

## Descifrando la comunicación celular en *Bacillus*: Influencia del pH en la esporulación y la heterogeneidad celular

Lorena Yamileth Balón Rosas<sup>1\*</sup>, Agustín Luna Bulbarela<sup>1</sup>, Leobardo Serrano Carreón<sup>1,2</sup>, Enrique Galindo Fentanes<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>. Instituto de Biotecnología, UNAM. Depto. Ingeniería Celular y Biocatálisis. Av. Universidad 2001, Chamilpa 62210, Cuernavaca, Mor.

<sup>2</sup>. Agro&Biotecnia S de RL de CV, Limones 8, Amate Redondo 62334, Cuernavaca, Mor.

\*lorena.balon@ibt.unam.mx

### Resumen

Las formulaciones basadas en esporas de *Bacillus spp.*, tienen larga vida de anaquel, siendo uno de los factores clave en el éxito comercial de estas bacterias como agentes de biocontrol. Tal es el caso de las esporas viables de *Bacillus velezensis* 83 (*Bv83*), que son el principio activo del biofungicida mexicano Fungifree ABTM. Las células vegetativas de *Bacillus*, se diferencian a subpoblaciones isogénicas que coexisten en un mismo ambiente; esta heterogeneidad celular está regulada por dos sistemas de comunicación celular (*quorum sensing*, QS): ComQXPA y Rap/Phr que activan la esporulación y la producción de compuestos antimicrobianos y del polímero  $\gamma$ -PGA. En *Bv83*, a pH 6.8, la presencia de  $\gamma$ -PGA es un problema, porque incrementa la viscosidad de los caldos de cultivo, provocando limitaciones en el mezclado y en la transferencia de oxígeno, lo que complica el crecimiento y la esporulación. No obstante, resultados previos muestran que a pH 5.0 se reprime la producción de  $\gamma$ -PGA, pero también la esporulación (ambos regulados por ComQXPA y Rap/Phr). Nuestro trabajo permitió entender el efecto del pH sobre la red de QS, el crecimiento y la esporulación de *Bv83*. Concluimos que, la acidez del medio no afecta consistentemente los genes *comQXPA* y *rap/phr*, pero si hay una influencia negativa de la acidez en los genes que codifican para la esporulación, la síntesis del polímero  $\gamma$ -PGA y la producción de lipopéptidos (Bacilomicina D y surfactina), compuestos importantes para ejercer el biocontrol.

**Palabras Claves:** *Bacillus*, esporulación, heterogeneidad celular, *quorum sensing*

### Abstract

*Bacillus* spore-based formulations possess long shelf life, being a key factor in the commercial success of these bacteria as biocontrol agents. In México, *Bacillus velezensis* 83 spores are the active ingredient of the biofungicide FungifreeAB™. In this bacteria, vegetative cells differentiate into isogenic subpopulations that coexist in the same environment; this cellular heterogeneity is regulated by two cellular communication (*quorum sensing*, QS) systems: ComQXPA and Rap/Phr, which activate sporulation and the production of antimicrobial compounds and the  $\gamma$ -PGA polymer. In *Bv83*, at pH 6.8, the presence of  $\gamma$ -PGA is a problem as it increases the viscosity of the culture broths, causing limitations in mixing and oxygen transfer, complicating the cell growth and sporulation. However, previous results show that at pH 5.0,  $\gamma$ -PGA production is repressed, but so is sporulation (both regulated by ComQXPA and Rap/Phr).

Our work allowed us to understand the pH effect on the QS network, growth, and sporulation of *Bv83*. We conclude that the acidity of the medium does not consistently affect the *comQXPA* and *rap/phr* genes. However, there is a negative influence of acidity on genes encoding for sporulation,  $\gamma$ -PGA polymer synthesis and the production of lipopeptides (bacilomycin D and surfactin), essential compounds for exerting biocontrol.

