas prácticas de higiene, y la aplicación del Codex Alimentarius, entre otras (Rodríguez et al., 2011). Sin embargo, dada la alta incidencia de ETAs a nivel mundial, es necesario desarrollar nuevos aditivos alimentarios antimicrobianos que complementen dichas buenas prácticas y contribuyan a reducir la incidencia de estas enfermedades.

Las bacterias *Xenorhabdus* spp., simbiotes de nemátodos del género *Steinernema*, producen metabolitos con actividad antimicrobiana contra bacterias Gram negativas, Gram positivas y otros microorganismos patógenos transmisibles por alimentos, por lo que tienen el potencial de ser utilizadas como agentes productores de antimicrobianos y ayudar a disminuir el número de personas afectadas por ETAs (Abd-Elgawad, 2022; Dreyer et al., 2018).

Marco teórico

Steinernema spp.

Los nemátodos entomopatógenos del género *Steinernema* coexisten de manera simbiótica con bacterias del género *Xenorhabdus*, la cual es transportada en la parte anterior del intestino del nemátodo en una vesícula especializada para dicha función (Kim et al., 2012).

Ciclo de vida de *Steinernema* spp.

El ciclo de vida de los nemátodos entomopatógenos del género *Steinernema* consta de 6 etapas: etapa de huevo, 4 etapas juveniles y finalmente la etapa adulta. La forma infectiva se da en la tercera etapa juvenil conocida como infectivo juvenil (IJ), en esta etapa de desarrollo, el nemátodo se encuentra de manera libre en el suelo recubierto por una cutícula doble y no se alimenta ya que su boca y ano se encuentran cerrados (Herbert & Goodrich-Blair, 2007), estos juveniles infecciosos (IJ), ingresan al insecto través de sus aperturas naturales (boca, ano y espiráculos) una vez dentro, migran hacia la hemolinfa del insecto infectado (Snyder et al., 2007), liberando su bacteria simbiote a través de la defecación (Martens et al., 2003) siendo este, el único momento en que el nemátodo y su bacteria simbiote se separan. El ciclo de vida de *Steinernema* se muestra en la figura 1.

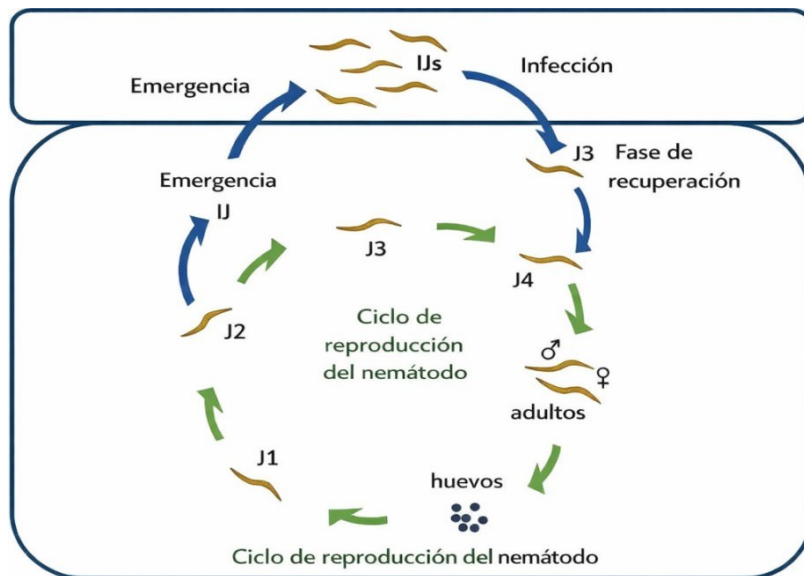


Figura 1. Ciclo de vida de *Steinernema* spp. Los infectivos juveniles (IJ) infectan al insecto huésped dando inicio a la fase de alimentación, después los juveniles etapa 3 (J3) cambian a juveniles de cuarta etapa (J4) donde se convierten en machos y hembras adultos, iniciando la etapa de reproducción, donde los huevos dan origen a juveniles de primera etapa (J1) los cuales se alimentan y pasan por la etapa 2, 3, 4, para convertirse en adultos, después de una a tres generaciones, o bien, cuando el alimento comienza a escasear, los juveniles fase 2 adoptan la fase IJ, llenan su vesícula con su bacteria simbiote y abandonan el cadáver del insecto para buscar una nueva presa (Dreyer et al., 2018).

Xenorhabdus spp.

Como se mencionó en el apartado anterior, las bacterias del género *Xenorhabdus* viven en simbiosis con nemátodos entomopatógenos del género *Steinernema*. Tras la infección de larvas de insectos que habitan en el suelo, las bacterias son liberadas en la hemolinfa del insecto (Tobias et al., 2017) y producen diversas proteínas potencialmente tóxicas junto con metabolitos secundarios. Estas proteínas y metabolitos desempeñan un papel clave en la muerte del insecto huésped en un plazo de 24 a 48 horas (Forst et al., 1997). En la figura 2 se observa el aspecto de algunas larvas tras 48 horas de la infección por nemátodos.



Figura 2. Larvas infectadas por *Steinernema carpocapsae* JAP 1. Estas fotografías muestran el aspecto de larvas obtenidas de un árbol de zapote blanco, del lado izquierdo se muestran las larvas antes de la infección, la fotografía de la derecha muestra su aspecto tras 24 horas de su muerte por infección de *Steinernema carpocapsae* JAP 1 (Cortés-Martínez et al., 2023).

Los metabolitos con actividad antimicrobiana producidos por *Xenorhabdus* también protegen el cadáver del insecto contra microorganismos oportunistas que intentan aprovecharlo, además de inhibir y competir con microbiota natural del insecto (Stock, 2019). Esto se logra mediante la producción de sustancias químicas de amplio espectro con actividad contra bacterias, nemátodos, hongos, insectos y protozoarios, según lo reportado por Dreyer y colaboradores (2018). Cada una de estas sustancias cumple funciones específicas en la bioconversión del cadáver del huésped, así como en la protección, reproducción y crecimiento de los nemátodos.

Existe poca información disponible sobre el mecanismo de liberación de estas sustancias antimicrobianas producidas por *Xenorhabdus* spp. Por otra parte, para su crecimiento y desarrollo, los nemátodos se alimentan tanto de su bacteria simbiote como de nutrientes provenientes del cadáver del insecto muerto (Shobhi Chaudhary et al., 2023).

Diferenciación de fenotipo de bacterias del género *Xenorhabdus*

Se ha reportado que las bacterias del género *Xenorhabdus* presentan dos fenotipos, comúnmente denominados fases. Las células del fenotipo I son más grandes que las del fenotipo II, presentan cuerpos de inclusión cristalinos, son móviles y producen proteasas, lipasas y compuestos bioactivos (Boemare, 1988). Una forma de diferenciar estas fases es mediante su cultivo en medios diferenciales, como el medio agar nutritivo con azul de bromotimol y cloruro de trifeniltetrazolio (NBTA por sus siglas en inglés, *Nutrient Blue Triphenyl Tetrazolium Agar*). En este medio, las bacterias en fase I forman colonias pequeñas de color azul oscuro con un núcleo rojo y rodeadas por una zona clara, mientras que las colonias en fase II son más grandes y de color rojizo. (Lacey & Georgis, 2012; Kaya & Stock, 1997).

Metabolismo secundario en *Xenorhabdus*

Xenorhabdus spp. tiene un amplio espectro de actividad antimicrobiana, pudiendo inhibir bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos, levaduras, y protozoarios, además de causar la muerte del insecto y afectar a nemátodos (Woolhouse et al., 2002). La producción de metabolitos con actividad antibacteriana ocurre durante la fase estacionaria del crecimiento, lo que permite a las bacterias mantener una asociación simbiótica con el nemátodo hospedero, proporcionándole condiciones ideales para su crecimiento y desarrollo (Clarke, 2017). Estos metabolitos suelen ser moléculas pequeñas, como policétidos (PK), péptidos no ribosomales (NRP), bacteriocinas, sideróforos y ácidos grasos (Tobias et al., 2017).

Entre la diversidad de compuestos químicos que estas bacterias producen también se encuentran metabolitos secundarios (Hinchliffe et al., 2010). Estos compuestos cumplen funciones cruciales en la interacción con el insecto huésped, como la evasión del sistema inmunológico, la protección del cadáver contra microorganismos competidores y la comunicación entre células bacterianas (Duchaud et al., 2003). Se ha reportado que hasta el 6.5% del genoma de *Xenorhabdus* spp. está dedicado a la producción de metabolitos secundarios, proporción similar a la de otros microorganismos como *Streptomyces* o *Myxobacteria*, reconocidos por su gran capacidad de producir estos compuestos. En términos generales, la producción de metabolitos secundarios puede agruparse en tres categorías principales: combatir el sistema inmune del insecto huésped, proteger el insecto muerto contra competidores (bacterias, hongos, nemátodos) y facilitar la comunicación celular (Shi & Bode., 2018).

Un ejemplo destacado son los Rhabdopeptidos/Xenortido-péptidos (RXPs), péptidos compuestos por dos a ocho aminoácidos, donde la valina es el más común, seguida de fenilalanina y leucina (Reimer et al., 2013). Estos péptidos se sintetizan mediante sistemas de péptido sintetasa no ribosomales (NRPS) y se producen en gran cantidad durante la infección, mostrando actividad contra los hemocitos del insecto. Aunque su función específica

aún no se comprende completamente, se sugiere que podrían inhibir cascadas de señalización importantes, como la de serina proteasas, afectando la vía de la profenoloxidasa y debilitando así el sistema inmunológico del insecto (Reimer et al., 2014).

Además, *Xenorhabdus* spp. producen diversos antibióticos que protegen el cadáver del insecto frente a competidores microbianos. Entre ellos se encuentran las xenocumacinas, derivadas de una vía híbrida NRPS/PKS, que actúan como inhibidores de la biosíntesis de proteínas bacterianas. Otro ejemplo son las fabclavinas, compuestos cuya biosíntesis combina sistemas NRPS, PKS y sintasas de ácidos grasos poliinsaturados, mostrando actividad antimicrobiana de amplio espectro. También se han identificado los péptidos antimicrobianos de *Xenorhabdus* (PAX), con actividad contra hongos patógenos de humanos y plantas, lo que refuerza su papel en la protección del cadáver del insecto (Shi & Bode, 2018; Clarke, 2017; Reimer et al., 2009)

Metabolitos con actividad antimicrobiana

Se sabe que las bacterias *Xenorhabdus* producen compuestos de amplio espectro con actividad contra bacterias, hongos, insectos, nemátodos, protozoarios e incluso células cancerosas (Fuchs et al., 2011; Woolhouse et al., 2002). La producción de estos metabolitos secundarios suele darse en concentraciones bajas, pero se ha demostrado que es posible aumentar su rendimiento mediante técnicas como el intercambio de promotores genéticos, la clonación de genes en plásmidos de sobreexpresión, la expresión en diferentes hospedadores y la optimización de las condiciones de cultivo y fermentación (Bode et al., 2017; Schimming et al., 2014). Entre los principales metabolitos aislados de *Xenorhabdus* se encuentran depsipéptidos como xenemátidas, xenocumacinas, fabclavinas, pristinamicina, xenortidas, rabdopéptidos, bicornitún, péptidos PAX, cabanilasina, nemaucina, derivados de ditiolopirrolona, compuestos que contienen indol, bencilidenacetona, rabduscina, bacteriocinas y otros péptidos aún no identificados. Estos compuestos han demostrado potencial para inhibir una amplia variedad de microorganismos, incluidos bacterias, hongos, protozoarios e insectos (Abd-Elgawad, 2022), la actividad biológica de algunos de estos metabolitos se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Metabolitos con actividad antimicrobiana producidos por *Xenorhabdus* spp.

