



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Evaluación del papel de los antibióticos lipopeptídicos producidos por *Bacillus* sp. 83 en la inhibición del crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* 09.”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias Bioquímicas

PRESENTA:

I.Q. Agustín Luna Bulbarela

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Leobardo Serrano Carreón – IBt-UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

Dr. Gerardo Corzo Burguete – IBt-UNAM

Dr. Mario Soberón Chávez – IBt-UNAM

MÉXICO, D.F. JUNIO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Leobardo Serrano Carreón y la asesoría tanto del Dr. Gerardo Corzo Burguete, el Dr. Mario Soberón Chávez y el Dr. Enrique Galindo Fentanes.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo de una beca de maestría otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, 355959) y el apoyo económico de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) a través del proyecto IN206715.

INDICE GENERAL

Índice general	iv
Índice de cuadros y figuras.....	vi
Resumen	viii
Abstract	ix
I. Introducción	1
1.0 Colletotrichum gloeosporioides, un fitopatógeno causante de la antracnosis.....	2
2.0 Género Bacillus como BPCV y sus mecanismos de biocontrol	4
2.1 Contribución de especies de Bacillus en promover el crecimiento de las plantas	4
2.2 Biocontrol por especies de Bacillus y sus mecanismos de acción	4
2.2.1 Competencia por espacio y nutrientes e interferencias en la señalización del “quórum sensing”	5
2.2.2 Elicitación de la resistencia sistémica inducida	6
2.2.3 Antibiosis.....	6
3.0 Lipopéptidos. Antibióticos para el control de fitopatógenos por parte de Bacillus	8
3.1 Clasificación estructural de los antibióticos lipopeptídicos de Bacillus	9
3.1.1 Familia de la surfactina	9
3.1.2 Familia de la iturina.....	11
3.1.3 Familia de la fengicina/plipastatina	11
3.2 Biosíntesis de antibióticos lipopéptidos en Bacillus.....	12
3.2.1 Perfil de ácidos grasos en Bacillus.....	14
3.3 Operaciones de separación y técnicas de análisis para la identificación de lipopéptidos.....	15
3.4 Comportamiento en fase acuosa de los lipopéptidos y la relación con su mecanismos de acción.	17
3.5 Sección lipofílica de los lipopéptidos, un factor determinante para su actividad biológica	18
3.6 Efecto de los lipopéptidos en la morfología de los hongos fitopatógenos y bacterias	19
3.7 Importancia de los compuestos lipopeptídicos para reducir la incidencia de enfermedades en plantas	21
II. Antecedentes	23
1.0 Desarrollo del biofungicida comercial Fungifree AB®	23
III. Justificación, hipótesis y objetivos	24
Justificación.....	24
Hipótesis	24
Objetivo general.....	24
Objetivos particulares	24
IV. Materiales y métodos	25
1. Materia prima y microorganismos.....	25
2. Purificación de lipopéptidos con actividad antifúngica	25
2.1 Centrifugación y ultrafiltración.....	25
2.2 Precipitación ácida y extracción sólido-líquido de los antibióticos lipopeptídicos	25
2.3 Cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa (PR-HPLC).....	25

3. Identificación de compuestos con actividad antifúngica mediante espectrometría de masas	26
4. Bioensayos de inhibición en caja de Petri	26
5. Cuantificación de bacilomicina D	27
6. Determinación de la concentración mínima inhibitoria 100 (MIC₁₀₀) para esporas y micelio	27
7. Determinación del efecto fungistático de la bacilomicina D	28
V. Resultados y discusión	29
1.0 Purificación y aislamiento de lipopéptidos antifúngicos de <i>Bacillus</i> sp. 83	29
1.1 Purificación de lipopéptidos antifúngicos de <i>Bacillus</i> sp.83	29
1.2 Determinación de la estructura de los compuestos aislados	35
1.3 Perfil de homólogos de bacilomicina D en caldos de cultivo de <i>Bacillus</i> sp. 83	40
2.0 Determinación de la concentración mínima inhibitoria 100 de bacilomicina D de <i>Bacillus</i> sp. 83	42
2.1 MIC ₁₀₀ bacilomicina D para espora	42
2.2 MIC ₁₀₀ bacilomicina D para micelio	47
4.0 Efecto de la longitud de la cadena de ácido graso sobre la actividad antifúngica de los homólogos de bacilomicina D	49
5.0 Cambios en la morfología de espora y micelio de <i>C. gloeosporioides</i> 09 por exposición a bacilomicina D	52
6.0 Efecto fungistático de la bacilomicina D sobre <i>C. gloeosporioides</i> 09	54
VI. Conclusiones	57
VI. Perspectivas	58
VIII. Referencias	59
IX. Anexos	67