**Key Words:** *Bacillus*, sporulation, cellular heterogeneity, *quorum sensing*

## Introducción

Durante los últimos años, el uso de pesticidas químicos se ha incrementado significativamente con el objetivo de prevenir, mitigar o destruir plagas, reducir la pérdida en la producción agrícola y mejorar la calidad de los alimentos. Sin embargo, el uso excesivo de pesticidas químicos, contribuye significativamente a la contaminación ambiental y al desarrollo de patógenos resistentes a estos productos. Además, presentan un problema de salud para el agricultor (que lo aplica) como para el cliente que consume los alimentos. Es por ello por lo que una alternativa más sostenible para obtener una productividad agrícola rentable y segura es el empleo de agentes de control biológico (Galindo *et al.*, 2013; Polyxeni *et al.*, 2016; Tudi *et al.*, 2021). Entre los microorganismos usados como agentes de control biológico se encuentran varias especies del género *Bacillus*, donde los mecanismos de biocontrol están relacionados con la producción de metabolitos antimicrobianos, la competencia nutricional y espacial para proteger y limitar el acceso de los patógenos a los nutrientes, la degradación de moléculas producidas por el patógeno (mediante un proceso conocido como *quorum quenching*), la producción de compuestos volátiles (que tienen un potencial antifúngico) y la inducción de la resistencia sistémica en la planta (Balderas-Ruiz *et al.*, 2020; Fira *et al.*, 2018; Lucke *et al.*, 2020; Rabbee *et al.*, 2019; Serrano & Galindo, 2007). Además, una característica de *Bacillus* que los destaca como un buen agente de control biológico es que las células en crecimiento vegetativo son inducidas a diferenciarse en esporas en respuesta al agotamiento de nutrientes, las cuales, son un tipo celular que están metabólicamente inactivas y son resistentes a condiciones severas, como altas temperaturas, desecación y radiación. Posteriormente, cuando las condiciones ambientales son propicias, la espora germina y vuelve al estado vegetativo. Esto es de gran importancia biotecnológica ya que las esporas permiten la preservación y propagación de la información genética al sobrevivir en condiciones extremas durante largos periodos de tiempo, por lo que representan una opción ideal para producir formulaciones comerciales en polvo con una larga vida de anaquel, adecuadas para su uso en agricultura como biopesticidas (Balderas-Ruiz *et al.*, 3 2020;

Christie & Setlow, 2020; Cristiano-Fajardo *et al.*, 2019; Mckenney *et al.*, 2013; Piggot & Hilbert, 2004; Saggese *et al.*, 2021)

## ***Bacillus velezensis* 83: un aliado efectivo contra fito-patógenos**

El equipo del Dr. Enrique Galindo y el Dr. Leobardo Serrano (Instituto de Biotecnología, UNAM) en colaboración con el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD, Culiacán), desarrollaron el biofungicida mexicano "Fungifree AB", formulado con las esporas viables de *Bacillus velezensis* 83 (Bv83) (anteriormente conocida como *Bacillus subtilis* 83 o *Bacillus amyloliquefaciens* 83) (Balderas-Ruiz *et al.*, 2020; Galindo *et al.*, 2013). Bv83, aislada de la filósfera del árbol de mango, es una bacteria aeróbica Gram positiva, antagonista natural de *Colletotrichum*, *Erysiphe*, *Botrytis*, *Sphaerotheca* y *Leveillula*, por lo que el biofungicida Fungifree AB es muy efectivo para el biocontrol de estos hongos, en cultivos de gran importancia agrícola (mango, papaya, cítricos, tomate, fresas, berries, aguacate, entre otros). Esta cepa tiene la capacidad de producir compuestos antimicrobianos como la surfactina y la bacilomicina D, metabolitos de sobreflujo de carbono como la acetoína, el 2,3-butanodiol y el acetato, así como el ácido  $\gamma$ -polyglutámico ( $\gamma$ -PGA) (Balderas-Ruiz *et al.*, 2020; Cristiano-Fajardo *et al.*, 2019; Luna-Bulbarela *et al.*, 2018).