Metabolito	Actividad antimicrobiana
Pristinamicina	Antibacteriano
Xenorhabdinas	Antibacteriano
Xenórxicos	Antibacteriano y antifúngico
Péptidos PAX	Antibacteriano y antifúngico
Nematofina	Antibacteriano y antifúngico
Xenocina	Antibacteriano
Xenorhabdicina	Antibacteriano
Xenocumacinas	Antibacteriano, antifúngico
Xenortidos	Antiprotozoario y citotóxico
Rabdopéptidos	Antiprotozoario, insecticida y citotóxico
Xenemátidas	Antibacteriano e insecticida
Rabducina	Insecticida
Indol, oxindol y bencilidenoacetona	Antibacteriano, inmunosupresor e insecticida

La tabla muestra algunos metabolitos secundarios producidos por bacterias del género *Xenorhabdus* tienen actividad biológica de amplio espectro, pudiendo inhibir tanto bacterias como hongos, tal es el caso de la nematofina, xenocumacina y de los péptidos PAX.

A continuación, se describe a las xenocumacinas y a los péptidos PAX, dos de los principales metabolitos con actividad biológica producidos por *X. nematophila*.

Xenocumacinas

Fueron descritas por primera vez por [McInerney](#) en 1991, tienen un anillo benzopirano en su cadena de aminoácidos y son producidas principalmente por *X. nematophila*. Hasta la fecha se han descrito dos xenocumacinas, Xcn1 y Xcn2. Xcn1 es activa contra bacterias Gram positivas y Gram negativas y ha demostrado tener actividad antifúngica y antiulcerosa. Xcn2 tiene menos potencial antimicrobiano que Xcn1 y no presenta actividad antifúngica, pero tiene actividad antiulcerosa ([McInerney et al., 1991](#)), algunos de los microorganismos contra los que se ha evaluado su efecto inhibitorio se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria (μM) de xenocumacinas producidas por *Xenorhabdus nematophila*

Microorganismo	Xenocumacina 1	Xenocumacina 2
<i>Escherichia coli</i> ESS	0.5	2.5
<i>Escherichia coli</i> 10418	2.5	50
<i>Escherichia coli</i> DCO	10	>100
<i>Pseudomona aeruginosa</i> 1771 P	>100	>100
<i>Acinetobacter</i> <i>Imfii</i> BRL 2400	2.5	5
<i>Bacillus megathum</i> NCIB 9376	2.5	5
<i>Corynebacterium xerosis</i> NCTC 9755	1	5
<i>Sarcina lutea</i> ATCC 8740	1	5
<i>Staphylococcus aureus</i> Oxford NCTC 6571	10	5
<i>Staphylococcus aureus</i> V573	25	>100
<i>Streptococcus pyogenes</i> CN 10	1	5
<i>Streptococcus sanguir</i> ATCC 10556	10	10
<i>Cryptococcus neoformam</i>	0.125	ND
<i>Aspergillus niger</i>	10	ND

En esta tabla se puede observar que xenocumacina 1 tiene mayor actividad antimicrobiana que xenocumacina 2. ND, dato no disponible. Tomado de (Reimer et al., 2014).

Péptidos PAX

Los péptidos PAX se identificaron por primera vez en 2001 y se describieron como ciclolipopéptidos ricos en lisina. Estos péptidos, producidos por *X. nematophila*, tienen actividad antifúngica, antibacteriana y no presentan actividad citotóxica (Dreyer et al. 2019). En un estudio realizado por Dreyer y colaboradores en el año 2019 se comparó la actividad antimicrobiana de los péptidos PAX del 1 al 5, reportando que, el péptido PAX 5 parece ser el que mayor capacidad antibacteriana presenta, así mismo, reportaron que la actividad antifúngica de los 5 péptidos PAX teniendo como resultado que los PAX del 1 al 5 son capaces de inhibir a *Fusarium oxysporum* y a *Candida albicans*. La tabla 3 muestra los resultados de inhibición de algunos de los microorganismos de interés alimentario evaluados durante ese estudio.

Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria (μM) de péptidos PAX producidas por *Xenorhabdus nematophila*.

Microorganismo	PAX 1	PAX 2	PAX 3	PAX 4	PAX 5
<i>Pseudomona aeruginosa</i> CIP 76.110	>100	>100	100	50	25
<i>Escherichia coli</i> CIP 76.24	100	>100	100	50	12.5
<i>Escherichia coli</i> H35393 (L, C, Q) b	>100	100	50	100	25
<i>Salmonella typhimurium</i> H23212	100	100	100	100	50
<i>Salmonella maltophilia</i> H38058	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 76.25	>100	100	50	50	50
<i>Enterococcus faecalis</i> H37812	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Fusarium oxysporum</i> H3012	1.56	1.56	1.56	1.56	0.78

En esta tabla se puede observar una comparación del efecto antimicrobiano entre 5 PAXs contra microorganismos de interés alimentario (Dreyer et al., 2019).

Fermentación sumergida de *Xenorhabdus* spp.

Para la producción de antibióticos, es fundamental que las condiciones de fermentación sean óptimas, evitando el desperdicio de tiempo y recursos. La producción de antibióticos por bacterias del género *Xenorhabdus* ha sido optimizada en diversos estudios (Fang et al., 2012; Feng et al., 2010; Wang et al., 2008; Xiufen et al., 2001). Los factores considerados incluyen parámetros ambientales como el pH inicial del medio, temperatura, velocidad de agitación, volumen de inoculación, volumen del medio en el matraz, tiempo de fermentación, niveles de oxígeno disuelto y tipo de medio de cultivo. Como era de esperar, la optimización varía para cada cepa. Sin embargo, existen algunas similitudes en los parámetros utilizados (Tabla 4).

Tabla 4. Condiciones frecuentemente usadas en fermentaciones de *Xenorhabdus* spp.

pH inicial del medio de cultivo	6-8.24
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	25-32
Velocidad de rotación (rpm)	150-220
Volumen de inoculación (%)	4-15
Volumen de medio de cultivo (mL)	54-100
Tiempo de fermentación (h)	54-72

Como puede observarse en la tabla 4, las condiciones de fermentación reportadas para *Xenorhabdus* presentan rangos considerablemente amplios. Un ejemplo claro es el porcentaje de volumen de inoculación, donde valores

que van del 4 al 15% representan una variación superior al 200%. Tal como señalan Fang et al. (2012), Feng et al. (2010), Wang et al. (2008) y Xiufen et al. (2001), estas diferencias evidencian que las condiciones de fermentación para *Xenorhabdus* deben determinarse de manera específica para cada estudio o cepa.

Es evidente que la producción de compuestos bioactivos requiere la optimización del protocolo de producción. Esto es necesario tanto para su uso en la industria como en la investigación. Sin embargo, el proceso de optimización no es una tarea fácil y se necesita una mayor investigación para este proceso, especialmente porque el protocolo es específico para cada cepa bacteriana y producto deseado (Crawford et al., 2010; Maxwell et al., 1994). En la tabla 5 se muestran artículos del último lustro, donde se indican las condiciones de fermentación, los métodos de purificación e identificación de metabolitos producidos por *Xenorhabdus* spp.

Si bien y a pesar de la gran variación de compuestos bioactivos, ninguno ha sido comercializado, si se han utilizado varios nemátodos asociados con simbiosis de *Xenorhabdus* como agentes de control biológico (Chavarría-Hernández et al., 2010; Ehlers, 2001).

Tabla 5. Recopilación de estudios de *Xenorhabdus* spp. de los últimos 5 años

Referencia	Especie / origen	Medio de cultivo usado	Condiciones de fermentación	Método de extracción de metabolitos	Método(s) de purificación / análisis	Organismos diana	Metabolito(s) reportados
Booyesen et al., 2021	<i>Xenorhabdus khoisanae</i> J194	STB	26 °C; 220 rpm o sin agitación; 24-96 h	Extracción con acetonitrilo; resina XAD-16	UPLC-MS / HPLC	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 <i>E. coli</i> Xen 14 <i>S. aureus</i> ATCC 25923 <i>S. aureus</i> Xen 31 <i>S. epidermidis</i> SE1 <i>L. monocytogenes</i> EDGe	Péptidos PAX Xenocumacinas Rabducina
Gulsen et al., 2022	22 cepas de <i>Xenorhabdus</i> spp.	STB / LB	30 °C; 150 rpm; hasta 120 h	Extracción resina XAD	Identificación de compuestos por método easyPACId	<i>A. castellanii trophozoites</i> ATCC 30010 <i>Entamoeba histolytica</i> ATCC 30459 <i>Trichomonas vaginalis</i> ATCC 30001 <i>Leishmania tropica</i> ATCC 50129 <i>Trypanosoma cruzi</i> CBU-TC01	Fabclavina Xenocumacina Péptidos PAX Xenorhabdina
Ujszegi et al., 2023	<i>Xenorhabdus budapestensis</i> nov. DSM-16342T <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> nov. DSM-16338T	Mueller-Hinton	30 °C; agitación; 168 h	---	---	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	No se reporta.
Jin et al., 2024	<i>Xenorhabdus nematophila</i> , <i>Xenorhabdus bovienii</i> ,	STB	28 °C; 180 rpm; 72 h	Acetato de etilo	GC-MS	<i>Maruca vitrata</i>	Dipéptido cPF

	<i>Xenorhabdus hominickii</i>						
Otoya-Martinez et al., 2025	<i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM-25 <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> DSM 16338	LB	30°C; 150 rpm; 144 h	----	Identificación de compuestos por método easyPACId	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Botrytis cinerea</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Macrophomina phaseolina</i>	Fabclavina Xenocumacina

El análisis comparativo de los estudios recopilados en esta tabla revela patrones consistentes en la fermentación de *Xenorhabdus* spp. (por ejemplo, el medio de cultivo usado), así como diferencias en el tipo de metabolito producido, el método de extracción empleado y el organismo blanco evaluado. De manera general, los datos muestran que los géneros *Xenorhabdus* y sus metabolitos derivados poseen un amplio espectro de actividad biológica para el control microbiano y entomológico.

Justificación

El deterioro microbiológico de alimentos representa uno de los principales desafíos para la industria alimentaria a nivel mundial, generando pérdidas económicas significativas, riesgos para la salud pública y una demanda creciente de métodos de conservación más seguros y sostenibles. Frente a este escenario, el uso de metabolitos antimicrobianos naturales como agentes de bioconservación ha cobrado relevancia, ya que permite minimizar el uso de conservadores químicos y responder a la preferencia de los consumidores por alimentos más naturales y menos procesados.

Las bacterias del género *Xenorhabdus* constituyen una fuente poco explorada y prometedora de metabolitos antimicrobianos. A diferencia de otros microorganismos productores de bacteriocinas o antibióticos conocidos, *Xenorhabdus* spp. poseen la capacidad de generar una diversidad de compuestos con estructuras químicas complejas y modos de acción diversos, lo que reduce la probabilidad de desarrollar resistencia cruzada en microorganismos patógenos. Esta característica confiere un valor estratégico para su aplicación en sistemas de bioconservación de alimentos, especialmente en productos perecederos como carnes, lácteos y vegetales frescos. Sin embargo, el potencial biotecnológico de estos metabolitos aún se encuentra limitado por el escaso conocimiento sobre las condiciones óptimas de fermentación para su producción a escala de laboratorio y su posterior escalada a la industria. Además, se requiere profundizar en su caracterización fisicoquímica y actividad antimicrobiana específica frente a distintos microorganismos de interés alimentario, para evaluar su eficacia real y su posible integración en matrices alimentarias o sistemas de envasado activo.

El desarrollo de esta línea de investigación en el ámbito de la maestría no solo contribuye al avance científico en microbiología aplicada y biotecnología de alimentos, sino que también ofrece una alternativa viable para la industria alimentaria nacional e internacional, alineada con políticas de seguridad alimentaria, sostenibilidad y salud pública. Por ello, la producción y caracterización parcial de metabolitos antimicrobianos mediante fermentación de *Xenorhabdus* spp. responde a la necesidad de generar soluciones innovadoras y sustentables, aprovechando recursos biológicos locales y fomentando el desarrollo de tecnologías limpias y seguras.

Finalmente, esta investigación tiene el potencial de sentar las bases para futuros estudios de purificación, identificación estructural, evaluación toxicológica y pruebas de aplicación directa en matrices alimentarias reales, lo cual abrirá nuevas perspectivas para el diseño de conservadores naturales de alto valor agregado y contribuirá a fortalecer la competitividad de la industria de alimentos mediante el uso de biopreservantes derivados de microorganismos no convencionales.