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Estructuras químicas de los compuestos lipopeptídicos sintetizados por <i>Bacillus</i> spp	10
Cuadro 2. Reportes de aislamiento e identificación de lipopéptidos y otras proteínas sintetizadas por <i>Bacillus</i> con actividad antifúngica contra patógenos de importancia agrícola y otros patógenos	16
Cuadro 3. Concentración mínima inhibitoria 100 (MIC ₁₀₀) reportadas para distintos lipopéptidos	20
Cuadro 4. Inhibición de fitopatógenos mediante cepas de <i>Bacillus</i> e importancia de los lipopéptidos en su acción de control biológico.....	22
Cuadro 5. Comparación del patrón de fragmentación ESI-MS/MS de los homólogos de bacilomicina D: 1044 Da (Pico 5) y 1058 Da (Pico 7)	39
Figura 1. Ciclo de vida de <i>C. gloeosporioides</i> y desarrollo de la antracnosis.....	3
Figura 2. Acción de biocontrol por <i>Bacillus</i> mediante la inducción de la resistencia sistémica y la competencia por espacio y nutrientes.....	5
Figura 3. Moléculas con actividad antimicrobiana de origen no ribosomal sintetizadas por <i>Bacillus</i> spp.....	8
Figura 4. Ruta de síntesis de la surfactina.....	13
Figura 5. Operón de la sintasa de bacilomicina D de <i>Bacillus subtilis</i> AU195	14
Figura 6. Diagrama de flujo para el aislamiento e identificación de los compuestos lipopeptídicos con actividad antifúngica de <i>Bacillus</i> sp. 83.....	29
Figura 7. Porcentaje de inhibición para las fracciones obtenidas mediante ultrafiltración y precipitación ácida de sobrenadantes de <i>Bacillus</i> sp. 83.....	30
Figura 8. Porcentaje de inhibición para las fracciones obtenidas por RP-HPLC. Etapa 1	31
Figura 9. Cromatograma del extracto metanólico de lipopéptidos obtenidos mediante RP-HPLC. Etapa 1.....	32
Figura 10. Ensayo de actividad antifúngica contra <i>C. gloeosporioides</i> para las fracciones obtenidas por RP-HPLC. Etapa 1. ..	32
Figura 11. Porcentaje de inhibición para las fracciones obtenidas por RP-HPLC. Etapa 2.	33
Figura 12. Cromatograma de RP-HPLC (Etapa 2) de la fracción de 23-34 min obtenida durante la Etapa 1 de RP-HPLC.....	34
Figura 13. Efecto de los picos colectados por RP-HPLC (Etapa 2) sobre el crecimiento de <i>C. gloeosporioides</i> 09.....	34
Figura 14. Cromatogramas de los picos purificados mediante RP-HPLC analítico.	35
Figura 15. Espectros de masas correspondientes a los picos purificados por presentar actividad antifúngica.....	36
Figura 16. Patrón de fragmentación ESI-MS/MS obtenido para la bacilomicina D, a partir de un ión precursor de [M+H] ⁺ = 1045 Da (Pico 5)	37
Figura 17. Estructura química del homólogo de bacilomicina D de 1044 Da (C ₁₄), sintetizada por <i>Bacillus</i> sp. 83.	40
Figura 18. Distribución de los distintos homólogos de bacilomicina D en sobrenadantes de <i>Bacillus</i> sp. 83.....	41
Figura 19. Porcentaje de crecimiento micelar de <i>C. gloeosporioides</i> 09 (58 h) con respecto a un control, en función de la concentración de homólogos de bacilomicina D C ₁₄₋₁₆ cuando el momento del contacto entre el hongo (esporas) e inhibidor ocurrió a las 0 h de cultivo	43
Figura 20. “Pellets” de <i>C. gloeosporioides</i> 09 (58 h) en función de la concentración de bacilomicina D cuando el momento del contacto entre el hongo (esporas) y el inhibidor fue a las 0 h del cultivo.....	46
Figura 21. Porcentaje de crecimiento micelar de <i>C. gloeosporioides</i> 09 (58 h) con respecto a un control, en función de la concentración de homólogos de bacilomicina D C ₁₄₋₁₆ cuando el momento entre el hongo (micelio) y el inhibidor ocurrió a las 12 h	48
Figura 22. Concentraciones mínimas inhibitorias 100 (para espora y micelio) de los distintos homólogos de bacilomicina D C ₁₄₋₁₆ de <i>Bacillus</i> sp. 83 contra <i>C. gloeosporioides</i> 09.	50
Figura 23. Cambios en la morfología de esporas (en proceso de germinación) y micelio de <i>C. gloeosporioides</i> 09 causados por la adición de bacilomicina D al medio de cultivo	53
Figura 24. Determinación del efecto fungistático de la bacilomicina D.....	55
Figura 25. Morfología del pellet en <i>C. gloeosporioides</i> 09, después de que esporas sometidas a concentraciones iguales o mayores a la MIC ₁₀₀ de bacilomicina D C ₁₄ (Pico 5, 1044 Da) fueran incubadas en medio fresco sin antibiótico.....	55

Anexos

Cuadro A1. Tabla de rendimientos de purificación de los homólogos de bacilomicina D.	67
Cuadro A2. Secuencias peptídicas, quiralidad y pesos moleculares para ciclolipopéptidos reportados	71
Figura A1. Detección cualitativa de iturina y surfactina mediante PR-HPLC, en caldos de cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> 83	67
Figura A2. Espectro ESI-MS/MS a partir de un ión precursor m/z 1045, correspondiente a bacilomicina D C ₁₄ (Pico 5).	68
Figura A3. Espectro ESI-MS/MS a partir de un ión precursor m/z 1059, correspondiente a bacilomicina D C ₁₅ (Pico 7).	68
Figura A4. Espectro ESI-MS/MS a partir de un ión precursor m/z 1059, correspondiente a bacilomicina D C ₁₅ (Pico 8)	69
Figura A5. Espectro ESI-MS/MS a partir de un ión precursor m/z 1059, correspondiente a bacilomicina D C ₁₅ (Pico 9).	69
Figura A6. Espectro ESI-MS/MS a partir de un ión precursor m/z 1073, correspondiente a bacilomicina D C ₁₆ (Pico 14).	70
Figura A7. Espectro ESI-MS/MS a partir de un ión precursor m/z 1073, correspondiente a bacilomicina D C ₁₆ (Pico 15)	70
Figura A8. Curva de calibración para la cuantificación de iturinas	72
Figura A9. Cinética de crecimiento y germinación de <i>C. gloeosporioides</i> 09 en matraces agitados.	72
Figura A10. Agregación de esporas durante la germinación de <i>C. gloeosporioides</i> 09 en medio líquido PDB.	72
Figura A11. Ensayo de actividad antifúngica para los homólogos de bacilomicina D a partir de un inóculo de esporas.	73
Figura A12. Ensayo de actividad antifúngica para los homólogos de bacilomicina D a partir de un inóculo de micelio.	74
Figura A13. Concentración inhibitoria 50 de los homólogos de bacilomicina D C ₁₄₋₁₆ de <i>Bacillus</i> sp. 83 para inhibir el crecimiento de <i>C. gloeosporioides</i> 09.	75
Figura A14. Fermentación de <i>Bacillus</i> sp. 83 para la producción de esporas y metabolitos secundarios en medio mineral	76

