

Isolation and identification of Methamidophos-tolerant bacteria from agricultural soils in Arequipa, Peru

Harry Ricardo Yucra-Condori, MSc.¹, Celia Choquenaira-Quispe, MSc.², Elvis Gilmar Gonzales-Condori, MSc.³,
J. Kenedy Ramirez, MSc.²

¹Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Perú, hyucrac@unsa.edu.pe

²Universidad Católica de Santa María, Perú, gfcelia@gmail.com, juan.ramirezch@ucsm.edu.pe

³Universidad Tecnológica del Perú, Perú, elvgonzalesc@gmail.com

*Abstract- The use of organophosphate pesticides in Arequipa is due to their effectiveness in pest control despite restrictions imposed by government institutions, their use is still common and the impact on ecosystems and human health continues to be a major environmental problem. The persistence of these agrochemicals in soils and water makes it necessary to use new degradation methods. In the present investigation, bacteria were isolated from soils with a history of contamination with methamidophos. The strains extracted from soil samples were cultured in a mineral saline medium contaminated with methamidophos (100 mg L⁻¹) until purification, then the isolated strains were identified through the observation of cultural characteristics, biochemical tests, and molecular sequencing. The bacteria identified, tolerant to the presence of methamidophos as the sole carbon source, are: *Priestia Megaterium* (KU555935) and *Bacillus licheniformis* (KU524076). This research aims to contribute to the development of biotechnology focused on the isolation and identification of microorganisms in order to provide alternatives for the identification of bacteria with the potential to degrade OPs.*

Key words: Methamidophos, organophosphorus pesticide, isolation, identification

Digital Object Identifier (DOI):

<http://dx.doi.org/10.18687/LACCEI2022.1.1.418>

ISBN: 978-628-95207-0-5 ISSN: 2414-6390

Aislamiento e identificación de bacterias tolerantes a metamidofos de suelos agrícolas en Arequipa - Perú

Harry Ricardo Yucra-Condori, MSc.¹, Celia Choquenaira-Quispe, MSc.², Elvis Gilmar Gonzales-Condori, MSc.³, J. Kenedy Ramirez, MSc.²

¹Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Perú, hyucrac@unsa.edu.pe

²Universidad Católica de Santa María, Perú, qfcelia@gmail.com, juan.ramirezsch@ucsm.edu.pe

³Universidad Tecnológica del Perú, Perú, elvgonzalesc@gmail.com

Resumen– El uso de pesticidas organofosforados en Arequipa se debe a su efectividad en el control plagas a pesar de las restricciones impuestas por las instituciones gubernamentales, su uso sigue siendo común y el impacto sobre los ecosistemas y la salud humana sigue siendo un problema ambiental importante. La persistencia de estos agroquímicos en suelos y agua, hace necesario el uso de nuevos métodos de degradación. En la presente investigación se aisló bacterias de suelos con antecedentes de contaminación con metamidofos, se cultivó las cepas extraídas de muestras de suelo en un medio salino mineral contaminado con metamidofos (100 mg L⁻¹) hasta su purificación, posteriormente se identificó las cepas aisladas a través de la observación de características culturales, pruebas bioquímicas y secuenciación molecular. Las bacterias identificadas, tolerantes a la presencia de metamidofos como única fuente de carbono, son: *Priestia Megaterium* (KU555935) y *Bacillus licheniformis* (KU524076). Con la presente investigación se pretende contribuir al desarrollo de la biotecnología centrada al aislamiento e identificación de microorganismos con la finalidad brindar alternativas para la identificación de bacterias con potencial para degradar OP's.

Palabras clave: Metamidofos, pesticida organofosforado, aislamiento, identificación.