Hipótesis

La bacteria *Xenorhabdus nematophila* aislada de *Steinernema carpocapsae* JAP1, produce metabolitos con actividad antibacteriana y antifúngica, en fermentación por lote.

Objetivos Objetivo general

Caracterizar parcialmente metabolitos con actividad antibacteriana y antifúngica, producidos por *Xenorhabdus nematophila* simbionte de *Steinernema carpocapsae* JAP1, en fermentación por lote.

Objetivos específicos

En fermentación por lote de *X. nematophila* realizar lo siguiente:

Caracterizar la cinética de concentración de biomasa, producción de actividad antibacteriana y antifúngica, y tasa de consumo de oxígeno.

Analizar la extracción líquido-líquido (i.e., caldo de fermentación-acetato de etilo), evaluando la actividad antimicrobiana de ambas fases, acuosa y orgánica, en pruebas de reto contra *Listeria monocytogenes* CFQ-103, *Staphylococcus aureus* ATCC-25923, *Escherichia coli* ATCC-25922, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida parapsilosis*.

Separar por cromatografía de permeación en gel las muestras concentradas, colectando muestras de 2 mL, y evaluar la actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas.

Purificar por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa las fracciones obtenidas en el objetivo 3 que exhiban la mayor actividad antimicrobiana, colectado las fracciones para continuar su análisis en estudios futuros.

Materiales y métodos

Microorganismos

La cepa utilizada para este estudio fue *Xenorhabdus nematophila* aislada de *Steinernema carpocapsae* JAP 1 (cepa perteneciente al Cuerpo Académico de Biotecnológica Agroalimentaria de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo).

Los microorganismos diana fueron: *Listeria monocytogenes* CFQ-103 (LM), *Staphylococcus aureus* ATCC-25923 (SA), *Escherichia coli* ATCC-25922 (EC), *Salmonella typhimurium* (ST), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Shigella flexneri* (SF) (cepas donadas por el laboratorio de Salud Pública de Hidalgo) *Candida albicans* ATCC 10231 (CA), *Candida parapsilosis* (CP) (cepas donadas por el ceptario de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México)

Medios de cultivo

Para la fermentación de *Xenorhabdus nematophila* se utilizó caldo soya tripticasa BD Bioxon® lote 2179138, adicionado con 0.5% (p/v) de extracto de levadura BD Bioxon® lote 1068823; a este medio se le denomina STB1. Para la diferenciación de fenotipos se empleó el medio NBTA (Cortés-Martínez et al., 2023).

La fermentación de las bacterias diana se realizó utilizando caldo BHI (Brain Heart Infusion) BD Bioxon® lote 3031403, mientras que para las levaduras se utilizó caldo nutritivo BD Bioxon® lote 0140198, suplementado con 0.25% (p/v) de extracto de levadura BD Bioxon® lote 1068823, denominado caldo levadura.

Para la prueba antimicrobiana por gota se utilizó agar suave-BHI para las bacterias y agar suave de caldo levadura para las levaduras. Para la preparación de los agares suaves se añadió 10% de agar bacteriológico a los caldos BHI y levadura. Todos los medios se prepararon con agua destilada y se esterizaron a 121 °C y una presión manométrica de 18 kg/cm² durante 20 minutos en una autoclave AESA.

Fermentación de *X. nematophila*

Para la fermentación destinada a evaluar la actividad antimicrobiana del sobrenadante libre de células (fermentación 1) se utilizó un vial de conservación de *Xenorhabdus nematophila*. (2 mL), el cual se inoculó en un matraz de 125 mL Pyrex® No. 5100 con tapón No. 6 que contenía 25 mL de caldo STB1. La incubación se realizó en oscuridad a 28 °C y 130 rpm en una incubadora orbital Barnstead/Lab-Line® modelo SHKE5000-7 durante 14 horas o hasta alcanzar una densidad óptica de 1 (las mediciones se realizaron con un espectrofotómetro Thermo Fisher® Genesys 10S a 600 nm). Posteriormente, se inoculó al 1% este cultivo en 180 mL de caldo STB1 contenido en un matraz de 1 L Pyrex® No. 5100 con tapón No. 11, dividiendo el volumen en nueve matraces de 250 mL Kimax® No. 26500 con tapón No. 6,

colocando 30 mL en cada uno. Los matraces se incubaron por 96 horas, tomando 5 mL de cada uno para medir pH, peso seco, densidad óptica y reservando los 25 mL restantes para la metodología descrita en la fermentación 2. Los tiempos de fermentación evaluados fueron: 0, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72 y 96 horas.

Para la fermentación 2, destinada a realizar una cinética de crecimiento, se siguió el mismo procedimiento que en la fermentación 1, pero el volumen inoculado al 1% fue de 450 mL, dividido en tres matraces de 500 mL Pyrex® No. 5100 con tapón No. 10, con 150 mL de caldo STB1 en cada uno. Los tiempos evaluados fueron: 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 48 y 72 horas, rotando la toma de muestras (5 mL) entre los tres matraces para mantener el volumen equilibrado.

Para la fermentación 3, destinada a la separación de fases, se aplicó el mismo procedimiento, ajustando solo el volumen inoculado al 1% (200 mL de caldo STB1). Esta fermentación se incubó durante 48 horas bajo las mismas condiciones; no se realizaron mediciones intermedias.

Respirometría

Se utilizó un respirómetro Strathkelvin 782 con los siguientes parámetros: temperatura de 28 °C y salinidad de 5 ppm. Para las mediciones se usaron 200 µL de caldo de fermentación correspondiente a los tiempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36 y 48 horas. Como estándar se empleó medio STB1 en agitación (130 rpm).

Sobrenadante libre de células

Los caldos de fermentación de los tiempos mencionados, tanto de la fermentación 1 como de la 3, se centrifugaron a 6000 rpm y 4 °C durante 20 minutos en una centrífuga HERMLE® modelo Z323K. El sobrenadante se ajustó a pH 6.5 usando soluciones de ácido clorhídrico (1, 5 y 10 M), y se pasteurizó en un baño de agua Foss Tecator® modelo 1024 a 70 °C por 20 minutos. Los sobrenadantes de la fermentación 1 se almacenaron en frascos de vidrio estériles a 10 °C hasta su uso, mientras que el sobrenadante de la fermentación 3 se almacenó en un frasco SCHOTT de 1 L para su uso inmediato.

Preparación de material para la separación de fases

El material utilizado para la separación de fases, concentración de extractos y almacenamiento se limpió durante 24 horas en una solución de ácido nítrico 6N. El solvente orgánico empleado fue acetato de etilo BAKER® lote No. E40W73.

Extracción líquido-líquido del fermento de *X. nematophila*

Se colocaron 200 mL del sobrenadante libre de células (fermentación 3) en un frasco SCHOTT® de 1 L, añadiendo 200 mL de acetato de etilo BAKER®. La mezcla se agitó a 130 rpm y 25 °C durante 4 horas y se vertió en un embudo de separación Pyrex® de 1 L, dejándola reposar 20 minutos para la clara diferenciación de fases, procediendo luego a la separación (Figura 3)

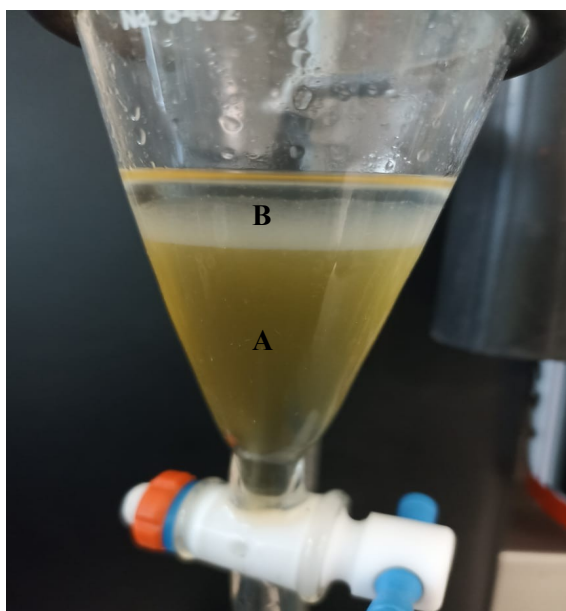


Figura 3. Separación de fases durante la extracción líquido-líquido. En el embudo de separación se distinguen claramente la fase acuosa indicada con la letra A (sobrenadante libre de células) y la fase orgánica (acetato de etilo) indicada con la letra B, lo que facilitó la separación de fases.

Concentración de la fase acuosa

Los 200 mL de fase acuosa se dividieron en ocho tubos para centrífuga Corning® (25 mL cada uno) y se colocaron en una estufa de vacío Lab-Line® modelo 3618 a 52 °C y 15 in Hg, hasta reducirse a 5 mL por tubo. El volumen final (40 mL) se transfirió a un matraz bola Buchi® para evaporación en un rotavapor Buchi® R-215 (40 °C, 50 rpm, 72 mbar), hasta evaporar aproximadamente el 75% de la muestra, logrando un volumen final de 5 mL (metodología modificada de Zhang et al. 2024).

Concentración de la fase orgánica

Los 200 mL de acetato de etilo se evaporaron en un rotavapor Buchi® R-215 (40 °C, 50 rpm, 95 mbar) hasta eliminación total del solvente. Posteriormente se agregaron 5 mL de buffer de fosfatos pH 7 en un matraz bola Buchi® y se agitó a 150 rpm durante 2 minutos para recuperar los metabolitos. La solución se esterilizó por filtración mediante

filtro Millex® de 0.22 µm.

Cromatografía de permeación en gel

Se empleó una columna Econo-Column® Bio-Rad (1.5 × 30 cm) empacada con resina Bio-Gel® P30 (2,500–40,000 MW). La columna se lavó tres veces con buffer de fosfatos 0.1 M pH 6.5 estéril (45 mL por lavado; flujo: 0.6 mL/min). Posteriormente, se cargaron 5 mL de la fracción acuosa concentrada. La fase móvil fue buffer de fosfatos pH 6.5; el flujo de elución fue de 0.05 mL/min durante 10 minutos y luego se ajustó a 0.6 mL/min. Se recolectaron fracciones de 2 mL hasta completar el volumen total de la columna (45 mL).

Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP HPLC)

Las fracciones con mayor actividad antimicrobiana fueron purificadas en un equipo HPLC Agilent 1260 Infinity. Se inyectaron 30 µL de cada fracción en una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 × 150 mm, 3.5 µm). La elución se realizó con un gradiente lineal (70–30% del solvente A en 5 min): solvente A (agua HPLC/0.1% ácido fórmico) y solvente B (acetonitrilo HPLC). La columna se mantuvo a 25 °C, con flujo de 1 mL/min. Los picos eluidos se detectaron a 254–280 nm y se recolectaron mediante colector de fracciones automático G1364C/1260 Infinity FC-AS.

Cuantificación proteica

Para cuantificar los posibles compuestos proteicos contenidos en los concentrados del extracto orgánico y acuoso, se usó un NanoDrop ND1000 Spectrophotometer. Para las mediciones se usaron gotas de 2 µL, las mediciones de cada extracto se realizaron por quintuplicado. La absorbancia se midió a 280 nm. Como blanco se usó agua destilada.



Figura 4. NanoDrop ND1000 (Laboratorio de genética y genómica, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.)

Placa Elisa

Para evaluar la actividad antimicrobiana de las fracciones de cromatografía por filtración en gel se empleó una placa ELISA de 96 pozos. El volumen final de cada pozo fue de 100 μL : 40 μL de fracción, 50 μL de medio BHI o caldo levadura y 10 μL del microorganismo prueba. Para el control positivo se añadieron 40 μL de agua destilada estéril, 50 μL de BHI o caldo levadura y 10 μL del microorganismo. Para el control negativo se colocaron 50 μL de agua destilada estéril y 50 μL de BHI o caldo levadura. La lectura se realizó a las 18, 20 y 24 horas a 545–630 nm. Los microorganismos utilizados fueron SA y CA.