RESUMEN

Dentro del Instituto de Biotecnología de la UNAM, en colaboración con el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) se desarrolló una tecnología a nivel industrial para la producción y formulación de agentes para control biológico. Entre los éxitos, está la generación de un biofungicida para el control de la antracnosis del mango causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, así como para otras enfermedades presentes en plantas causadas por hongos patógenos. Actualmente este producto está siendo comercializado bajo el nombre *Fungifree AB*[®], el cual posee como principio activo a la cepa de *Bacillus* sp. 83. En contraste con lo que ocurre con la mayoría de los pesticidas de origen químico, no se comprenden por completo los mecanismos de acción de los microorganismos que afectan directa o indirectamente a la sanidad vegetal de manera positiva, incluyendo a la mayoría de los agentes de control biológico. El objetivo del presente estudio fue identificar y caracterizar los distintos lipopéptidos producidos por *Bacillus* sp. 83, que se encuentren involucrados en la inhibición *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides* 09, un fitopatógeno de *Carica papaya*, *Mangifera indica* y otros cultivos. Los resultados muestran que *Bacillus* sp. 83 sintetiza compuestos lipopeptídicos con actividad antifúngica capaces de inhibir *in vitro* la germinación de esporas y el crecimiento del micelio de *C. gloeosporioides* 09. Estos compuestos fueron aislados e identificados mediante RP-HPLC y LC-MS/MS correspondiendo a seis homólogos de bacilomicina D, clasificados en tres distintos grupos isoméricos de 1044, 1058 y 1072 Da de peso molecular. La secuencia peptídica de estos, correspondió a Asn₁-Tyr₂-Asn₃-Pro₄-Glu₅-Ser₆-Thr₇ (con una modificación en Glu₅, probablemente una metilación) la cual forma un anillo con una cadena de ácido graso β-NH₂ de longitud variable (C₁₄, C₁₅ y C₁₆). Los homólogos de bacilomicina D muestran diferencias en su actividad antifúngica contra esporas, la cual está en función de la longitud de la cadena lipofílica, donde compuestos con el mismo peso molecular pueden presentar distinta actividad antifúngica, probablemente porque el esqueleto principal del ácido graso se encuentra metilado en posición *iso* o *anteiso*, ocasionando las diferencias en la actividad antifúngica observada. Para micelio no existió una correlación clara. Las concentraciones mínimas inhibitorias 100 (MIC₁₀₀) específicas para micelio son menores a las necesarias para inhibir las esporas (p<0.05). En cultivos sumergidos a partir de un inóculo de esporas, la adición de bacilomicina D a dosis sub-letales ocasiona un efecto de promoción del crecimiento que podría ser resultado de la actividad surfactante del lipopéptido, que rompe las interacciones entre esporas, disgregando los agregados de las mismas, facilitando la formación de un mayor número de "pellets". Este efecto no había sido reportado para este tipo de antibióticos, aunque no fue observado en los ensayos de inhibición donde se partió con un inóculo de micelio. Aunque la bacilomicina D en sus distintos homólogos inhibe la germinación de la espora de *C. gloeosporioides*, ésta puede dar inicio, una vez que el lipopéptido es retirado del medio de cultivo, aun cuando se hayan empleado concentraciones superiores a la MIC₁₀₀; lo que sugiere que la bacilomicina D de *Bacillus* sp. 83 actúa como un agente fungistático. Los resultados de este estudio son relevantes para el entendimiento de los mecanismos de acción de *Fungifree AB*[®], abriendo la pauta para el desarrollo de formulaciones o productos más eficientes para el control de hongos fitopatógenos.

ABSTRACT

The Institute of Biotechnology (IBt) of the UNAM, in collaboration with the Research Center for Food and Development (CIAD) have developed technology for the industrial scale production and formulation of biocontrol agents, which has been successful for controlling mango anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* as well as for other diseases present in plants caused by fungal pathogens. This product is currently marketed under the trade name *Fungifree* AB®, which has *Bacillus* strain sp.83 as active ingredient. Contrary to most of the chemical compounds used as fungicides, the modes of action of microorganisms that directly or indirectly affect plant health (including most biological control agents) are not fully understood. The aim of this study was to identify and characterize the different lipopeptidic compounds produced by *Bacillus* sp. 83 that are involved in the inhibition *in vitro* against *Colletotrichum gloeosporioides* 09, a phytopathogenic fungus of *Carica papaya*, *Mangifera indica* and other crops. The results showed that *Bacillus* sp. 83 synthesizes lipopeptidic compounds with antifungal activity capable of inhibiting *in vitro* the spore germination and mycelial growth of *C. gloeosporioides* 09. These compounds were isolated and identified by RP-HPLC and LC-MS/MS and corresponded to six homologues of bacillomycin D, of three different isomeric groups: 1044, 1058 and 1072 Da. The peptide sequence of these compounds corresponded to Asn1-Tyr2-Asn3-Pro4-Glu5-Ser6-Thr7 (with a modification in Glu5, a residue probably methylated) which forms a ring with a variable-length β -NH₂ fatty acid (C₁₄, C₁₅ and C₁₆). The homologs show differences in their antifungal activity against spores, which increases with the length of the lipophilic chain, where isomers may have different antifungal activity, probably because the main skeleton of the fatty acid is methylated at position *iso* or *anteiso*, causing differences in the observed antifungal activity (no clear correlation was found for mycelium). The specific MIC₁₀₀ (minimum inhibitory concentration at which growth is inhibited by 100 %) for mycelia are much lower than those needed to inhibit the germination of spores ($p < 0.05$). Adding bacillomycin D in sub-lethal concentration, in submerged cultures using as inoculum a suspension of spores, causes a growth-promoting effect, probably a result of the surfactant activity of the lipopeptide, which prevents the aggregation of spores, facilitating the formation of a larger number of pellets, an effect not previously reported for these types of antibiotics. This phenomenon was not observed in the assay of mycelium inhibition. Although bacillomycin D inhibits *C. gloeosporioides* spore germination, this may initiate once the lipopeptide is removed from the culture medium and the spores inoculated into fresh medium. This phenomenon was observed even at higher doses than the MIC₁₀₀, suggesting that the D bacillomycin of *Bacillus* sp. 83 acts as a fungistatic agent. The results of this study are relevant for the understanding of the mechanisms of action of a commercial biofungicide based on *Bacillus* spp., opening the opportunity to develop more efficient formulations for the control of phytopathogenic fungi.