Abstract- The use of organophosphate pesticides in Arequipa is due to their effectiveness in pest control despite restrictions imposed by government institutions, their use is still common and the impact on ecosystems and human health continues to be a major environmental problem. The persistence of these agrochemicals in soils and water makes it necessary to use new degradation methods. In the present investigation, bacteria were isolated from soils with a history of contamination with methamidophos. The strains extracted from soil samples were cultured in a mineral saline medium contaminated with methamidophos (100 mg L⁻¹) until purification, then the isolated strains were identified through the observation of cultural characteristics, biochemical tests, and molecular sequencing. The bacteria identified, tolerant to the presence of methamidophos as the sole carbon source, are: *Priestia Megaterium* (KU555935) and *Bacillus licheniformis* (KU524076). This research aims to contribute to the development of biotechnology focused on the isolation and identification of microorganisms in order to provide alternatives for the identification of bacteria with the potential to degrade Ops.

Key words: Methamidophos, organophosphorus pesticide, isolation, identification.

I. INTRODUCCIÓN

En la producción agrícola Arequipeña se utiliza una gran variedad de productos químicos capaces de ayudar con el control de plagas persistentes [1], un grupo de agroquímicos muy utilizado son los organofosforados (OP's), que son muy peligrosos ya que inhiben la acetilcolinesterasa, previniendo la descomposición de la acetilcolina en el sistema nervioso, lo que conduce a la acumulación de acetilcolina en las terminaciones nerviosas que produce parálisis [2], por otro lado hay estudios que demuestran la relación entre los OP's con el linfoma no Hodgkin [3]. Por lo antes mencionado, se ha restringido el uso de los OP's, a pesar de ello los agricultores siguen utilizando ilegalmente estos pesticidas debido a que otros agroquímicos alternativos resultan mucho más costosos y poco eficientes [4].

El metamidofos es un organofosforado con una alta solubilidad en agua y una capacidad de acumulación que muchas veces supera la capacidad de depuración del suelo [5], por su alta solubilidad representa una amenaza potencial para ecosistemas acuáticos y terrestres, así como para la salud humana [6].

Muchas bacterias tienen el potencial de usar pesticidas específicos como fuente de carbono, fósforo, nitrógeno y azufre, es por ello la degradación de contaminantes con bacterias se considera un método seguro y eficaz. Existen diversas propuestas para degradar el metamidofos residual en suelo y agua, muchas de estas propuestas están enmarcadas en el uso de bacterias capaces de crecer en medios contaminados con metamidofos. Las *Pseudomonas sp. S-2* [7] y *Rhodopseudomonas plaustris sp HP-1* [8], son dos cepas muy conocidas por su capacidad de crecer en sustratos contaminados por metamidofos, por otro lado diversos estudios han centrado su atención en diferentes especies de *Pseudomonas* (*P. azotoformans*, *P. aeruginosa* y *P. putida*) siendo la *P. aeruginosa* la que mayor capacidad degradadora presenta [9], sin embargo, muchas bacterias son patógenas, en ese sentido es importante encontrar nuevos microorganismos no patógenos. El género *Bacillus* tiene capacidad degradadora frente a deltametrina [10], clorpirifos [11], glifosato [12], mesotriona [13], por citar algunos, sin embargo no hay estudios recientes sobre la capacidad degradadora de este género frente al metamidofos. La etapa más importante en la desintoxicación de los compuestos organofosforados es la hidrólisis [14]. La

enzima responsable de catalizar esta reacción se denomina esterasa o fosfotriesterasa presente en la