Prueba de inhibición por gota

Los microorganismos indicadores fueron LM, ST, SA, EC, CA y CP. Las bacterias se activaron inoculando una colonia aislada en 5 mL de BHI estéril e incubando a 37 °C por 24 h (incubadora Sheldon® G16). Luego, se tomaron 50 μL para inocular 5 mL de BHI fresco, incubando por 6 horas a 37 °C (cultivo en fase log, $\sim 10^9$ UFC/mL). Para las levaduras se inoculó una colonia en 10 mL de caldo nutritivo con 0.25% de extracto de levadura (p/v) en matraces de 25 mL Pyrex® No. 5100 con tapón No. 6, incubando a 28 °C y 130 rpm en incubadora orbital Sheldon® G16 por 20 horas o hasta alcanzar densidad óptica de 1.

La técnica de difusión en agar se realizó siguiendo el protocolo establecido en el Cuerpo Académico de Biotecnología Agroalimentaria. Se mezclaron 58 μL del cultivo diana en 10 mL de agar suave BHI (para bacterias) o agar suave de caldo nutritivo con extracto de levadura (para levaduras). Se vertió en cajas Petri estériles (90 \times 15 mm Pyrex®) y se dejó solidificar en campana de flujo laminar (Labconco®). Una vez solidificado, se aplicaron gotas de 5 μL de los sobrenadantes libres de células de los tiempos 0, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72 y 96 horas para determinar el tiempo óptimo de inhibición. Se siguió esta misma metodología para evaluar la actividad antimicrobiana de la fracción acuosa, orgánica y las fracciones purificadas por RP HPLC. Como control positivo para bacterias se utilizó amikacina (500 mg/2 mL) marca PISA® y nisina purificada; para levaduras se utilizó natamicina al 2.73%.

Resultados y discusión

Cinética de crecimiento

Durante la fermentación realizada a nivel matraz se evaluaron la producción de biomasa, la densidad óptica, pH y Gram (Figura 6).

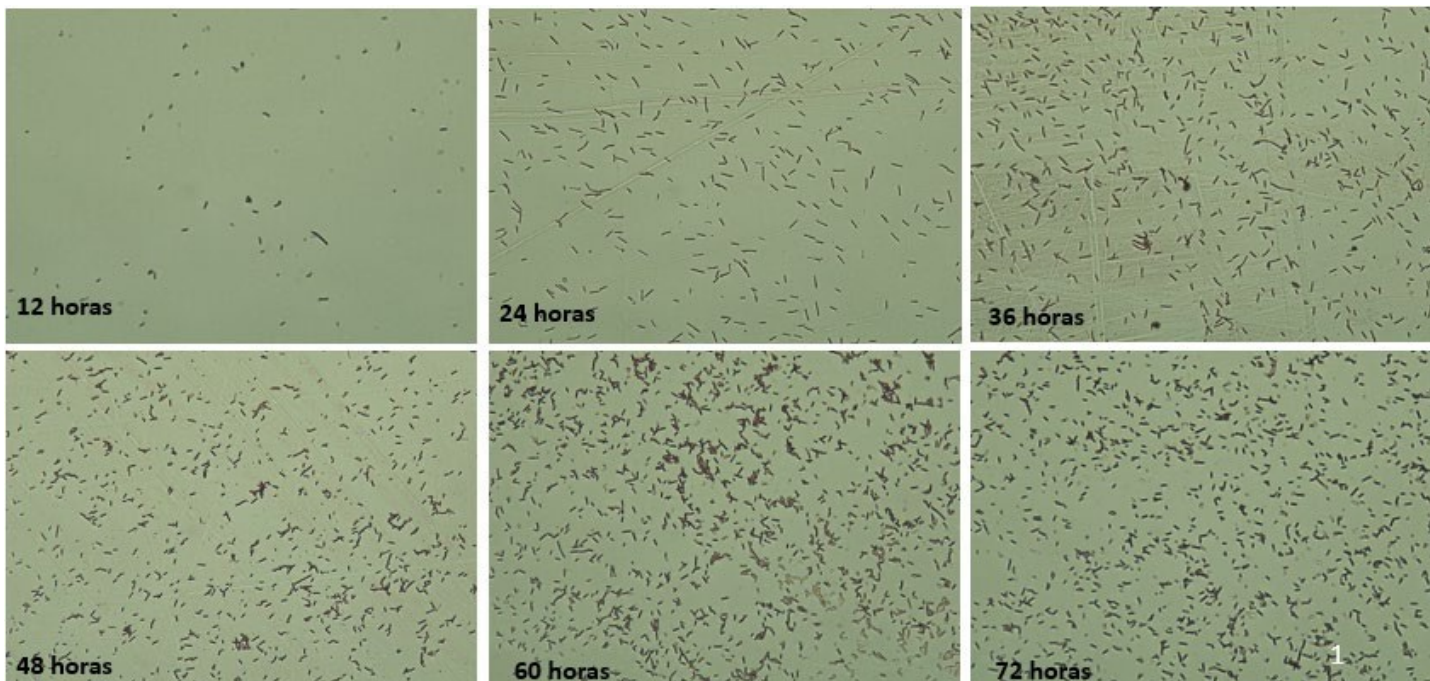


Figura 5. Tinción Gram de *X. nematophila*. Fotografías tomadas con un aumento de 1000X a los tiempos 12, 24, 36, 48, 60 y 72 horas, donde se observan bacilos Gram negativos (morfología y Gram esperados para bacterias del género *Xenorhabdus*).

Los resultados obtenidos permitieron construir la curva de crecimiento de *Xenorhabdus nematophila* (figura 6). Se observó una fase lag o adaptativa de 0 a 6 horas, una fase de crecimiento exponencial de 6 a 36 horas, y una fase estacionaria a partir de la hora 37 que se mantuvo al menos hasta las 96 horas. Este comportamiento coincide con lo reportado por Guo et al. (2017a), quienes describen un patrón de crecimiento similar en *Xenorhabdus nematophila* YL001 y en una cepa modificada (*X. nematophila* YL001 cpxR). Identificar las etapas de crecimiento resulta fundamental, ya que las bacterias del género *Xenorhabdus* presentan una intensa producción de metabolitos secundarios durante la fase estacionaria (Clarke, 2017; Tobias et al., 2017), estos metabolitos incluyen policétidos (PK), péptidos no ribosomales (NRP), bacteriocinas, sideróforos y ácidos grasos, todos ellos de interés por su potencial bioactivo (Dreyer et al., 2018; Bode et al., 2017).

La máxima concentración de biomasa (4.91 g/L) se alcanzó a las 48 horas, mientras que la tasa de crecimiento específica fue de 0.22 h^{-1} a las 10 horas de fermentación, Kooliyottil y colaboradores en (2014) reportaron tasas de

crecimiento específico para *X. nematophila* entre 0.49 h^{-1} y 1.02 h^{-1} en condiciones optimizadas, lo que indica que aún existe margen de mejora en la eficiencia del proceso.

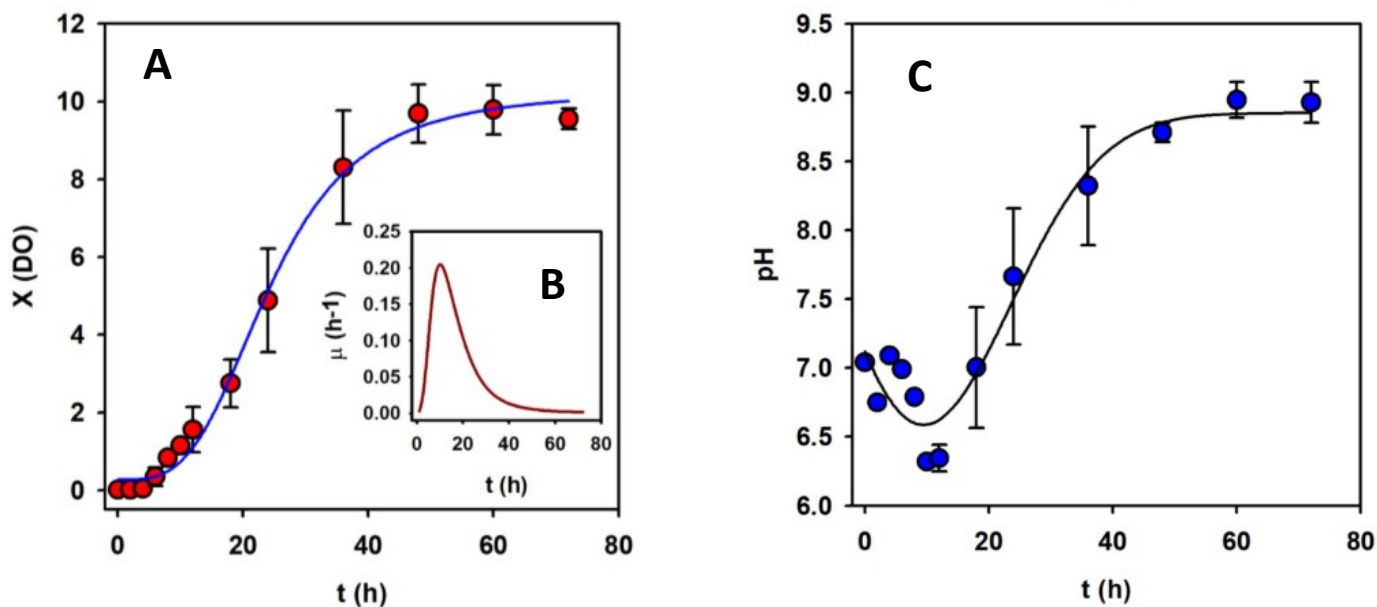


Figura 6. Cinética de crecimiento de *X. nematophila*. La cinética de crecimiento observada para *X. nematophila* muestra una fase exponencial entre las 6 y 24 h, alcanzando un valor máximo de biomasa alrededor de las 36 h, momento a partir del cual se observa un periodo estacionario prolongado (Figura 6A). La máxima velocidad específica de crecimiento ($\mu_{\text{máx}} = 0.22 \text{ h}^{-1}$) ocurrió a las 10 h (Figura 6B), lo que coincide con la zona de mayor pendiente en la curva de crecimiento. Esto indica que el metabolismo secundario, inicia a partir de la hora 36, iniciando la producción de metabolitos secundarios, por ejemplo, nematofina, xenocumacina y, fabclavina. Respecto al pH (Figura 6C) Se observa inicialmente un descenso hasta valores cercanos a 6.5 alrededor de las 12–15 h, probablemente asociado a la producción de ácidos orgánicos derivados del metabolismo primario; a partir de las 24 h el pH se eleva de manera sostenida hasta valores cercanos a 9.0, mostrando una alcalinización del medio posiblemente derivado del metabolismo secundario.

En cuanto al pH, (figura 6): inicialmente la bacteria consume la fuente de carbono, produciendo ácidos orgánicos que acidifican el medio, y posteriormente metaboliza la fuente de nitrógeno generando iones amonio que alcalinizan el cultivo (Zhang et al., 2024; Wang et al., 2011a; Chen et al., 1996). En este trabajo, se corroboró esta dinámica: el pH inicial del STB1 (7.03) disminuyó hasta 5.5 durante las primeras 12 horas, para luego elevarse hasta 8.5, coincidiendo con el consumo de la fuente de carbono y el aprovechamiento de la fuente nitrogenada. Se ajustó el pH inicial del medio a valores cercanos a 7, ya que se ha demostrado que un rango de 7–7.5 favorece la producción de compuestos antimicrobianos como la xenocumacina 1 y la nematofina (Zhang et al., 2024; Guo et al., 2017a; Wang et al., 2011a). Estudios recientes destacan además que la modulación del pH puede influir en la regulación de rutas biosintéticas clave, afectando la producción de policétidos y péptidos no ribosomales (Booyesen et al., 2021; Guo et al., 2017a).

Respirometría

Tras el análisis de los datos obtenidos de 3 cinéticas independientes se determinó que, la demanda de oxígeno (OUR) de *Xenorhabdus* sp. se encuentra en un rango de 10-100 mmol O₂ g⁻¹h⁻¹(figura 7), un trabajo similar realizado por Belur y colaboradores en el año 2013 reportó una tasa de respiración específica de 0.33 mmol O g⁻¹h⁻¹ para *Photorhabdus luminescens* en su fase estacionaria.