I. Introducción

El uso de fertilizantes químicos y pesticidas se ha incrementado significativamente con el objetivo de solventar las necesidades de alimento de una población en constante crecimiento. Sin embargo, estos productos han ocasionado la contaminación de los campos agrícolas y el desarrollo de resistencia a los pesticidas de origen químico, por parte de los patógenos. Ante esta problemática, las nuevas regulaciones restringen el uso de pesticidas, y establecen sus niveles de residualidad permitida en los cultivos. La tendencia actual, a nivel mundial, es el de sustituir estas prácticas agrícolas convencionales hacia modelos más sustentables, como el empleo de agentes de control biológico. Sin embargo, en nuestro país, aún existe una fuerte renuencia para sustituir las prácticas agrícolas convencionales hacia modelos más sustentables. En gran medida esto es debido a la desconfianza de los productores agrícolas, quienes exigen que los agentes de control biológico proporcionen los mismos beneficios que un producto químico a igual o menor precio.

El control biológico se define como el empleo de organismos (o de sus metabolitos) que son enemigos naturales de una plaga o patógeno, con el fin de reducir o eliminar sus efectos dañinos en las plantas o sus productos (Serrano-Carreón y Galindo-Fentanes, 2007). Estos agentes engloban a un grupo conocido por algunos autores como “microorganismos probióticos de las plantas” (o por sus siglas en inglés PPM, “plant probiotic microorganisms”), los cuales incluyen diversas especies dentro de los géneros de *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., *Trichoderma* spp. y algunas especies no patógenas de *Fusarium* spp. (Picard y Bosco, 2008), los cuales hacen uso de la antibiosis, la competencia por nutrientes y la inducción de resistencia sistémica en las plantas huésped; para inhibir el crecimiento de fitopatógenos.

El Dr. Enrique Galindo Fentanes y Dr. Leobardo Serrano Carreón, miembros del Dpto. de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la UNAM han desarrollado un producto comercial a base de *Bacillus subtilis* 83, llamado *FungifreeAB*[®], con la finalidad de disminuir la incidencia de antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides* en mango y otras enfermedades en plantas (Galindo y col. 2013, 2015). El presente proyecto llevó a cabo estudios que permitieron identificar cuales antibióticos de origen lipopeptídico son producidos por *Bacillus* sp. 83 durante el proceso de fermentación previo a su formulación final como *FungifreeAB*[®] y entender su efecto sobre la inhibición *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*.

1.0 *Colletotrichum gloeosporioides*, un fitopatógeno causante de la antracnosis

Colletotrichum es un género de hongos ascomicetos, de distribución sub- y tropical, de los cuales numerosas especies son los causantes de la antracnosis (o tizón). Esta es una enfermedad, que es caracterizada por lesiones necróticas profundas en hojas, tallos, flores y frutos, en una amplia gama de cultivos y plantas ornamentales de importancia económica.

En específico, *Colletotrichum gloeosporioides* es un hongo fitopatógeno asociado a géneros como *Citrus*, *Ficus*, *Mangifera*, *Pueraria* y *Vitis*, entre otros (Weir y col. 2012). Asimismo, se le ha descrito como el causante de enfermedades en plantas como caña de azúcar, café, algunas bayas y el frijol caupí. Basado en las pérdidas económicas que ocasiona y su interés científico, como modelo de la interacción planta-patógeno, se clasifica a *Colletotrichum gloeosporioides* como el octavo grupo de patógenos de mayor importancia en el mundo (Cannon y col. 2012).

Durante su interacción con la planta hospedera, estos hongos colonizan los tejidos vegetales presentando dos tipos principales de nutrición: uno llamado biotrópico, en donde obtienen sus nutrientes de células vivas, y otro llamado necrotrópico, en donde los nutrientes son obtenidos de células muertas, las cuales fueron afectadas por el hongo. En la figura 1 se describe el ciclo de vida de *Colletotrichum gloeosporioides*. Este ciclo consta de cuatro fases principales: **I.** Propagación; **II.** Latencia; **III.** Germinación y **IV.** Necrosis.

A partir del desarrollo de acérvulos (una estructura reproductiva asexual característica de estos hongos) en tejidos necrosados, los conidios (esporas asexuales) del patógeno se protegen contra factores ambientales. Estos conidios se encuentran recubiertos por un mucílago (Perfect y col. 1999), dentro del cual existen compuestos inhibidores de la germinación (Leite y Nicholson, 1992). Durante la fase de propagación (**Fase I**), estos conidios y/o micelio alcanzan su hospedero por medio de la lluvia y/o viento (entre otros factores). Una vez alcanzado el tejido del hospedero, da inicio a un periodo de latencia (**Fase II**). En esta fase, los conidios se anclan al tejido vegetal por medio de proteínas adhesivas, las cuales conforman al mucílago. La síntesis de este mucílago, puede ocurrir antes o después de que las esporas entren en contacto con una superficie sólida, y depende de la especie de *Colletotrichum* (Mercure y col. 1995; Hamer y col. 1987). Es importante mencionar que, si este mucílago es retirado de los conidios, se disminuye su capacidad para adherirse, se inhibe el desarrollo del apresorio (una hifa especializada para penetrar el tejido vegetal) y se reduce su capacidad infectiva (Rawlings y col. 2007). Los conidios se mantienen en este periodo de latencia hasta que las condiciones ambientales son favorables para su germinación. Durante esta germinación, (**Fase III**), el conidio metaboliza sus reservas de lípidos (en forma de glóbulos citoplásmicos) para desarrollar una hifa germinativa, y más tarde un apresorio. Durante la maduración de este apresorio, existe una alta actividad de lipólisis (Asakura y col. 2012). Una vez desarrollado, el apresorio sintetiza enzimas líticas, como las cutinasas, que le permiten explorar internamente el tejido del hospedero (Ettinger y col. 1987).