## **Heterogeneidad celular: una decisión regulada por quorum sensing**

Las células vegetativas de *Bacillus* tienen la capacidad de diferenciarse a varias subpoblaciones isogénicas con funciones especializadas que coexisten en un mismo ambiente (López & Kolter, 2010; Tasaki *et al.*, 2017). Tal heterogeneidad celular ocurre a través de procesos altamente coordinados que se rigen por *quorum sensing* (QS). El QS es un mecanismo de comunicación celular, que permite a una población bacteriana actuar de manera concertada y dependiente de la concentración celular, mediante el intercambio de moléculas de señalización difusibles, conocidas como autoinductores (AI) (Antunes & Ferreira, 2009; Kalia, 2015). En *Bacillus velezensis*, los sistemas ComQXPA y Rap/Phr están involucrados en la diferenciación de células vegetativas a células

productoras de polímero  $\gamma$ -PGA y de compuestos antimicrobianos como la surfactina y la bacilomicina D, durante el crecimiento celular. Así como, en la diferenciación de células vegetativas a esporas, durante la limitación nutricional. En la figura 1 se indica que, en el sistema ComQXPA, la concentración crítica del autoinductor ComX induce la fosforilación del regulador de respuesta ComA al unirse a ComP (receptor histidina-quinasa unido a membrana). ComA fosforilado activa la transcripción de *degQ*, involucrado en la fosforilación de DegU, que, a su vez promueve la activación del operón *pgsBAC*, que codifica para la  $\gamma$ -PGA sintasa (Anju *et al.*, 2019;

Nordgaard *et al.*, 2021). Además, ComX promueve la expresión de los péptidos Phr, que son necesarios para la activación del regulador maestro de esporulación Spo0A y para inhibir a las fosfatasa Rap (Boguslawski *et al.*, 2015; Špacapan *et al.*, 2020). En los sistemas Rap/Phr, el péptido Phr se secreta al entorno extracelular para ser procesado proteolíticamente y, posteriormente, ser importado al citoplasma por la oligopermeasa Opp, donde los Phr evitan que su fosfatasa Rap afin reprima la actividad de sus reguladores diana (Spo0F, DegU o ComA), (Figura 1) (Anju *et al.*, 2019; Gallegos-Monterrosa & Kovács, 2023).

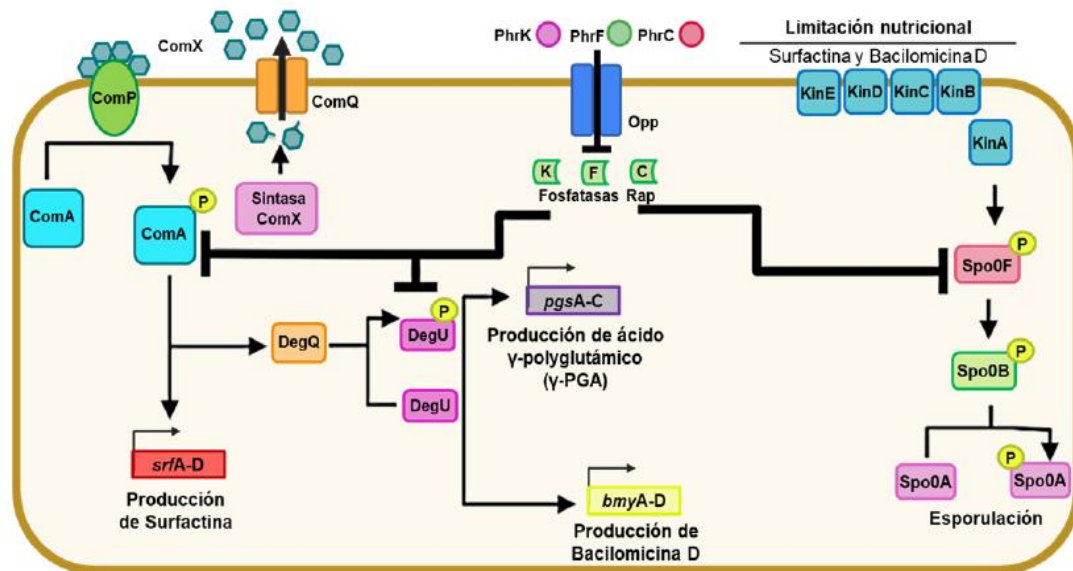


Figura 1. Mecanismo de QS: ComQXPA y Rap/Phr en *Bacillus velezensis*

## Acidificando la conversación: efecto del pH ácido en los sistemas ComQXPA y Rap/Phr

En 2007, Okada y colaboradores reportaron que en *Bacillus mojavensis*, el autoinductor ComX es ácido-lábil (tratamiento con ácido trifluoroacético, TFA al 5%) (Okada *et al.*, 2007). No obstante, estudios previos en *Bacillus subtilis* reportaron que en cultivos a pH ácido no se produce surfactina y afecta la