La convergencia entre la caída de la OUR y el incremento del pH a partir de las 24 horas sugiere que *X. nematophila* experimenta un cambio fisiológico relevante en esa etapa. Diversos reportes (Dreyer et al., 2018; Bode et al., 2017; Tobias et al., 2017; Clarke, 2016) han descrito que especies del género *Xenorhabdus* inducen la producción de metabolitos secundarios, particularmente antimicrobianos, cuando entran a fase estacionaria. La caída observada en la OUR puede entonces interpretarse como un indicador indirecto de transición del metabolismo primario al secundario.

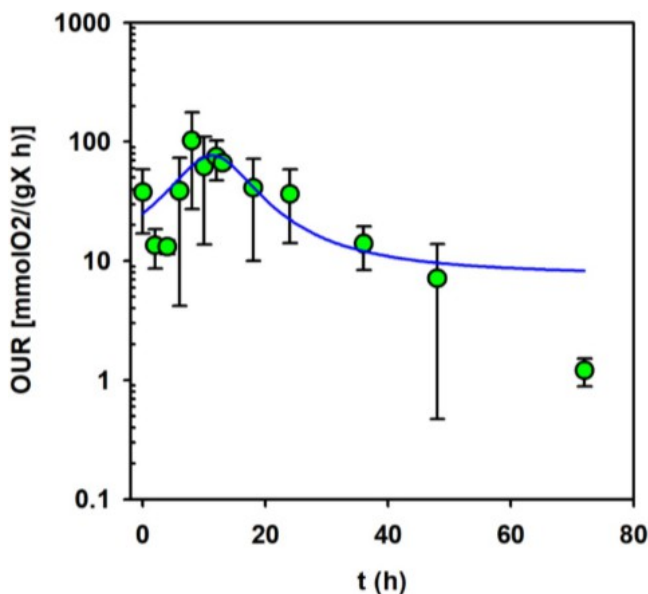


Figura 7. Tasa de respiración. La demanda de oxígeno de *X. nematophila* fluctuó en el rango de 10-100 mmol O₂ g⁻¹ h⁻¹, siendo a las 12 horas donde la bacteria demanda mayor cantidad de oxígeno coincidiendo con la tasa máxima de crecimiento reportada en este estudio, la cual ocurrió a las 10 h. Posteriormente, se observa un decrecimiento progresivo de la OUR a partir de las 24 h, lo cual coincide con el inicio de la fase estacionaria. La disminución de la OUR sugiere que el metabolismo deja de destinarse principalmente a crecimiento y pasa a un metabolismo de mantenimiento, además, puede implicar una reducción de biomasa activa

Cuantificación de proteína

La cuantificación por absorbancia a 280 nm mostró que la fracción acuosa de las 48 h de fermentación fue la que obtuvo mayor concentración proteica (33.28 mg/mL), mismo caso para la fracción orgánica que obtuvo una concentración de 11.27 mg/mL a las 48 h. Esto sugiere que la mayor parte de las biomoléculas que absorben a 280 nm se mantienen en la fase acuosa y que la producción de compuestos de naturaleza proteica alcanza un pico máximo a las 48 h de fermentación bajo las condiciones experimentales empleadas. Los datos detallados se muestran en las tablas 6 y 7. Para las fracciones purificadas mediante permeación en gel (tabla 8), la fracción 16 fue la que obtuvo mayor cantidad de compuestos proteicos (58.67 mg/mL). En las fracciones purificadas por RP HPLC se obtuvieron lecturas máximas de 1.567 mg/mL (Tabla 9).

Tabla 6. Cuantificación proteica del extracto acuoso de la fermentación de *Xenorhabdus nematophila*.

Extracto Acuoso	Tiempo (h)	Promedio (mg/mL)	DE
	0	21.22 ^c	0.34
	24	25.61 ^b	0.32
	48	33.28 ^a	0.81
	72	20.56 ^c	0.93

En esta tabla se observa el promedio de 5 mediciones realizadas en NanoDrop ND1000 Spectrophotometer a 280 nm del extracto acuoso. Los datos se sometieron a un análisis de varianza univariado para evaluar diferencias entre los tiempos de incubación (0, 24, 48 y 72 h). Se aplicó la prueba post-hoc de Tukey con un nivel de confianza del 95% ($p \leq 0.05$); las letras en superíndice colocadas en la columna de promedio indican los grupos homogéneos, de modo que diferentes letras señalan diferencias estadísticamente significativas entre medias.

Tabla 7. Cuantificación proteica del extracto orgánico de la fermentación de *Xenorhabdus nematophila*.

Extracto Orgánico	Tiempo (h)	Promedio (mg/mL)	DE
	0	12.62 ^a	0.89
	24	10 ^c	0.24
	48	11.27 ^b	0.35
	72	8.2 ^d	0.38

En esta tabla se observa el promedio de 5 mediciones realizadas en NanoDrop ND1000 Spectrophotometer a 280 nm del extracto orgánico. Los datos se sometieron a un análisis de varianza univariado para evaluar diferencias entre los tiempos de incubación (0, 24, 48 y 72 h). Se aplicó la prueba post-hoc de Tukey con un nivel de confianza del 95% ($p \leq 0.05$); las letras en superíndice colocadas en la columna de promedio indican los grupos homogéneos, de modo que diferentes letras señalan diferencias estadísticamente significativas entre medias.

Tabla 8. Cuantificación proteica de las fracciones obtenidas por cromatografía de permeación en gel

Fracción	Promedio (mg/mL)	DE
4	1.61 ^c	0.18
7	3.92 ^d	0.02
16	58.67 ^a	0.37
21	36.6 ^b	0.37
24	18.4 ^c	0.2
27	3.55 ^d	0.14

En esta tabla se observa el promedio de 3 mediciones realizadas en NanoDrop ND1000 Spectrophotometer a 280 nm de las fracciones con mayor actividad antimicrobiana obtenidas mediante permeación en gel. Los datos se sometieron a un análisis de varianza univariado para evaluar diferencias entre las fracciones obtenidas. Se aplicó la prueba post-hoc de Tukey con un nivel de confianza del 95% ($p \leq 0.05$); las letras en superíndice colocadas en la columna de promedio indican los grupos homogéneos, de modo que diferentes letras señalan diferencias estadísticamente significativas entre medias.

Tabla 9. Cuantificación proteica de las fracciones purificadas por RP HPLC

Fracción	Promedio (mg/mL)	DE
4 a	0.81 ^h	0.17
4 b	0.62 ^h	0.01
4 c	1.08 ^{gh}	0.09
7 a	2.14 ^f	0.10
7 b	1.04 ^{gh}	0.16
7 c	0.73 ^h	0.02
16 b	22.20 ^a	0.29
21 a	17.77 ^b	0.58
21 b	16.61 ^c	0.32
21 c	16.53 ^c	0.17
24 a	12.29 ^d	0.79
24 b	17.32 ^{bc}	0.21
27 a	3.65 ^e	0.55
27 b	2.00 ^{fg}	0.02

En esta tabla se observa el promedio de 3 mediciones realizadas en NanoDrop ND1000 Spectrophotometer a 280 nm de las fracciones purificadas por RP HPLC. Los datos se sometieron a un análisis de varianza univariado para evaluar diferencias entre las fracciones obtenidas. Se aplicó la prueba post-hoc de Tukey con un nivel de confianza del 95% ($p \leq 0.05$); las letras en superíndice colocadas en la columna de promedio indican los grupos homogéneos, de modo que diferentes letras señalan diferencias estadísticamente significativas entre medias.

En la literatura consultada se encontraron pocos estudios que reporten la cantidad de compuestos de naturaleza proteica producidos en fermentaciones de *Xenorhabdus* spp. La tesis de maestría de Gómez, en el 2022 reporta que la fermentación de 48 horas de *Xenorhabdus nematophila* tiene una concentración de 5.94 mg/mL de compuestos proteicos, mientras que en nuestra investigación para el mismo tiempo de fermentación el extracto acuoso tiene una concentración de compuestos posiblemente proteicos de 33.28 mg/ml y el orgánico de 11.27 mg/ml esta diferencia podría explicarse por el método de extracción utilizado, ya que Gómez, en el 2022 utilizó el método de adsorción-desorción.

En el 2019, Darsouei y colaboradores reportaron una concentración de proteínas producidas por la membrana exterior de *X. nematophila* y *P. luminescens* de 1.12 y 1.07 mg/mL respectivamente, datos que se encuentran en el rango de las mediciones obtenidas de la fracción 4 (1.61 mg/mL) purificada mediante RP HPLC de nuestra investigación.

Cromatografía por filtración en gel

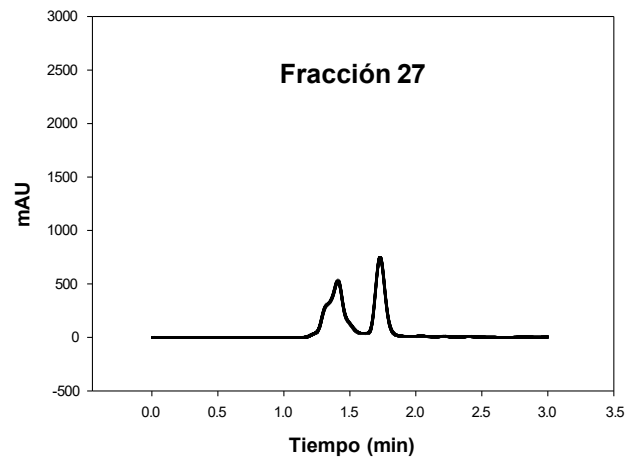
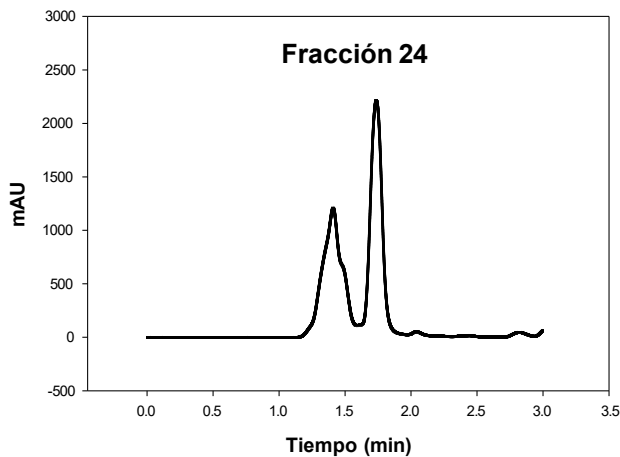
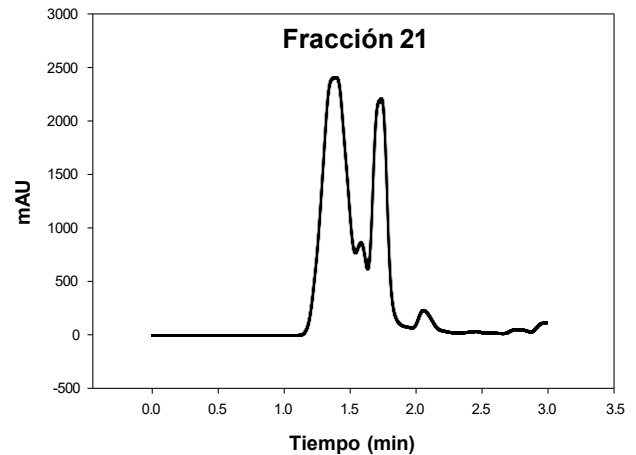
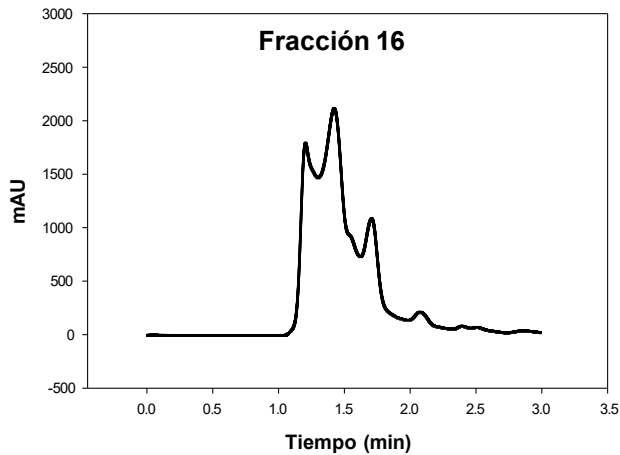
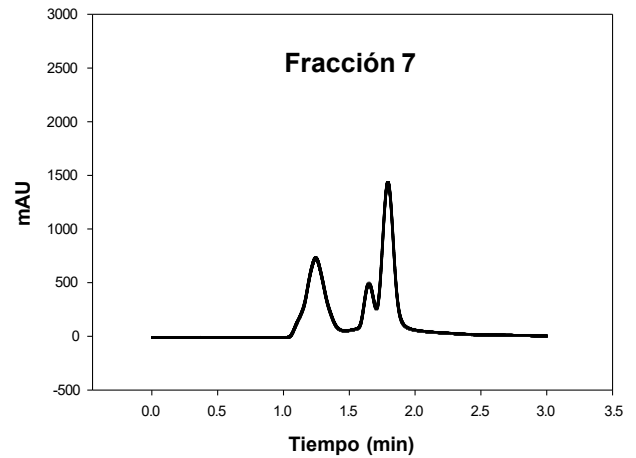
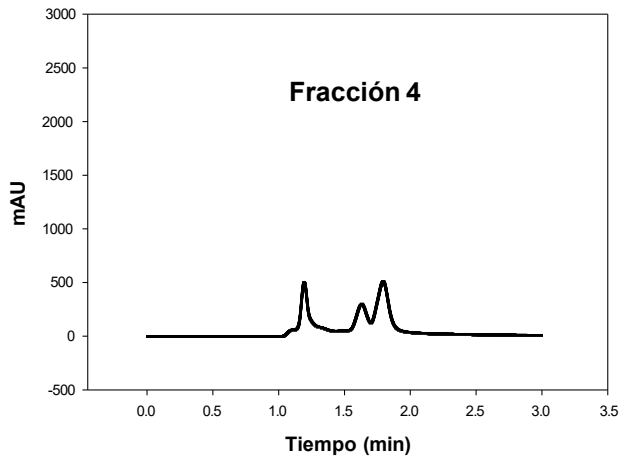
Se colectaron un total de 40 fracciones de 2 mL cada una y se evaluó su actividad antimicrobiana contra SA y CA en placa Elisa.