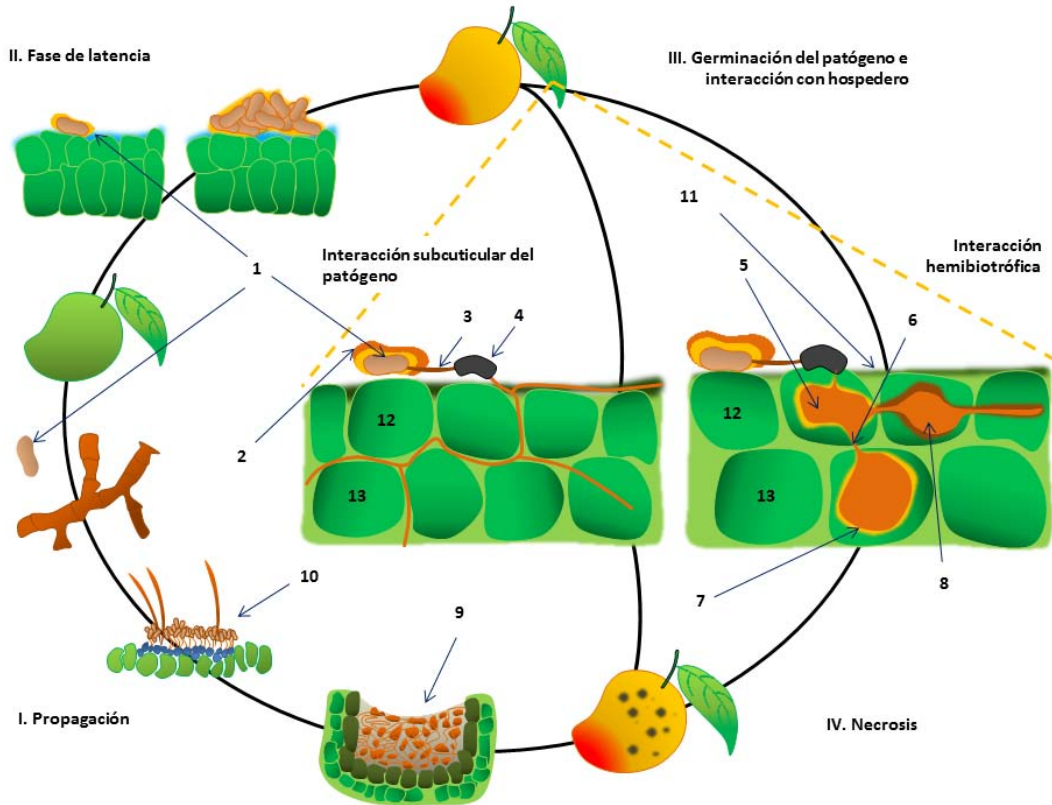


Figura 1. Ciclo de vida de *Colletotrichum* y desarrollo de la antracnosis. Hongo: 1. Conidios o esporas, 2. Matriz extracelular (mucílago), 3. Hifa germinativa, 4. Apresorio, 5. Vesícula infectiva, 6. Hifas primarias con estado biotrófico, 7. Matriz extracelular de la hifa primaria con estado biotrófico, 8. Hifas necróticas, 9. Tejido vegetal enfermo y 10. Acérvulos. **Planta:** 11. Cutícula, 12. Células de la epidermis y 13. Células del mesófilo.

Posteriormente, ocurre la necrosis debido a la presencia de hifas dentro del tejido, con dos posibles tipos de interacción: biotrófica y necrotrófica (Perfect y col. 1999). Dependiendo si se presentan uno o ambos, el patógeno se clasifica como: subcuticular o hemibiotrófico, respectivamente. Si el patógeno es subcuticular, las hifas primarias crecen de manera biotrófica entre las paredes celulares de la epidermis y finalmente causan necrosis en el mesófilo. Si el comportamiento es hemibiotrófico, se desarrolla una vesícula infectiva e hifas primarias (con un primer estadio biotrófico) que exploran y colonizan células del mesófilo. En cierto momento estas se diferencian a hifas necrotróficas que penetran las células vegetales al excretar enzimas degradadoras como endo-poligalacturonasas (Centis y col. 1997), pectina liasas (Templeton y col. 1994; Wattad y col. 1997), entre otras; causando la necrosis (**Fase IV**). Por último ocurre formación de acérvulos, iniciando nuevamente el ciclo.

Con respecto a sus características morfológicas, *C. gloeosporioides*, están el de poseer un largo de conidios entre 12-18 μm ; y 4.5-5 μm de ancho (Weir y col. 2012). El óptimo de germinación *in vitro* (de los conidios) ocurre a concentraciones de alrededor de 1×10^5 conidios/mL, mientras que se inhibe a concentraciones por encima de 1×10^7 conidios/mL (Kenny y col. 2012). Asimismo, la temperatura preferente de germinación y crecimiento está entre 25-31 $^{\circ}\text{C}$; en un rango de pH de 5-7

y 100 % humedad relativa. Se ha reportado que en cultivos líquidos, las esporas en incubación de *Colletotrichum musae* tienen a formar agregados. Esta adhesión es debida al mucílago que recubre las esporas y puede ser disminuida mediante el uso de surfactantes como el Triton-100 y SDS a concentraciones de 0.1 % w/w (Sela-Burlage y col. 1991). Por otro lado, los hongos de este género pueden presentar etapas de microesporulación (Slade y col. 1987; Casino y col. 1990) y anastomosis (Roca y col. 2003). Este último, es un proceso de recambio de citoplasma y organelos (incluyendo el núcleo, mitocondria y vacuolas) entre conidios y/o tubos germinativos, empleado como una estrategia para obtener material genético que permita la resistencia y adaptación al estrés de tipo biótico (Ishikawa y col. 2010).