actividad de la oligopermeasa Opp (Cosby *et al.*, 1998). Asimismo, Cosby y Zuber identificaron que, en *Bacillus subtilis*, el pH ácido disminuye la actividad del regulador maestro de QS: SigH (Cosby & Zuber, 1997). Mientras que, en *Bacillus amyloliquefaciens* MBNC, a pH 5.5 se reprimen los genes involucrados en la esporulación y en la producción de biofilm (Chowdhury *et al.*, 2021). Finalmente, en nuestro grupo de investigación, Cristiano-Fajardo y

colaboradores identificaron que en *Bacillus velezensis* 83, la esporulación, la síntesis de  $\gamma$ -PGA y la producción de lipopéptidos (bacilomicina D y surfactina) se abaten en cultivos en lote a pH 5.0, en contraste con los cultivos a pH 6.8, donde esporula y se produce el polímero en cantidades significativas. La presencia de  $\gamma$ -PGA incrementa la viscosidad de los caldos de cultivo, provoca limitaciones en el mezclado, la transferencia de oxígeno y dificulta la recuperación de las esporas (Cristiano-Fajardo *et al.*, 2019). Estos estudios previos nos permitieron sugerir que los sistemas ComQXPA y/o Rap/Phr pueden verse afectados negativamente a nivel transcripcional a pH ácido, lo que llevaría a una sub-expresión de los genes regulados por estos dos sistemas de QS en *Bacillus*.

## **Revelando el diálogo invisible en *Bacillus velezensis*: cambios transcriptómicos del QS por efecto del pH ácido**

Con el objeto de entender lo que sucede a pH ácido (5.0), en términos de la expresión de los genes que codifican para las proteínas ComQXPA y Rap/Phr en *Bacillus velezensis*, se realizó un análisis transcripcional mediante RNAseq durante la etapa de crecimiento y transición celular (célula vegetativa a espora). Para ello, las cinéticas de *Bacillus velezensis* 83 se realizaron en cultivo en lote (por triplicado), bajo condiciones controladas en biorreactores de 10 L con medio mineral definido, utilizando glucosa como única fuente de carbono (10 g/L), bajo dos condiciones de pH de cultivo diferentes: 6.8 (control) y 5.0 (caso). Los parámetros para caracterizar este análisis (pH 5.0 vs pH 6.8), fueron: FDR (*False Discovery Rate*) = 0.05 y un logFC (*log Fold Change*)  $\geq 2$  (genes sobre-expresados significativamente), y  $\leq -2$  (genes sub-expresados significativamente).

Como se observa en la tabla 1, identificamos que la acidez del medio (pH 5.0 vs pH 6.8), afecta solamente al gen *comX* del sistema ComQXPA durante la etapa de crecimiento de Bv83. Mientras que, de los sistemas Rap/Phr,

solamente el gen *phrC* se sub-expresó durante la etapa de 5 agotamiento de glucosa.

No obstante, se observó que los genes que se sub-expresan significativamente por efecto del pH ácido, son en su mayoría aquellos que codifican para proteínas involucradas en la formación del tabique asimétrico entre la célula vegetativa y la pre-espora y en la formación del córtex de la pre-espora, así como genes que codifican para proteínas involucradas en la cascada de fosforilación para inducir la esporulación (*spo0F* y *spo0B*). Además, se identificó que entre los genes que se sub-expresaron durante esta etapa fueron aquellos que codifican para proteínas involucradas en la producción de surfactina y bacilomicina D, así como el operón que codifica para las proteínas involucradas en la producción y degradación de  $\gamma$ -PGA. Estos resultados demostrarían que, bajo condiciones ácidas, los genes que se ven afectados significativamente son los de menor jerarquía, y no los genes que codifican para reguladores transcripcionales maestros, mostrando que el efecto del pH ácido es específico en las funciones morfo-fisiológicas de Bv83, reduciendo la heterogeneidad celular bajo estas condiciones de pH ácido (cultivos más homogéneos).