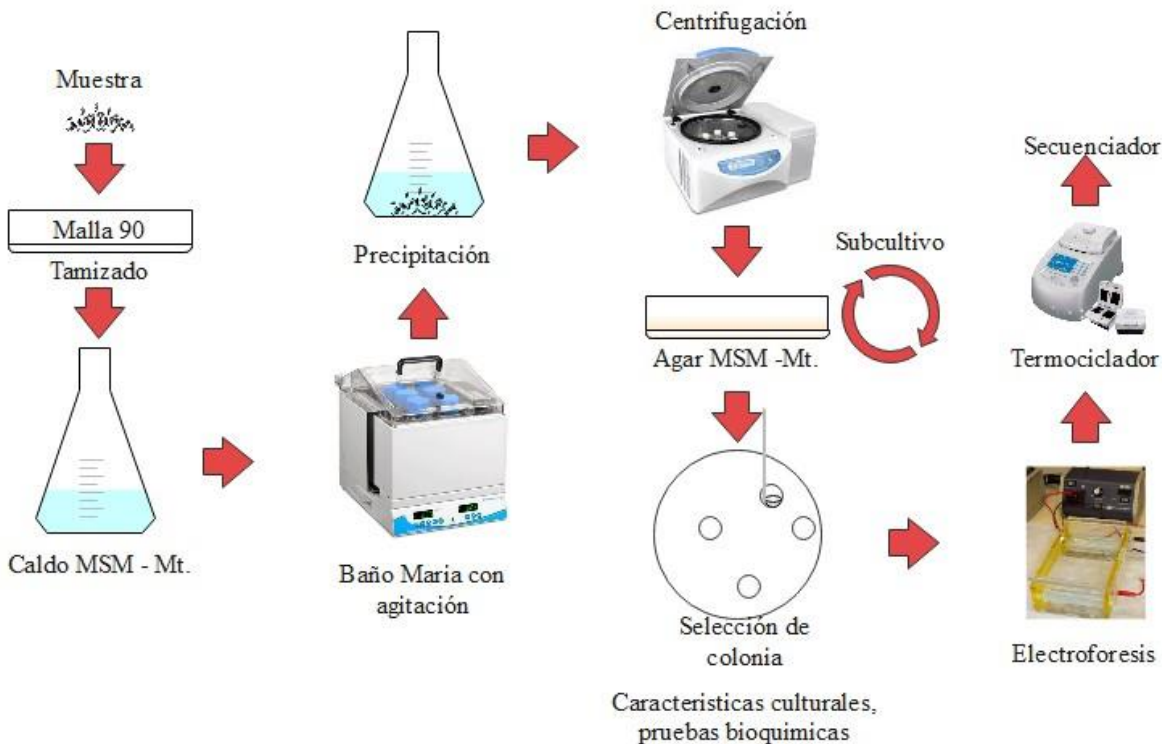


Figura 1. Diagrama esquemático del procedimiento de aislamiento e identificación de bacterias tolerantes a metamidofos.

Pseudomona diminuta MG y *Flavobacterium* ATCC 27551 [15].

La toxicidad del metamidofos sobre las poblaciones bacterianas totales se suponían significativos, sin embargo diversos estudios mostraron que las poblaciones microbianas disminuían inicialmente a concentraciones de 100 a 300 $\mu\text{g g}^{-1}$, pero se recuperaban rápidamente, esto podría indicar que estos contaminantes podrían ser utilizados como fuente de carbono [16][17].

Esta investigación busca establecer los procedimientos para el aislamiento e identificación de dos cepas aisladas a partir de suelos agrícolas de la región de Arequipa con la capacidad de tolerar altas concentraciones de metamidofos y con potencial capacidad degradadora de este OP.

II. MATERIALES Y METODOS

A. Reactivos y químicos

El metamidofos de grado analítico PESTANAL® ($\geq 98.0\%$ de pureza) se compró a Sigma Aldrich. Las enzimas, el marcador y el tampón para la PCR se obtuvieron de Sangon Shanghai, China. Todos los demás productos químicos, si no se indica lo contrario, utilizados para los medios de cultivo se compraron Sigma Aldrich, EE. UU.

B. Recojo de muestras para enriquecimiento

En este estudio se utilizaron dos muestras ambientales para el aislamiento de microorganismos tolerantes de metamidofos. Ambas muestras de suelo se recogieron en diferentes lugares donde se ha aplicado metamidofos al menos los últimos 5 años en el Valle de Vitor, distrito de la provincia y departamento de Arequipa, Perú. Las coordenadas de los lugares de muestreo fueron: -16.481994, -71.946373 y -16.465233, -71.928162. Las muestras recogidas se transportaron y almacenaron a 4°C.