2.0 Género *Bacillus* como BPCV y sus mecanismos de biocontrol

Entre las diversas bacterias identificadas como BPCV (Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal) las *Pseudomonas* y los *Bacillus* son los más importantes (Podile y Kishore, 2006). Estas últimas, crecen en forma de bastón, son Gram positivas, aerobias estrictas o anaerobias facultativas, catalasa positivas y se caracterizan porque, en condiciones de estrés, forman una endospora (Sleppcky y Hemphill, 2006). Esta última característica hace que las bacterias del género *Bacillus* sean organismos idóneos para su uso como agentes de biocontrol, ya que sus esporas tienen un alto nivel de resistencia a la deshidratación, la cual es necesaria para la formulación de productos con larga vida de anaquel (Ongena y Jacques, 2007; Chen y col. 2007).

2.1 Contribución de especies de *Bacillus* en promover el crecimiento de las plantas

Las especies de *Bacillus* representan un importante género bacteriano relacionado con la promoción del crecimiento y la sanidad vegetal, ya que presentan mecanismos directos e indirectos para mejorar la nutrición de las plantas y fomentar su crecimiento. Entre estos mecanismos de promoción del crecimiento se encuentran: la capacidad de fijación biológica de nitrógeno (Oliveira y col., 1993), la producción de auxinas como el ácido indol acético (Ambreen y Shahida, 2008), la disminución del estrés debido al etileno mediante la enzima aminociclopropano-1-carboxil (ACC) desaminasa (Shankar y col. 2011) y la habilidad de solubilizar formas inorgánicas de fósforo mediante ácidos orgánicos (Banik y Dey, 1982). La inoculación de agentes de control biológico, como *Bacillus amyloliquefaciens*, no afecta de manera negativa la simbiosis de las plantas con otros microorganismos benéficos, como la nodulación por parte de *Bradyrhizobium japonicum* o la micorrización por parte de hongos micorrízico arbusculares en plantas de soya (Correa y col. 2009).

2.2 Biocontrol por especies de *Bacillus* y sus mecanismos de acción

Numerosos estudios (Yu y col. 2011; Douville y Boland 1992; Jetiyanon, 2007; Thasana y col. 2010, Mochizuki y col. 2012) indican que la inoculación de plantas con diversas especies de *Bacillus* es una forma eficiente para disminuir la incidencia de enfermedades ocasionadas por fitopatógenos. Por ejemplo, la cepa *Bacillus subtilis* CE1, inoculada en semillas de maíz, puede inhibir el crecimiento de *Fusarium verticilloides* M7075, inoculada a una dosis de 10^8 ufc/ml (Caveglieri y col. 2005). Por su

parte, Alvidia y Natsuaki (2009) emplearon frutos de banano inoculados con *Colletotrichum musae* (un fitopatógeno causante de la enfermedad conocida como pudrición de la corona), para demostrar que éstos agentes de control biológico (como *B. amyloliquefaciens* DGA14) aspersados a una dosis de 10^8 ufc/ml, son capaces de disminuir la incidencia de la enfermedad, aún después de periodos de 20 días y de manera más eficiente con respecto al tratamiento químico tradicional.

Para lograr dichos efectos, estas bacterias emplean diversos mecanismos. Los principales mecanismos por los cuales los agentes de control biológico pueden ejercer su acción son: la competencia por espacio y nutrientes, la antibiosis o producción de toxinas, y la inducción de la resistencia en las plantas huésped (Correa y Soria, 2010). Estos conceptos se discuten con más detalle a continuación.

2.2.1 Competencia por espacio y nutrientes e interferencias en la señalización del “quórum sensing”

El género *Bacillus* es altamente eficiente para competir y secuestrar nutrientes derivados de los exudados de la raíz y/o filósfera, ya que es capaz de establecerse mediante la formación de “biofilms” (Vlamakis y col. 2013), como una estrategia para soportar deficiencias de nutrientes y competir más eficientemente por los mismos. Dentro de este “biofilm”, la población de *Bacillus* puede encontrarse en distintos estadios celulares, desde células vegetativas o móviles, esporas, células productoras de matriz extracelular y células competentes (Figura 2, López y col. 2009), las cuales se diferencian unas de otras, en función de distintos reguladores biotróficos y vías de regulación (Lopez y col. 2009).

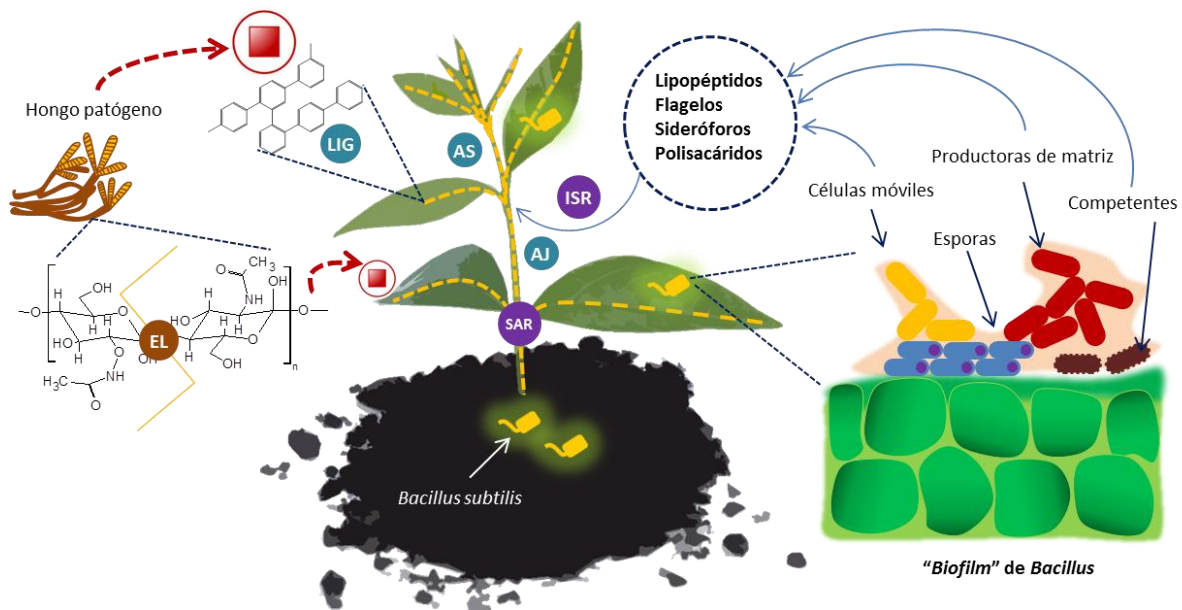


Figura 2. Acción de biocontrol por *Bacillus* mediante la inducción de la resistencia sistémica y la competencia por espacio y nutrientes. ISR. Resistencia sistémica inducida, SAR. Resistencia sistémica adquirida, AJ. Ácido jasmónico, AS. Ácido salicílico, EL. Enzimas líticas y LIG. Lignificación de tejido.