De igual manera, se observó que, durante la etapa de transición a espora, el pH ácido no afectó la expresión de los genes que codifican para el sistema ComQXPA, pero sí se vio afectado negativamente el gen *phrC*, que, al estar sub-expresado, ya no reprime a la fosfatasa RapC, encargada de desfosforilar al regulador maestro ComA. Nuevamente, durante esta etapa, se identificó que entre los genes que se sub-expresaron por efecto del pH de cultivo ácido, se encontraron aquellos que codifican para proteínas involucradas en la producción de surfactina y bacilomicina D, así como el operón que codifica para las proteínas involucradas en la producción y degradación de  $\gamma$ -PGA (tabla 1).



# Artículos

**Tabla 1.** Efecto del pH de cultivo en la expresión diferencial de genes de QS de *Bacillus velezensis* 83, durante la etapa de crecimiento y transición celular. Este análisis transcriptómico indica la comparación entre cultivos en lote a pH ácido (5.0) vs cultivos en lote a pH control (6.8), ambos con medio mineral en biorreactores de 10 L.

Flèche roja: gen sub-expresado significativamente ( $\log FC \geq 2$ ). Flèche verde: gen sobre-expresado significativamente ( $\log FC \leq -2$ ).

Genes de QS	Función de los productos codificados por los genes de <i>quorum sensing</i> .	Etapa de crecimiento celular	Etapa de transición celular
<i>comX</i>	Autoinductor maestro involucrado en la diferenciación de células vegetativas a células productoras de compuestos antimicrobianos (surfactina y Bacilomicina D), $\gamma$ -PGA, biofilm y esporas.		Sin cambio significativo en su expresión.
<i>comQ</i>	Proteína acoplada a membrana que modifica y transporta a ComX al entorno extracelular.	Sin cambio significativo en su expresión.	Sin cambio significativo en su expresión.
<i>comP</i>	Regulador transcripcional que percibe a ComX. Esta interacción induce la fosforilación de ComA (proteína reguladora de respuesta).		Sin cambio significativo en su expresión.
<i>comA</i>	Regulador maestro que al ser fosforilado activa la transcripción de genes involucrados en la diferenciación a células productoras de compuestos antimicrobianos (surfactina y Bacilomicina D), $\gamma$ -PGA, biofilm y esporas.	Sin cambio significativo en su expresión.	Sin cambio significativo en su expresión.
<i>srfA-D</i>	Operón que codifica para la sintasa productora de Surfactina, lipopéptido importante para el biocontrol.		
<i>degQ</i>	Proteína encargada de fosforilar al regulador maestro DegU.		Sin cambio significativo en su expresión.
<i>degU</i>	Regulador maestro que al ser fosforilado activa la transcripción de los operones involucrados en la diferenciación a células productoras de $\gamma$ -PGA y Bacilomicina D.	Sin cambio significativo en su expresión.	Sin cambio significativo en su expresión.
<i>phrK y phrF</i>	Autoinductores encargados de inactivar a su fosfatasa Rap afin (RapK, RapF) para desencadenar la producción de esporas, $\gamma$ -PGA, biofilm y compuestos antimicrobianos.	Sin cambio significativo en su expresión.	Sin cambio significativo en su expresión.
<i>phrC</i>	Autoinductor encargado de inactivar a RapC, para desencadenar la producción de esporas, $\gamma$ -PGA, biofilm y compuestos antimicrobianos.	Sin cambio significativo en su expresión.	
<i>pgsA-C</i>	Operón que codifica para la sintasa productora de $\gamma$ -PGA, polímero importante para el biocontrol.		
<i>bmyA-D</i>	Operón que codifica para la sintasa productora de Bacilomicina D, lipopéptido importante para el biocontrol		
<i>kinA-E</i>	Histidin-cinasas acopladas a membrana que mediante una cascada de fosforilación activan al regulador maestro Spo0A, involucrado en la producción de biofilm y esporas.	Sin cambio significativo en su expresión.	Sin cambio significativo en su expresión.
<i>spo0F</i>	Regulador de respuesta que al estar fosforilado activa al regulador de respuesta Spo0B		
<i>spo0B</i>	Regulador de respuesta que al estar fosforilado activa al regulador maestro Spo0A, involucrado en la producción de biofilm y esporas.		Sin cambio significativo en su expresión.
<i>spo0A</i>	Regulador maestro que al estar fosforilado induce la transcripción de genes involucrados en la producción de esporas y biofilm.	Sin cambio significativo en su expresión.	Sin cambio significativo en su expresión.