C. Aislamiento de bacterias tolerantes a metamidofos mediante cultivo de enriquecimiento

Se utilizó el método descrito por Gonzales [18]. Se utilizó un medio salino mineral (MSM) [19] compuesto por K_2HPO_4 0,225; KH_2PO_4 0,225; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,225; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05; CaCO_3 0,005; y $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,005 en g L^{-1} disueltos en agua destilada. Este medio fue esterilizado y luego se adicionó 100 mg L^{-1} de metamidofos (MSM-Mt). El medio sólido para el aislamiento se preparó añadiendo 20 g de agar por litro de MSM. Así mismo para garantizar la extracción más limpia se utilizó tritón x 10 al 0.01% antes de colocar las muestras en el MSM.

D. Procedimiento de aislamiento

Se utilizó el método de aislamiento de Lansing M. Prescott, 2002 y Gonzales [18], con algunas modificaciones. Las muestras de suelo se tamizaron a través de un tamiz de malla 90 para eliminar las piedras y el material vegetal. A continuación,

se colocaron 10 g de suelo en un matraz cónico de 250 mL que contenía 100 mL del medio de aislamiento (MSM-Mt) y se incubó a 30 °C en un agitador rotatorio a 150 rpm durante 2 días. A continuación, se dejaron los frascos durante unas horas para que las partículas del suelo se asentaran, para obtener cultivos puros de cepas individuales, se centrifugaron alícuotas de 5 mL de cultivos de enriquecimiento a 3000 rpm durante 5 minutos y los pellets de células se resuspendieron en 2 mL de medio estéril. Se colocaron alícuotas de esta suspensión en placas de agar MSM- Mt. Las placas inoculadas se incubaron en condiciones aeróbicas a 30°C y se aislaron colonias discretas.

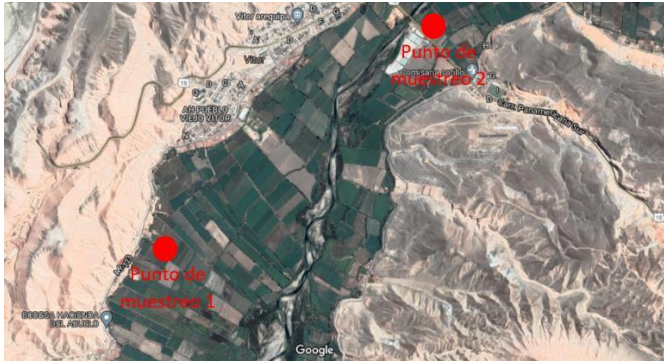


Figura 2. Ubicación de los puntos de muestreo compuesto de suelos contaminados.

Las colonias resultantes se subcultivaron repetidamente en el mismo medio (MSM con 100 mgL⁻¹ de metamidofos) para confirmar su capacidad de tolerancia a metamidofos. Todas las colonias se transfirieron a un medio estéril fresco para obtener un cultivo puro. Se seleccionaron dos cepas, que poseían la mayor capacidad de crecimiento (como se muestra en la Figura 1), para su posterior investigación.

E. Identificación de las cepas aisladas

Las pruebas morfológicas (características culturales), fisiológicas y bioquímicas de los aislados se realizaron utilizando métodos estándar. Las cepas bacterianas se identificaron taxonómicamente a partir del Manual de bacteriología sistemática de Bergey [20] como *Bacillus* sp. y se confirmó mediante la secuenciación del gen 16S rRNA.

F. Aislamiento del ADN genómico y secuenciación del gen 16S rRNA

El ADN genómico se aisló mediante procedimientos bacterianos estándar [21]. Se utilizaron los siguientes cebadores para la amplificación por PCR del gen que codifica el rRNA 16S: 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492r (5' TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Las mezclas de PCR (50 µl) contenían 10µM de cada cebador, tampón de PCR, 5 U de Taq ADN polimerasa, BSA 10µM y 2µl de ADN. Las condiciones de termociclaje consistieron en un paso de desnaturalización a 94°C durante 3 min, 28 ciclos de

amplificación de 94°C durante 20 s, 58°C durante 40 s y 72°C durante 1 min y una polimerización final durante 3 min 30 s con un termociclador. Los productos de la PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1,0% con Gel Doc 2000 (Bio-Rad USA). Los productos de la PCR se purificaron y se secuenciaron. Las similitudes de las secuencias de nucleótidos se determinaron mediante BLAST (bases de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica).