Placa Elisa

Las fracciones obtenidas mediante cromatografía por filtración en gel que tuvieron la mayor inhibición contra *Staphylococcus aureus* ATCC-25923 y *Candida albicans* ATCC 10231 fueron la 4, 7, 16, 21, 24 y 27.

Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP HPLC)

Se analizaron las fracciones 4, 7, 16, 21, 24 y 27. En las fracciones 4, 7, 16 y 21 se observaron 3 picos mientras que en las fracciones 24 y 27 se observaron 2 picos. El tiempo de elución se encontró entre 60 y 100 segundos (figura 8), los picos fueron separados, colectados, llevados a sequedad y resuspendidos en agua grado HPLC. Posteriormente se evaluó su actividad antimicrobiana.



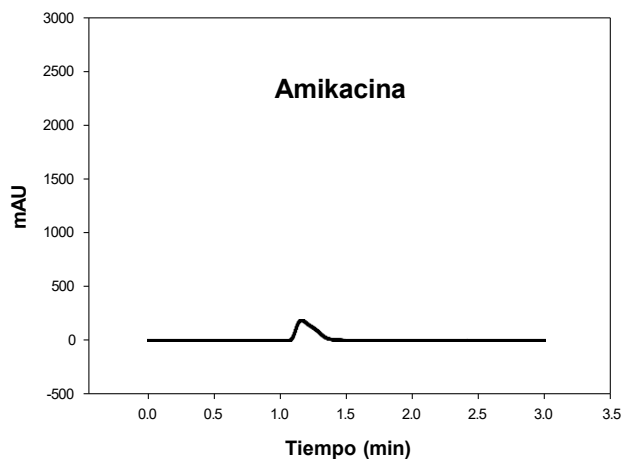


Figura 8. Cromatogramas RP HPLC. Las fracciones evaluadas presentaron tiempos de retención entre 1.0 y 1.8 minutos. Se observaron diferencias tanto en la intensidad como en el número de picos entre las fracciones analizadas, lo que sugiere variaciones en la concentración y en la composición de los metabolitos presentes. Un ejemplo de ello es la fracción 24, la cual mostró dos picos bien definidos: uno con una intensidad cercana a 1500 mAU (fracción 24a) y otro con una intensidad aproximada de 2500 mAU (fracción 24b). Sin embargo, a pesar de presentar una menor intensidad de absorbancia, la fracción 24a inhibió a todos los microorganismos evaluados, mientras que la fracción 24b inhibió a la mayoría de los microorganismos, exceptuando a *Pseudomonas aeruginosa*, lo que indica que la actividad antimicrobiana no depende exclusivamente de la intensidad del pico cromatográfico, sino también de la naturaleza química del metabolito presente.

Inhibición por goteo

Se evaluó la actividad antimicrobiana mediante la técnica de inhibición por goteo contra microorganismos de importancia alimentaria y/o económica (*Listeria monocytogenes* CFQ-103, *Staphylococcus aureus* ATCC-25923, *Escherichia coli* ATCC-25922, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida parapsilosis*).

Los sobrenadantes libres de células (SLC) obtenidos a las 24, 36, 48, 72 y 96 horas mostraron efectos inhibidores, destacándose los tiempos de 36 y 48 horas con mayor actividad. La cepa más sensible fue *S. aureus* ATCC-25923.

Los resultados indican que los SLC de 36 y 48 horas generan halos de inhibición similares frente a bacterias, mientras que contra levaduras el SLC de 48 horas produjo halos de mayor tamaño. Por ello, se seleccionó el SLC de 48 horas para la separación de fases con acetato de etilo. Tras la separación, la fase orgánica se concentró en 5 mL de buffer de fosfatos y la fase acuosa se redujo de 200 a 5 mL. Ambos extractos se evaluaron mediante inhibición por goteo: tanto el extracto acuoso como el orgánico mostraron actividad antimicrobiana, aunque el extracto acuoso generó halos de inhibición mayores (Figura 9).

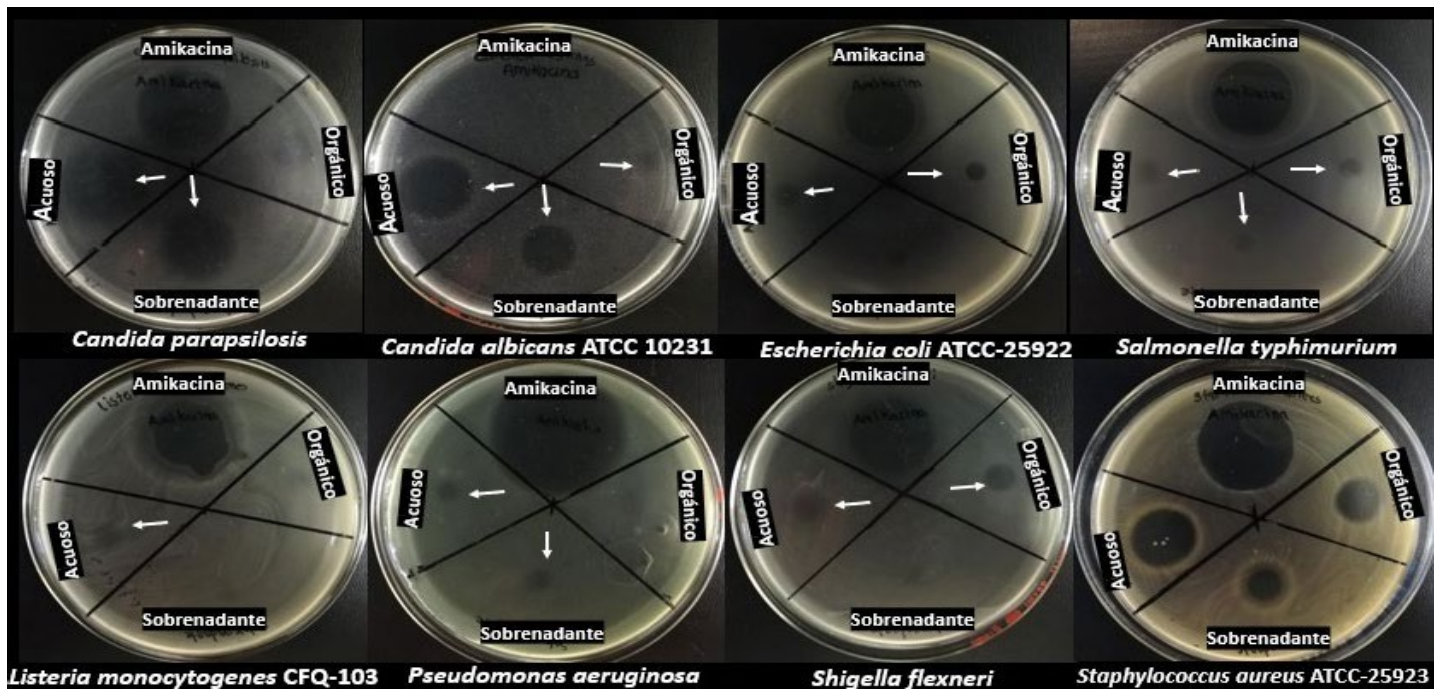


Figura 9. Inhibición por gota. Comparación del efecto inhibitorio de SLC de 48 horas de fermentación, del extracto orgánico y del extracto acuoso. El extracto acuoso tiene efecto inhibitorio contra las bacterias Gram positivas, Gram negativas y levaduras evaluadas.

Este resultado puede estar relacionado con la solubilidad de la xenocumacina, el principal antibiótico producido por *X. nematophila*, el cual es hidrosoluble (Erkoc et al., 2021) y tiene actividad contra bacterias Gram positivas, Gram negativas y hongos (Zhang et al., 2024; Dreyer et al., 2018). En contraste, la actividad del extracto orgánico puede atribuirse a la presencia de indoles y compuestos semivolátiles solubles en acetato de etilo, como se ha reportado para *Xenorhabdus bovienii* y otras cepas (Mollah et al., 2020). La actividad antimicrobiana de las fracciones purificadas mediante RP HPLC se presenta en la tabla 10.

Tabla 10. Actividad antimicrobiana de las fracciones purificadas por RP HPLC

Fracción	SA	LM	SF	ST	EC	PA	CA	CP
4a	+	-	-	-	-	-	-	-
4b	-	-	-	-	-	-	-	-
4c	+	+	+	+	+	+	-	-
7a	+	-	-	-	-	-	-	-
7b	-	-	-	-	-	-	-	-
7c	+	+	-	+	+	+	-	-
16a	-	-	-	-	+	+	+	-
16b	+	-	+	-	-	-	+	+
21a	+	-	-	-	+	+	+	-
21b	+	-	-	-	-	+	-	-
21c	+	+	+	-	-	-	+	+
24a	+	+	+	+	+	+	+	+
24b	+	+	+	+	+	-	+	+
27a	+	-	-	-	-	-	+	+
27b	+	-	-	-	-	+	+	+
Amikacina	+	+	+	+	+	+	-	-

*En esta tabla se muestra de manera resumida la actividad antimicrobiana de las fracciones purificadas por RP HPLC contra los microorganismos evaluados (*Listeria monocytogenes* CFQ-103 (LM), *Staphylococcus aureus* ATCC-25923 (SA), *Escherichia coli* ATCC-25922 (EC), *Salmonella typhimurium* (ST), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Shigella flexneri* (SF) *Candida albicans* ATCC 10231 (CA), *Candida parapsilosis* (CP). El símbolo – refiere que la fracción no fue activa, mientras que, el símbolo + hace referencia a que la fracción presentó actividad antimicrobiana. Se utilizó amikacina como control.*

Conclusiones

- La cinética de crecimiento de *Xenorhabdus nematophila* reveló una fase estacionaria que va de las 24 a las 72 horas.
- Los sobrenadantes libres de células y los extractos concentrados evidenciaron actividad antimicrobiana contra bacterias y levaduras de importancia alimentaria.
- Los metabolitos parcialmente purificados mostraron actividad biológica frente a los microorganismos evaluados, (*Listeria monocytogenes* CFQ-103, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Candida parapsilosis*); destacando la fracción 24a, la cual inhibió el crecimiento de todos los microorganismos analizados.
- La cepa más sensible a los metabolitos parcialmente purificados fue *Staphylococcus aureus* ATCC-25923.
- Este trabajo confirma la viabilidad de aplicar estrategias de separación y concentración de fases para optimizar la recuperación de metabolitos bioactivos y respalda la relevancia de *Xenorhabdus* spp. como biofactorías potenciales para desarrollar agentes antimicrobianos alternativos.