## Conclusión

El pH ácido solamente afecta a los genes *comX* y *phrC* de los sistemas ComQXPA y Rap/Phr. Sin embargo, si hay una influencia negativa de la acidez del medio sobre los genes que codifican para proteínas involucradas en la heterogeneidad celular de la bacteria, lo que nos permite sugerir que a pH 5.0, obtendríamos cultivos más homogéneos ya que, bajo esta condición las células vegetativas no se diferencian a esporas, a células productoras del polímero  $\gamma$ -PGA y a células productoras de lipopéptidos (bacilomicina D y surfactina).

## Referencias

- Anju, S., Aparna, Y., Bhima, B., & Sarada, J. (2019). Novel insights on the *Bacillus quorum sensing* mechanism: Its role in competence, virulence, sporulation and biofilm formation. In: Pallaval Veera Bramhachari (eds), *Implication of Quorum Sensing System in Biofilm Formation and Virulence*, Springer, Singapore pp. 313–327. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-2429-1\\_21](https://doi.org/10.1007/978-981-13-2429-1_21)
- Antunes, L. C. M., & Ferreira, R. B. R. (2009). Intercellular communication in bacteria. In

*Critical Reviews in Microbiology*, Vol. 35 (2):66–80.

<https://doi.org/10.1080/10408410902733946>

6

Balderas-Ruíz, K. A., Bustos, P., Santamaria, R. I., González, V., Cristiano-Fajardo, S. A., Barrera-Ortiz, S., Mezo-Villalobos, M., Aranda-Ocampo, S., Guevara-García, Á. A., Galindo, E., & Serrano-Carreón, L. (2020). *Bacillus velezensis* 83 a bacterial strain from mango phyllosphere, useful for biological control and plant growth promotion. *AMB Express*. 2020 Sep 7;10(1):163. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01101-8>

Boguslawski, K. M., Hill, P. A., & Griffith, K. L. (2015). Novel mechanisms of controlling the activities of the transcription factors Spo0A and ComA by the plasmid-encoded *quorum sensing* regulators Rap60-Phr60 in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 96(2), 325–348. <https://doi.org/10.1111/mmi.12939>

Chowdhury, N., Goswami, G., Boro, R. C., & Barooah, M. (2021). A pH-dependent gene expression enables *Bacillus amyloliquefaciens* MBNC to adapt to acid stress. *Current Microbiology*, 78(8), 3104–3114. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02573-y>

Christie, G., & Setlow, P. (2020). *Bacillus* spore germination: Knowns, unknowns and what we need to learn. *Cellular Signalling*, 2020 Oct;74:109729. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109729>

Cosby, W. M., Vollenbroich, D., Lee, O. H., & Zuber, P. (1998). Altered *srf* expression in *Bacillus subtilis* resulting from changes culture pH is dependent on the SpoOK oligopeptide permease and the ComQX system of extracellular control. *Journal of Bacteriology*, 180(6), 1438–1445. <https://doi.org/10.1128/jb.180.6.1438-1445.1998>

Cosby, W. M., & Zuber, P. (1997). Regulation of *Bacillus subtilis*  $\sigma^H$  (Spo0H) and AbrB in response to changes in external pH. *Journal of Bacteriology*, 179(21), 6778–6787. <https://doi.org/10.1128/jb.179.21.6778-6787.1997>

Cristiano-Fajardo, S. A., Flores, C., Flores, N., Tinoco-Valencia, R., Serrano-Carreón, L., & Galindo, E. (2019). Glucose limitation and glucose uptake rate determines metabolite production and sporulation in high cell density continuous cultures of *Bacillus amyloliquefaciens* 83. *Journal of Biotechnology*. 2019 Jun 20;299:57-65. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.04.027>

Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., & Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*. 2018 Nov 10;285:44-55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>

Galindo, E., Serrano-Carreón, L., Gutiérrez, C. R., Allende, R., Balderas, K., Patiño, M., Trejo, M., Wong, M. A., Rayo, E., Isauro, D., & Jurado, C. (2013). The challenges of introducing a new biofungicide to the market: A case study. *Electronic Journal of Biotechnology*. <https://doi.org/10.2225/vol16-issue3-fulltext-6>