Durante la formación del “*biofilm*” se excretan polisacáridos, proteínas y moléculas señalizadoras que ayudan a crear un microambiente favorable para el crecimiento de la colonia (Vlamakis y col. 2013). Entre estas moléculas señalizadoras se encuentran lipopéptidos como la surfactina. Esta molécula ocasiona la permeabilización de membrana y la pérdida de potasio intracelular en *Bacillus*, lo que activa a la quinasa KinC/D. La activación de KinC/D permite la expresión de los genes para la generación de matriz extracelular (polisacáridos) necesaria para el “*biofilm*”. Por otro lado, dentro del operón de la sintasa de surfactina (*urfA-AD*) se encuentra codificado el gen *comS*. Este gen codifica para un activador del regulador de la competencia (Com K) dentro del sistema de dos componentes ComA/K del “*quorum sensing*” de *Bacillus* (Toymontseva y Sharipova, 2013), por lo que la concentración de surfactina está directamente relacionada con la densidad celular de esta bacteria. Asimismo, la colonización de las raíces en las plantas, es facilitada gracias a las propiedades biosurfactantes de la surfactina, ya que al disminuir la tensión superficial de su nicho ecológico, facilita el movimiento a través de flagelos (Vlamakis y col. 2013; Ongena y Jacques, 2007) y la adquisición de nutrientes (Rong y Rosenberg, 2001). Otra manera de competencia por nutrientes empleada por *Bacillus*, es el secuestro de nutrientes mediante la síntesis de agentes quelantes, como los sideróforos (Yu y col. 2011). Asimismo, se sabe que *Bacillus* spp. puede interferir en el “*quorum sensing*” (QS) y establecimiento de bacterias patógenas como *Erwinia carotovora*, gracias a la producción de acil homoserina lactonasa (Zhu y col. 2006).

2.2.2 Elicitación de la resistencia sistémica inducida

Una vez que *Bacillus subtilis* coloniza a las plantas, tal y como mencionan Ongena y Jacques (2007), este puede inducir un estado de resistencia frente a bacterias y hongos patógenos, conocido como resistencia sistémica inducida (ISR). La figura 2 indica los distintos componentes bacterianos que inducen este estado, los cuales pueden ser: lipopolisacáridos, ácido salicílico, sideróforos, lipopéptidos, entre otros (Ongena y col., 2007; Lugtenberg y Kamilova, 2009). Cuando la ISR se activa, se desencadena en la planta un incremento en la expresión de ciertas enzimas, tales como la fenilalanina amonio liasa (PAL), polifenol oxidasa (PPO) y peroxidasa (POD). Por otro lado, las plantas responden a componentes producidos por las PGPR's a través de la resistencia sistémica adquirida (SAR) con una cascada de mecanismos de defensa (Lugtenberg y Kamilova, 2009) que finaliza en la síntesis de fitoalexinas (compuestos con propiedades antimicrobianas), proteínas contra el estrés oxidativo (PAL, PPO, POD) y lignificación de tejido (Reymond y Farmer, 1998; Gray y Smith, 2005). En este contexto, Kumar y col. (2012) reportaron que *Bacillus subtilis* FB17 (una bacteria rizosférica) restringe la entrada de *Pseudomonas syringae* DC3000 (patógeno foliar) a través del estoma en *Arabidopsis thaliana*, debido a que elicitó las rutas de señalización dependientes de ácido abscísico y ácido salicílico.

2.2.3 Antibiosis

Para el caso de bacterias Gram-positivas tales como *Bacillus*, existen numerosas moléculas bioactivas que se sintetizan con la finalidad de inhibir el crecimiento de otros microorganismos. Dichos compuestos son selectivamente tóxicos, esto es, pueden matar o inhibir el crecimiento microbiano

sin dañar el tejido del hospedero vegetal. Los antibióticos sintetizados por *Bacillus* pueden ser divididos en dos grandes ramas según Stein (2005): aquellos sintetizados vía ribosomal y modificados post-traduccionalmente (lantibióticos y péptidos similares a lantibióticos) y aquellos sintetizados mediante una vía no ribosomal (compuestos ciclolipopeptídicos, los cuales serán abordados con más detalle en la sección 3.0).

Dentro de los lantibióticos se encuentran los de tipo A y los de tipo B. Los primeros son péptidos de 21-38 residuos que exhiben estructuras secundarias lineales con actividad antibiótica contra bacterias Gram-positivas. Su mecanismo de acción principal es la formación de poros dependientes de voltaje en la membrana. Ejemplos de este tipo de antibióticos son la subtilina (un péptido de 32 residuos que presenta cinco ciclos dentro de su estructura) y la ericina. Ejemplos de lantibióticos de tipo B son la mersacidina, la cual presenta una estructura globular e inhibe la síntesis de pared celular. Entre otros antibióticos de estructura similar a los lantibióticos (no designados ni como A o B), se encuentran la sublancina (la cual presenta puentes disulfuro y actúa contra bacterias Gram-positivas) y la subtilosina A, producida generalmente por *Bacillus subtilis* (Stein, 2005). Asimismo, algunas enzimas líticas como celulasas, proteasas y 1,4- β -glucanasas, son sintetizadas por especies de *Bacillus* spp. y contribuyen a la degradación de la pared celular de los patógenos fúngicos (Baysal y col. 2013).