Recomendaciones para trabajos futuros.

Se recomienda continuar con estudios de caracterización estructural, estabilidad, toxicidad y pruebas *in situ* en matrices alimentarias, para validar la aplicabilidad de estos metabolitos como bioconservantes o alternativas a antibióticos convencionales.

Referencias

- Abd-Elgawad, M. M. M. (2022). *Xenorhabdus* spp.: An Overview of the Useful Facets of Mutualistic Bacteria of Entomopathogenic Nematodes. In *Life* (Vol. 12, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/life12091360>
- Barreto-Argilagos, G., Sadrés Cabrera, M., Rodríguez Torrens, H., Guevara-Viera, G. (2010), Agentes bacterianos asociados a brotes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) en Camaguey, Cuba, durante el periodo 2000-2008. *Revista Electronica de Veterinaria*, 11 (2);1-16.
- Bax R.P., Anderson R., Crew J., Fletcher P., Jhonson T., Kaplan E., Knaus B., Kristinsson K., Malek M., Strandberg L. (1998). Antibiotic resistance. What can we do? In *Nature Medicine* (Vol. 4, pp. 545,546).
- Belur, P. D., Inman, F. L., & Holmes, L. D. (2013). Determination of specific oxygen uptake rate of *Photorhabdus luminescens* during submerged culture in lab scale bioreactor. *Biocontrol Science and Technology*, 23(12), 1458–1468. <https://doi.org/10.1080/09583157.2013.840361>
- Bode, E., He, Y., Vo, T. D., Schultz, R., Kaiser, M., & Bode, H. B. (2017). Biosynthesis and function of simple amides in *Xenorhabdus doucetiae*. *Environmental Microbiology*, 19(11), 4564–4575. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13919>
- Boemare A N, N. E. (1988). Biochemical and Physiological Characterization of Colony Form Variants in *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae). In *Journal of General Microbiology* (Vol. 134).
- Booyesen, E., Rautenbach, M., Stander, M. A., & Dicks, L. M. T. (2021). Profiling the production of antimicrobial secondary metabolites by *Xenorhabdus khoisanae* J194 under different culturing conditions. *Frontiers in Chemistry*, 9, 626653. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.626653>
- Chambers, H. F., & DeLeo, F. R. (2009). Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 7, Issue 9, pp. 629–641). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2200>
- Chavarría-Hernández, N., Ortega-Morales, E., Vargas-Torres, A., Chavarría Hernández, J.-C., and Rodríguez-Hernández, A.-I. (2010). Submerged monoxenic culture of the entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae* CABA01, in a mechanically agitated bioreactor: evolution of the hydrodynamic and mass transfer

conditions. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 15, 580–589. <https://doi.org/10.1007/s12257-009-3107-z>

Chen, G., Maxwell, P., Dunphy, G. B., and Webster, J. M. (1996). Culture conditions for *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* symbionts of entomopathogenic nematodes. *Nematologica* 42, 127–130. <https://doi.org/10.1163/187529296x00139>

Clarke, D. J. (2017). The regulation of secondary metabolism in *Photorhabdus*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 402, 81–102. https://doi.org/10.1007/82_2016_21

Cortés-Martínez, C. I., Rodríguez-Hernández, A. I., Ávila-López, M. B., & Chavarría-Hernández, N. (2023). Impact of egg yolk type in liquid culture production of *Steinernema carpocapsae* JAP1 and their virulence. *Biological Control*, 184. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2023.105279>

Crawford, J. M., Kontnik, R., and Clardy, J. (2010). Regulating alternative lifestyles in entomopathogenic bacteria. *Curr. Biol.* 20, 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.10.059>

Darsouei, R., Karimi, J., & Dunphy, G. B. (2019). Functional characterization of outer membrane proteins (OMPs) in *xenorhabdus nematophila* and *photorhabdus luminescens* through insect immune defense reactions. *Insects*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/insects10100352>

Dreyer, J., Malan, A. P., & Dicks, L. M. T. (2018). Bacteria of the Genus *Xenorhabdus*, a Novel Source of Bioactive Compounds. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03177>

Dreyer, J., Rautenbach, M., Booysen, E., van Staden, A. D., Deane, S. M., & Dicks, L. M. T. (2019). *Xenorhabdus khoisanae* SB10 produces Lys-rich PAX lipopeptides and a xenocoumacin in its antimicrobial complex. *BMC Microbiology*, 19(1), 132. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1503-x>

Duchaud, E., Rusniok, C., Frangeul, L., Buchrieser, C., Givaudan, A., Taourit, S., & Dassa, E. (2003). The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Nature biotechnology*, 21(11), 1307.

Ehlers, R.-U. (2001). Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 623–633. <https://doi.org/10.1007/s002530100711>

Erkoc, P., Schmitt, M., Ingelfinger, R., Bischoff-Kont, I., Kopp, L., Bode, H. B., *et al.* (2021). Xenocoumacin 2 reduces protein biosynthesis and inhibits inflammatory and angiogenesis-related processes in endothelial cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 140, 111765. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111765>

Fang, X. L., Han, L. R., Cao, X. Q., Zhu, M. X., Zhang, X., & Wang, Y. H. (2012). Statistical optimization of process variables for antibiotic activity of *Xenorhabdus bovienii*. *PLOS ONE*, 7(6), e38421. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038421>

Feng Ang, X., J., Zhang, W., Wang, Y., & Zhang, X. (2010). Optimization of growth medium and fermentation conditions for improved antibiotic activity of *Xenorhabdus nematophila* TB using a statistical approach. *African Journal of Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.5897/AJB09.1939>

Forst S., Dowds B., Boemare N., Stackebrandt E. (1997). *Xenorhabdus and Photorhabdus spp.* Bugs That Kill Bugs. *Annu. Rev. Microbiol.* 51, 47-72.

Fuchs, S. W., Proschak, A., Jaskolla, T. W., Karas, M., & Bode, H. B. (2011). Structure elucidation and biosynthesis of lysine-rich cyclic peptides in *Xenorhabdus nematophila*. *Organic & biomolecular chemistry*, 9(9), 3130- 3132.

Gómez, G. (2022). *Caracterización de metabolitos antimicrobianos producidos por Xenorhabdus spp. y/o Photorabdsus spp. con potencial de aplicación en la industria de los alimentos* (Maestría en Ciencia de los Alimentos), Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Tulancingo; Hgo. México.

Gonzales-Flores, T. & Rojas-Herrera, R.A. (2005). Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud pública de México*, 47(5): 388-390. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/spm/v47n5/28385.pdf>

Gülşen, S. H., Tileklioglu, E., Bode, E., Çimen, H., Ulug, D., Touray, M., ... & Hazir, S. (2022). Antiprotozoal activity of different *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacterial secondary metabolites and identification of bioactive compounds using the easyPACId approach. *Scientific Reports*, 12, 10779. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13722-z>.

Guo, S., Zhang, S., Fang, X., Liu, Q., Gao, J., Bilal, M., Wang, Y., & Zhang, X. (2017a). Regulation of antimicrobial activity and xenocoumacins biosynthesis by pH in *Xenorhabdus nematophila*. *Microbial Cell Factories*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0813-7>

Herbert, E. E., & Goodrich-Blair, H. (2007). Friend and foe: The two faces of *xenorhabdus nematophila*. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 5, Issue 8, pp. 634–646). <https://doi.org/10.1038/nrmicro1706>

Hinchliffe, S. J., Hares, M. C., & Dowling, A. J. (2010). Insecticidal toxins from the *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* bacteria. *The Open Toxicology Journal*, 3(1).

Jin, G., Khan, F., & Kim, Y. (2024). A Comparative Analysis of Different *Xenorhabdus* Strains Reveals a Virulent Factor, Cyclic Pro-Phe, Using a Differential Expression Profile Analysis of Non-Ribosomal Peptide Synthetases. *Insects*, 15(9), 710. <https://doi.org/10.3390/insects15090710>

Kaya, H. K., & Stock, S. P. (1997). Techniques in insect nematology. En L. A. Lacey (Ed.), *Manual of techniques in insect pathology* (pp. 281–324). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012432555-5/50016-6>

Kim, S. K., Flores-Lara, Y., & Patricia Stock, S. (2012). Morphology and ultrastructure of the bacterial receptacle in *Steinernema* nematodes (Nematoda: *Steinernematidae*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(3), 366–374. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.04.011>

Kooliyottil, R., Inman, F., Mandjiny, S., & Holmes, L. (2014). Physiological Constants of the Entomopathogenic Bacterium *Xenorhabdus nematophila* Determined by Microbial Growth Kinetics. *ISRN Microbiology*, 2014, 1–4. <https://doi.org/10.1155/2014/834054>

Lacey, L. A., & Georgis, R. (2012). Entomopathogenic Nematodes for Control of Insect Pests Above and Below Ground with Comments on Commercial Production. In *Journal of Nematology* (Vol. 44, Issue 2).

Martens, E. C., Heungens, K., & Goodrich-Blair, H. (2003). Early colonization events in the mutualistic association between *Steinernema carpocapsae* nematodes and *Xenorhabdus nematophila* bacteria. *Journal of Bacteriology*, 185(10), 3147–3154. <https://doi.org/10.1128/JB.185.10.3147-3154.2003>

- Maxwell, P. W., Chen, G., Webster, J. M, and Dunphy, G. B. (1994). Stability and activities of antibiotics produced during infection of the insect *Galleria mellonella* by two isolates of *Xenorhabdus nematophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 715–721.
- McInerney, B. V., Taylor, W. C., Lacey, M. J., Akhurst, R. J., and Gregson, R. P. (1991b). Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp., part 2. Benzopyran-1-one derivatives with gastroprotective activity. In *Journal of natural products* 54, 785–795.
- Mollah, M. M. I., Roy, M. C., Choi, D. Y., Hasan, M. A., Al Baki, M. A., Yeom, H. S., & Kim, Y. (2020). Variations of Indole Metabolites and NRPS-PKS Loci in Two Different Virulent Strains of *Xenorhabdus hominickii*. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.583594>
- Otoya-Martinez, N., Touray, M., Cimen, H., Bode, E., Bode, H. B., Hazir, S., Chacon-Orozco, J. G., Bueno, C. J., & Leite, L. G. (2025). *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* Metabolites for Fungal Biocontrol and Application in Soybean Seed Protection. *Journal of Fungi*, 11(10), 691. <https://doi.org/10.3390/jof11100691>
- Reimer, D., Luxenburger, E., Brachmann, A. O., & Bode, H. B. (2009). A new type of pyrrolidine biosynthesis is involved in the late steps of xenocoumacin production in *Xenorhabdus nematophila*. *ChemBioChem*, 10(12), 1997-2001.
- Reimer, D., Cowles, K. N., Proschak, A., Nollmann, F. I., Dowling, A. J., Kaiser, M., French-Constant, R., Goodrich-Blair, H., & Bode, H. B. (2013). Rhabdopeptides as insect-specific virulence factors from entomopathogenic bacteria. *ChemBioChem*, 14(15), 1991–1997. <https://doi.org/10.1002/cbic.201300205>
- Reimer, D., Nollmann, F. I., Schultz, K., Kaiser, M., & Bode, H. B. (2014). Xenortide biosynthesis by entomopathogenic *Xenorhabdus nematophila*. *Journal of natural products*, 77(8), 1976-1980.
- Rodríguez H., Sedrés, M., Barreto, G., Guevara, G., Bertot, J., Martínez, S. (2011). Serogrupos de *Salmonella* en alimentos y coprocultivos. *Rev. Prod. Anim*; 23 (2): 121-124.
- Rosas, MR. (2007). Contaminaciones alimentarias. Cuadros principales, tratamiento y prevención. En *Nutrición*, 25(6): 95-100. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13107676>
- Schimming, O., Fleischhacker, F., Nollmann, F. I., & Bode, H. B. (2014). Yeast homologous recombination cloning leads to the novel peptides ambactin and xenolindicin. *ChemBioChem*, 15(9), 1290–1294.