Gallegos-Monterrosa, R., & Kovács, Á. T. (2023). Phenotypic plasticity: The role of a phosphatase family Rap in the genetic regulation of *Bacilli*. In *Molecular Microbiology*, Vol. 120, Issue 1, pp. 20–31. John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/mmi.15060>

Kalia, V. C. (2015). *Quorum sensing vs quorum quenching: A battle with no end in sight*. *Quorum Sensing vs Quorum Quenching: A Battle with No End in Sight*, 1–391. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1982-8>

López, D., & Kolter, R. (2010). Extracellular signals that define distinct and coexisting cell fates in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(2), 134–149. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00199.x>

Lucke, M., Correa, M. G., & Levy, A. (2020). The role of secretion systems, effectors, and secondary metabolites of beneficial rhizobacteria in interactions with plants and microbes. In *Frontiers in Plant Science*. 2020 Nov 9;11:589416. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.589416>

- Luna-Bulbarela, A., Tinoco-Valencia, R., Corzo, G., Kazuma, K., Konno, K., Galindo, E., & Serrano-Carreón, L. (2018). Effects of bacillomycin D homologues produced by *Bacillus amyloliquefaciens* 83 on growth and viability of *Colletotrichum gloeosporioides* at different physiological stages. *Biological Control*.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.08.004>
- Mckenney, P. T., Driks, A., & Eichenberger, P. (2013). The *Bacillus subtilis* endospore: Assembly and functions of the multilayered coat. In *Nature Reviews Microbiology*. 2013 Jan;11(1):33-44.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2921>
- Nordgaard, M., Mortensen, R. M. R., Kirk, N. K., Gallegos-Monterrosa, R., & Kovács, Á. T. (2021). Deletion of Rap-Phr systems in *Bacillus subtilis* influences in vitro biofilm formation and plant root colonization. *MicrobiologyOpen*, 10(3), e1212.  
<https://doi.org/10.1002/mbo3.1212>
- Okada, M., Yamaguchi, H., Sato, I., Tsuji, F., Qi, J., Dubnau, D., & Sakagami, Y. (2007). Acid labile ComX pheromone from *Bacillus mojavensis* RO-H-1. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2007 Jul;71(7):1807-10.  
<https://doi.org/10.1271/bbb.70245>
- Piggot, P. J., & Hilbert, D. W. (2004). Sporulation of *Bacillus subtilis*. In *Current Opinion in Microbiology*. 2004 Dec;7(6):579-86. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.10.001>
- Polyxeni, N., Sotirios, M., Chrysanthi, K., Panagiotis, S., & Luc, H. (2016). Chemical pesticides and human health: the urgent need for a new concept in agriculture. *Frontiers in Public Health*, 2016 Jul 18;4:148. doi: 10.3389/fpubh.2016.00148.
- Rabbee, M. F., Sarafat Ali, M., Choi, J., Hwang, B. S., Jeong, S. C., & Baek, K. hyun. (2019). *Bacillus velezensis*: A valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. In *Molecules*. 2019 Mar 16;24(6):1046. <https://doi.org/10.3390/molecules24061046>
- Saggese, A., Baccigalupi, L., & Ricca, E. (2021). Spore formers as beneficial microbes for humans and animals. *Applied Microbiology*, 1(3), 498–509. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol1030032>
- Serrano, L., & Galindo, E. (2007). Control biológico de organismos fitopatógenos: Un reto multidisciplinario. (*Revista de Ciencia*) *La Academia Mexicana de Ciencias*. 58(1): 77–89.
- Špacapan, M., Danevčič, T., Štefanič, P., Porter, M., Stanley-Wall, N. R., & Mandić-Mulec, I. (2020). The ComX quorum sensing peptide of *Bacillus subtilis* affects biofilm formation negatively and sporulation positively. *Microorganisms*. 2020 Jul 27;8(8):1131.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8081131>
- Tasaki, S., Nakayama, M., & Shoji, W. (2017). Morphologies of *Bacillus subtilis* communities responding to environmental variation. *Development Growth and Differentiation*, 59(5): 369–378.  
<https://doi.org/10.1111/dgd.12383>
- Tudi, M., Ruan, H. D., Wang, L., Lyu, J., Sadler, R., Connell, D., Chu, C., & Phung, D. T. (2021). Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(3): 1–24. <https://doi.org/10.3390/ijerph18031112>