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se aislaron dos microorganismos de las muestras de suelo expuestas al metamidofos mediante el método descrito anteriormente. Todas las cepas aisladas tenían la capacidad de tolerar el plaguicida. Las cepas identificadas fueron subestimadas para estudios posteriores.

Mediante la secuenciación del gen 16S rRNA de las cepas y su comparación con las secuencias del gen 16S rRNA, las cepas se clasificaron como miembros del género *Bacillus*. La secuencia de la cepa M3 mostró la mayor identidad (99%) con el gen 16S rRNA de *Priestia Megaterium* (KU555935) [22] y la cepa M5 mostró (100%) similitudes con *Bacillus licheniformis* (KU524076) [23].

La Figura 3 muestra la forma de los microorganismos aislados siendo tanto la cepa M3 y la cepa M5 bacilos gram positivos móviles, estas características son descritas por Imke [24].

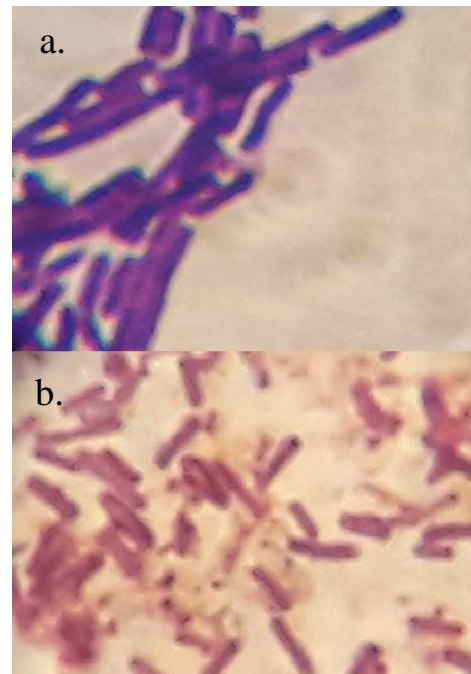


Figura 3. Vista microscópica x 100 de (a) *Priestia megaterium* (KU555935), (b) *Bacillus licheniformis* (KU524076).

En la tabla 1 se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a las dos cepas aisladas, los resultados son relativamente semejantes a algunas pruebas bioquímicas descritas por Das [25].

Tabla 1. Pruebas bioquímicas para las dos cepas aisladas.

Prueba bioquímica	M3	M5
TSI (fermentación de azúcares)	- (K/K)	- (K)
Producción de H ₂ S	-	-
LIA (des carboxilación de lisina)	+	+
OF (oxidasa)	+	+
UREASA	+	+
CITRATO	-	-
SIM	S (ácido)	-
	I (indol)	-
	M (movilidad)	+
MR-VP	-	-

La tabla 2 muestra las características culturales de las colonias aisladas de las 2 cepas identificadas, como puede notarse hay diferencias en la forma y borde de las dos colonias, esto debido al tipo de crecimiento que desarrollan los dos tipos de bacterias.

Tabla 2. Características culturales para las cepas aisladas.

Características culturales	M3	M5
Tipo de célula (forma)	Redonda (estreptobacilo)	Flor (bacilo)
Color en agar	Blanco	Blanco
Elevación	Convexa - entera	Convexa - irregular
Superficie	Lisa	Irregular

El estudio antibiograma mostró la sensibilidad de las 2 cepas a los principales antibióticos, esto sugiere la baja peligrosidad de estas cepas [26].

Tabla 3. Resistencia a antibióticos.