<https://doi.org/10.1002/cbic.201402065>

Schneider K.R., Parish M.E., Goodrich R.M. & Cookingham, T. (2004). Preventing Foodborne Illness: *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis*. Florida Cooperative Extension Services, EDIS FSHN036.

Shi, Y. M., & Bode, H. B. (2018). Chemical language and warfare of bacterial natural products in bacteria– nematode– insect interactions. *Natural product reports*, 35(4), 309-335.

Shobhi Chaudhary, Singh, G., Gupta, N., Ghosh, C., & Rathore, J. S. (2023). New face in the row of bioactive compounds and toxin-antitoxin modules: *Xenorhabdus nematophila*. In *Journal of Asia-Pacific Entomology* (Vol. 26, Issue 4). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2023.102148>

Stock, S. P. (2019). Partners in crime: symbiont-assisted resource acquisition in *Steinernema* entomopathogenic nematodes. In *Current Opinion in Insect Science* (Vol. 32, pp. 22–27). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.10.006>

Tobias, N. J., Wolff, H., Djahanschiri, B., Grundmann, F., Kronenwerth, M., Shi, Y. M., Simonyi, S., Grün, P., Shapiro-Ilan, D., Pidot, S. J., Stinear, T. P., Ebersberger, I., & Bode, H. B. (2017). Natural products diversity associated with the nematode symbionts *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. *Nature Microbiology*, 2(12), 1676– 1685. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0039-9>

Ujszegi, J., Boros, Z., Fodor, A., Vajna, B., Hettyey, A., et al. (2023). Metabolites of *Xenorhabdus* bacteria are potent candidates for mitigating amphibian chytridiomycosis. *AMB Express*, 13, 88. <https://doi.org/10.1186/s13568-023-01585-0>.

Wang, Y. H., Li, Y. P., Zhang, Q., & Zhang, X. (2008). Enhanced antibiotic activity of *Xenorhabdus nematophila* by medium optimization. *Bioresource Technology*, 99(6), 1708–1715. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.03.053>

Wang, Y., Fang, X., An, F., Wang, G., and Zhang, X. (2011a). Improvement of antibiotic activity of *Xenorhabdus bovienii* by medium optimization using response surface methodology. *Microb. Cell Fact.* 10, 98. doi:10.1186/1475-2859-10-98

Woolhouse, M. E. J., Webster, J. P., Domingo, E., Charlesworth, B., & Levin, B. R. (2002). Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts. *Nature Genetics*, 32(4), 569–577. <https://doi.org/10.1038/ng1202-569>

Xiufen, Y., Huaiwen, Y., Heng, J., and Zheng, L. (2001). Effect of fermentation conditions on antibiotic production of *Xenorhabdus nematophilus*. *Wei sheng wuxue tong bao* 28, 12–16

Zhang, S., Han, Y., Wang, L., Han, J., Yan, Z., Wang, Y., & Wang, Y. (2024). Antifungal Activity and Mechanism of Xenocoumacin 1, a Natural Product from *Xenorhabdus nematophila* against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Fungi*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/jof10030175>

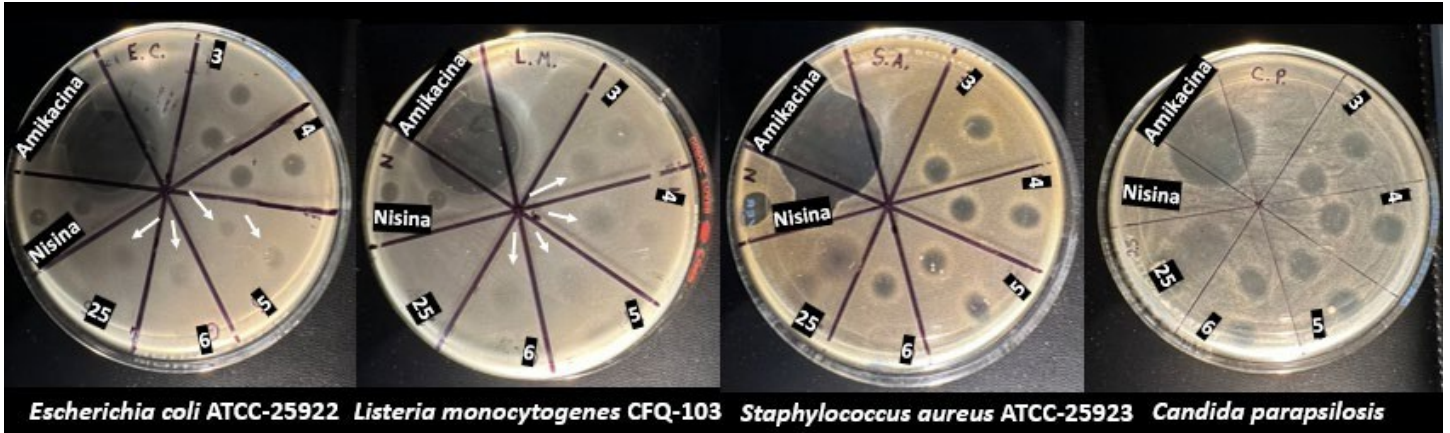
Anexos

Aspecto de las 40 fracciones colectadas mediante cromatografía de permeación en gel



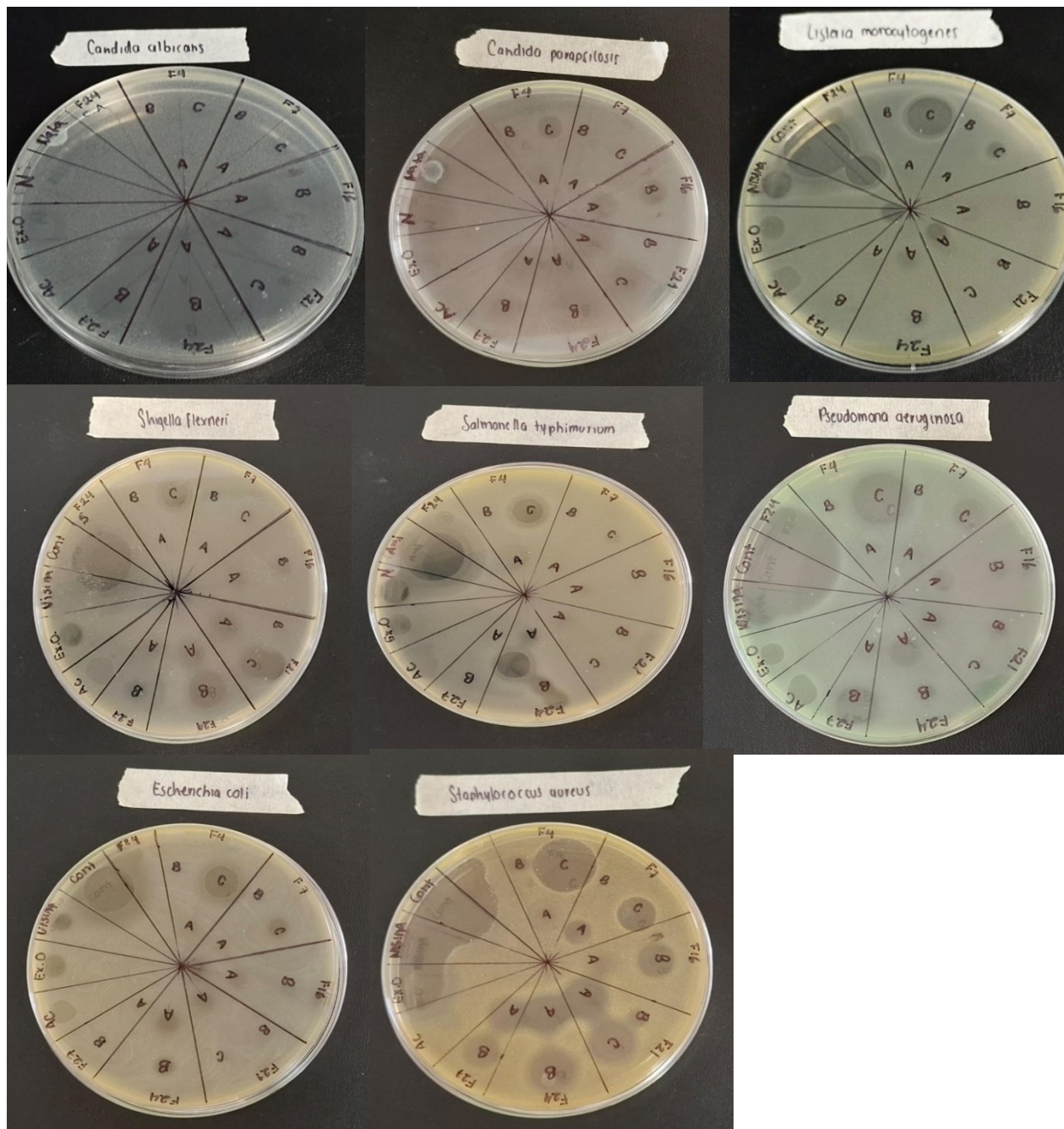
En la fotografía se muestra el cambio de color en las diferentes fracciones colectadas, las primeras fracciones colectadas muestran nula coloración para después tomar coloraciones marrones y nuevamente tornarse traslucidas. Las coloraciones más intensas se observan de la fracción 8 a la 15, sin embargo, estas fracciones no tuvieron actividad biológica contra los microorganismos evaluados, por lo que el color podría deberse a restos del medio de cultivo.

Halos de inhibición de las fracciones purificadas por cromatografía de permeación en gel



Ensayo de prueba de inhibición por gota usando las fracciones obtenidas por cromatografía de permeación en gel, se observa que la cepa de *Staphylococcus aureus* fue aparentemente la más susceptible a los compuestos presentes en las fracciones evaluadas.

Halos de inhibición de las fracciones purificadas por HPLC



Estas fotografías dan respaldo visual a la información proporcionada en la tabla 10



UANL

CA

UNIVERSIDAD DE
GUANAJUATO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN (FCB)
UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO (DICIVA)
OTORGAN LA PRESENTE

CONSTANCIA

A: David Servando Macías Leon, Diana Cacahuatitla Hernández, Carolina Burgos González, Nayeli Shantal Castrejón Jiménez, Víctor Manuel Martínez Juárez, Norberto Chavarria Hernández

Constancia No. CA2025PC018

Por su participación como **PONENTE** en modalidad **CARTEL (CA-24)**, cuyo título es "**Recovery and partial purification of metabolites with antimicrobial activity, produced by *Xenorhabdus spp.* in batch fermentations**" en el

**XXVI CONGRESO NACIONAL DE CIENCIA Y
TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**XI CONGRESO INTERNACIONAL SOBRE INNOVACIÓN Y
TENDENCIAS EN PROCESAMIENTO DE ALIMENTOS**

evento llevado a cabo los días **21 al 23** de Mayo en la Facultad de Ciencias Biológicas (UANL).

San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México a, 23 de Mayo de 2025

M.C. Karla Gpe. García Alanis
Jefe de la Licenciatura en
Ciencia de Alimentos y
Coordinadora del evento
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Autónoma de Nuevo
León.

Dr. Juan Gabriel Báez González
Jefe del Departamento de
Alimentos
y Coordinador del evento
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Autónoma de Nuevo
León.

Dra. Ma. Del Rosario Abraham Juárez
Coordinadora del evento
División de Ciencias de la Vida
Campus Irapuato Salamanca
Universidad de Guanajuato

2025