Resistencia a antibióticos	M3	M5
Vancomicina (VA)	Muy sensible	Muy sensible
Oxitetraciclina	Muy sensible	Muy sensible
Neomicina	Sensible	Muy sensible
Novobiocina	Muy sensible	Muy sensible
Oxacilina	Sensible	Muy sensible
Ceftriaxona	Muy sensible	Muy sensible
Bacitracina	Muy sensible	Muy sensible

Las cepas aisladas y caracterizadas tienen la capacidad de utilizar al metamidofos como fuente de carbono, fósforo, nitrógeno y azufre, algunos autores han identificado la cepa BHS1 de *Priestia (Bacillus) megaterium*, en agua alcalina

tomada de Mavi Gölü (Blue Lake, Turquía), concluyendo que esta cepa puede crecer en un medio mínimo que contenga ácido 2,2-dicloropropiónico, sin embargo la presente investigación amplía las características de los medios de cultivo donde este microorganismo puede crecer, en la figura 4 se muestra el árbol filogenético de *Priestia (Bacillus) megaterium* (KU555935). [27].

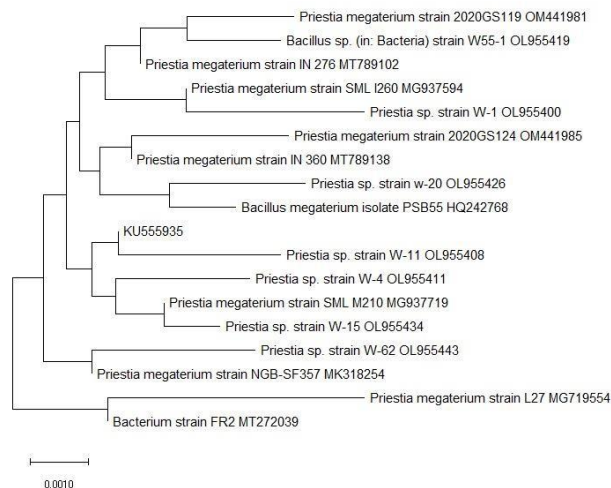


Figura 4. Árbol filogenético de la cepa *Priestia (bacillus) megaterium* (KU555935).

El *Bacillus licheniformis* es una bacteria del suelo Gram-positiva, formadora de esporas, que se utiliza en la industria biotecnológica para fabricar enzimas, antibióticos, productos bioquímicos y productos de consumo, además gracias a la presente investigación se conoce que es capaz de tolerar el metamidofos lo que permitiría sugerir su aplicación como posible degradador de este OP, en la figura 5 se muestra el cromosoma circular de la cepa *Bacillus Lincheniformis* (KU524076) [27] [28].

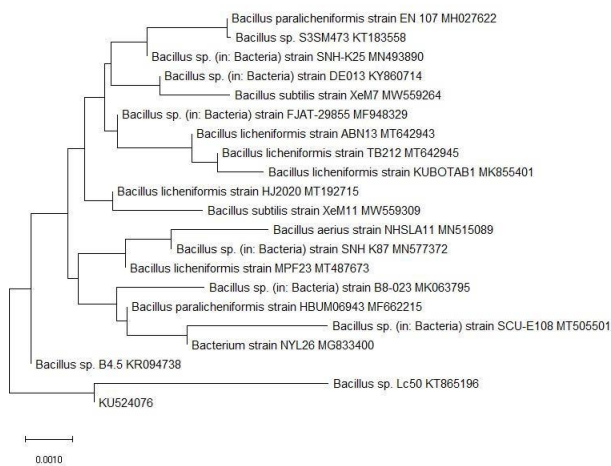


Figura 5. Árbol filogenético de la cepa *Bacillus Lincheniformis* (KU524076).

IV. CONCLUSIONES

En este estudio se aislaron dos bacterias con potencial para degradar metamidofos las cuales se identificaron como *Priestia Megaterium* (KU555935) y *Bacillus licheniformis* (KU524076), se obtuvieron las principales características bioquímicas, culturales y moleculares de estas cepas aisladas de suelos contaminados con metamidofos en el Valle de Vitor, Arequipa, Perú.

Con la presente investigación se pretende contribuir al desarrollo de la biotecnología centrada al aislamiento e identificación de microorganismos con la finalidad brindar alternativas para la identificación de bacterias con potencial para degradar OP's y remediar zonas afectadas con estos contaminantes.

REFERENCIAS

- [1] S. Ganesan, M. J. Dickson, and A. F. Keating, "Pesticides," *Encyclopedia of Reproduction*, pp. 724–730, Jan. 2018, doi: 10.1016/B978-0-12-801238-3.64412-4.
- [2] F. Uwaifo and F. John-Ohimai, "Dangers of organophosphate pesticide exposure to human health," *Matrix Science Medica*, vol. 4, no. 2, p. 27, 2020, doi: 10.4103/MTSM.MTSM_2_20.
- [3] S. Koutros *et al.*, "Non-Hodgkin lymphoma risk and organophosphate and carbamate insecticide use in the north American pooled project," *Environment International*, vol. 127, pp. 199–205, Jun. 2019, doi: 10.1016/J.ENVINT.2019.03.018.
- [4] J. Kaushal, M. Khatri, and S. K. Arya, "A treatise on Organophosphate pesticide pollution: Current strategies and advancements in their environmental degradation and elimination," *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 207, p. 111483, Jan. 2021, doi: 10.1016/J.ECOENV.2020.111483.
- [5] V. Lúcia Scherholz de Castro and S. Heloísa Chiorato, "Effects of separate and combined exposure to the pesticides methamidophos and chlorothalonil on the development of suckling rats," *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, vol. 210, no. 2, pp. 169–176, Mar. 2007, doi: 10.1016/J.IJHEH.2006.09.003.
- [6] M. C. Wang *et al.*, "Impacts of methamidophos on the biochemical, catabolic, and genetic characteristics of soil microbial communities," *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 40, no. 3, pp. 778–788, Mar. 2008, doi: 10.1016/J.SOILBIO.2007.10.012.
- [7] W. Xiaowei *et al.*, "Study on degradation of methamidophos by *Pseudomonas* sp. S-2," *Shengwu Jishu = Biotechnology*, vol. 15, no. 1, pp. 77–79, Jan. 2005, Accessed: Feb. 15, 2022. [Online]. Available: <https://europepmc.org/article/cba/520259>.
- [8] D. Y. Zhang *et al.*, "Isolation of photosynthetic bacteria HP-1 with degradation of organio-phosphorus insecticides and studies on its biodegradation ability and capacity of increasing growth," *Life Sci Res*, vol. 9, no. 3, pp. 247–253, 2005.
- [9] S. Singh *et al.*, "Kinetic Study of the Biodegradation of Acephate by Indigenous Soil Bacterial Isolates in the Presence of Humic Acid and Metal Ions," *Biomolecules* 2020, Vol. 10, Page 433, vol. 10, no. 3, p. 433, Mar. 2020, doi: 10.3390/BIOM10030433.
- [10] A. Makalesi, Ö. Gür Özdal, and F. Algur, "Isolation and identification of the pyrethroid insecticide deltamethrin degrading bacteria from insects," *European Journal of Science and Technology*, no. 18, pp. 905–910, Apr. 2020, doi: 10.31590/EJOSAT.677008.
- [11] M. S. Elshikh, K. M. Alarjani, D. S. Huessien, H. A. M. Elnahas, and A. R. Esther, "Enhanced Biodegradation of Chlorpyrifos by *Bacillus cereus* CP6 and *Klebsiella pneumoniae* CP19 from municipal waste water," *Environmental Research*, vol. 205, p. 112438, Apr. 2022, doi: 10.1016/J.ENVRES.2021.112438.
- [12] N. K. Mousa, A.-J. Ali, and M. Hussein, "Bacillus megaterium Biodegradation Glyphosate," *Biodegradation*, Aug. 2021, doi: 10.5772/INTECHOPEN.96919.
- [13] L. Carles, F. Donnadieu, I. Wawrzyniak, P. Besse-Hoggan, and I. Batisson, "Genomic analysis of the *Bacillus megaterium* Mes11: New insights into nitroreductase genes associated with the degradation of mesotrione," *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 162, p. 105254, Aug. 2021, doi: 10.1016/J.IBIOD.2021.105254.
- [14] S. Kumar, K. G. Mukerji, and R. Lal, "Molecular aspects of pesticide degradation by microorganisms," *Critical Reviews in Microbiology*, vol. 22, no. 1, pp. 1–26, 1996, doi: 10.3109/10408419609106454.
- [15] W. Mulbry, "Characterization of a novel organophosphorus hydrolase from *Nocardia simplex* NRRL B-24074," *Microbiological Research*, vol. 154, no. 4, pp. 285–288, Mar. 2000, doi: 10.1016/S0944-5013(00)80001-4.
- [16] M. V. Martínez-Toledo, V. Salmerón, and J. González-López, "Effect of an organophosphorus insecticide, profenofos, on agricultural soil microflora," *Chemosphere*, vol. 24, no. 1, pp. 71–80, Jan. 1992, doi: 10.1016/0045-6535(92)90568-C.
- [17] E. G. Gonzales-Condori, C. Choquenaira-Quispe, and S. Á. Ramírez-Revilla, "Study of the degradation of chlorpyrifos in contaminated soils in the presence of the red California earthworm *Eisenia foetida*," *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, vol. 36, no. 1, pp. 73–80, Jan. 2020, doi: 10.20937/RICA.2020.36.53201.
- [18] E. G. Gonzales-Condori, S. A. Ramírez-Revilla, and J. A. Villanueva-Salas, "Role of *Eisenia foetida* in the degradation of profenofos in presence of native bacterial communities," *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, vol. 19, no. Sup. 1, pp. 45–57, Jun.

2020, doi: 10.24275/RMIQ/IA1505.

- [19] D. C. Herman and W. T. Frankenberger, "Bacterial Reduction of Perchlorate and Nitrate in Water," *Journal of Environmental Quality*, vol. 28, no. 3, pp. 1018–1024, May 1999, doi: 10.2134/JEQ1999.00472425002800030036X.
- [20] M. G. George, "Gammaproteobacteria. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2 (Don J. Brenner Noel R Krieg & James T. Staley eds)," 2005.
- [21] J. B. Goldberg and D. E. Ohman, "Cloning and expression in *Pseudomonas aeruginosa* of a gene involved in the production of alginate," *Journal of Bacteriology*, vol. 158, no. 3, pp. 1115–1121, 1984, doi: 10.1128/JB.158.3.1115-1121.1984.
- [22] Yucra Condori Harry Ricardo, "Bacillus megaterium strain HRYCM3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence - Nucleotide - NCBI." <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KU555935> (accessed May 29, 2022).
- [23] Yucra Condori Harry Ricardo, "Bacillus licheniformis strain HRYC-M5-AQP 16S ribosomal RNA gene, partial sequence - Nucleotide - NCBI." <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KU524076> (accessed May 29, 2022).
- [24] I. G. de Jong, K. Beilharz, O. P. Kuipers, and J. W. Veening, "Live Cell Imaging of *Bacillus subtilis* and *Streptococcus pneumoniae* using Automated Time-lapse Microscopy," *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, no. 53, p. e3145, Jul. 2011, doi: 10.3791/3145.
- [25] G. Das and M. P. Prasad, "Isolation, purification & mass production of protease enzyme from *Bacillus subtilis*," *Int. Res. J. Microbiol.*, vol. 1, no. 2, pp. 26–31, 2010.
- [26] B. Aslam *et al.*, "Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis," *Infection and Drug Resistance*, vol. 11, p. 1645, 2018, doi: 10.2147/IDR.S173867.
- [27] B. H. A. Wahhab *et al.*, "Genomic analysis of a functional haloacid-degrading gene of *Bacillus megaterium* strain BHS1 isolated from Blue Lake (Mavi Gölü, Turkey)," *Annals of Microbiology*, vol. 71, no. 1, pp. 1–11, Dec. 2021, doi: 10.1186/S13213-021-01625-9/FIGURES/6.
- [28] M. W. Rey *et al.*, "Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species.," *Genome biology*, vol. 5, no. 10, pp. 1–12, Sep. 2004, doi: 10.1186/GB-2004-5-10-R77/FIGURES/5.