En la figura 3 se muestran algunos antibióticos, de origen no ribosomal producidos por *Bacillus* y que se encuentran involucrados en la antibiosis contra bacterias y hongos. Algunos de los metabolitos antimicrobianos producidos por especies asociadas a plantas (como *Bacillus amyloliquefaciens*) corresponden a lipopéptidos (como la surfactina, iturina y fengicina), sideróforos quelantes de hierro (como la bacilibactina, Chen y col. 2009), dipéptidos como la bacilisina (Chen y col. 2009); y policétidos como la bacteriocina (Arguelles-Arias y col. 2009), la bacillaene, la macrolactina y la difidicina (Chen y col. 2009). Asimismo, existen otros antifúngicos como la rizocitina, un fosfo-oligopéptido (Kugler y col. 1990). Especies como *Bacillus cereus*, son capaces de sintetizar otros compuestos como la zwittermicina A, la kanosamina, biocerina y cerexina (Emmert y col., 2004; Sleppcky y Hemphill, 2006).

Por otro lado, algunos autores sugieren que algunos compuestos volátiles sintetizados por *Bacillus* contribuyen de manera significativa en la reducción de los niveles de enfermedades causadas por fitopatógenos. Liu y col. (2008) muestran que los compuestos volátiles producidos por *Bacillus* spp. y *Paenibacillus polymyxa*, ocasionan una inhibición del crecimiento en diversos patógenos como *Alternaria brassicae* y *Fusarium oxysporum*, así como una inhibición en la síntesis de pigmentos. Una determinación (mediante GC-MS) permitió demostrar que diversas cepas comparten la producción de compuestos volátiles como el 2,4-decadienal y el dietil ftalato. Chen y col. (2007) encontraron que *Bacillus subtilis* genera compuestos volátiles como el 2-etil-hexanol, 2-nonanona, 2,4-bis (2-metilpropil) fenol y 4-hidroxibenzaldehído los cuales poseen propiedades antifúngicas. Por su parte, *Bacillus subtilis* produce el 2-etil-hexanol, que inhibe el crecimiento de *Fusarium oxysporum* (Ongena y Jacques, 2007; Chen y col. 2007).

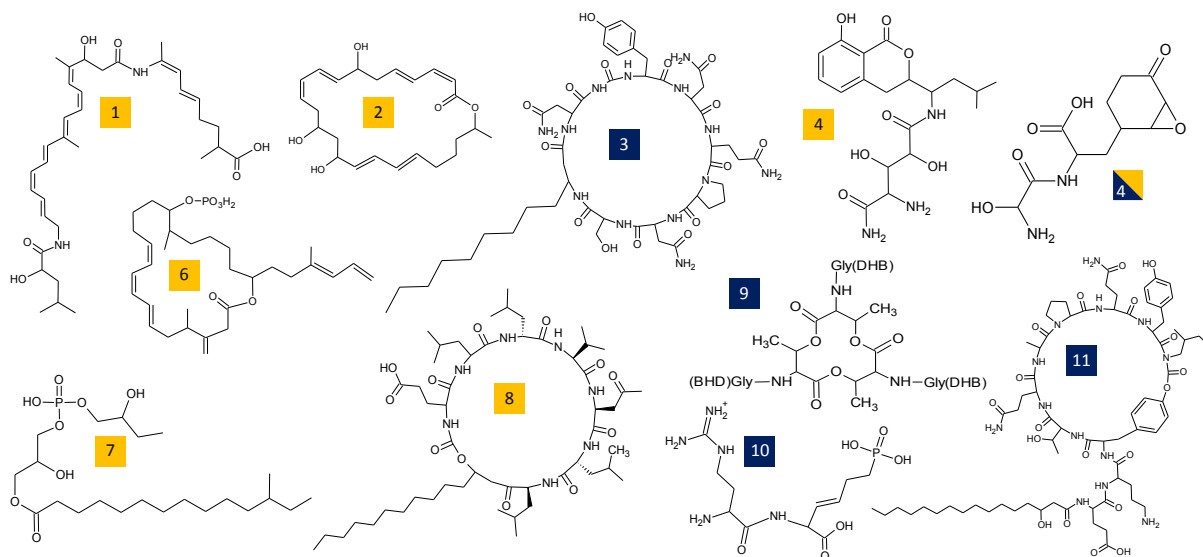


Figura 3. Moléculas con actividad antimicrobiana de origen no ribosomal sintetizadas por *Bacillus*. Bacillaene (1), macrolactina (2), iturina (3), amicoumacina (4), bacillisina (5), difucidina (6), bacillosina (7), surfactina (8), bacillobactina (9), DHB corresponde al 2,3-dihidroxibenzoato), rizotizina (10) y fengicina (11). Números en naranja indican antibióticos con actividad antimicrobiana; y en azul aquellos antifúngicos. Chen y col. (2007, 2008, 2009a, 2009b), Stein (2005), Dunlap y col. (2011), Kugler y col. (1990).

3.0 Lipopéptidos. Antibióticos para el control de fitopatógenos por parte de *Bacillus*

Bacillus spp. son capaces de sintetizar numerosas sustancias bioactivas que poseen actividad antifúngica contra un gran número de fitopatógenos. Tal es el caso de *Bacillus* sp. CMB32, reportada por Kim y col. (2010) quienes mencionan su capacidad de inhibir el crecimiento de *C. gloeosporioides*, *Fusarium solani* KCTC 6328, *Botrytis cinerea* KACC 40573, *Fusarium oxysporum* KACC 40037, *Rhizoctonia solani* KACC 40151 y *Phytophthora capsici* KACC 40157. Numerosos estudios indican que estas sustancias bioactivas corresponden a ciclolipopéptidos, los cuales de forma individual o en combinación, contribuyen en el biocontrol de distintos fitopatógenos (Romero y col. 2007; Álvarez y col. 2012; Yáñez-Mendizábal y col. 2011).

Estos ciclolipopéptidos son agentes biológicamente activos que en su estructura presentan tanto regiones hidrofílicas como hidrofóbicas, gracias a la presencia de un anillo de aminoácidos muy polar unido a una cola de ácido graso, por lo que son considerados biosurfactantes (Kim y col. 2004a, Fig.3).

El conocimiento de estos compuestos data desde 1949, año en que se mencionó a la micosubtilina como el primer antifúngico de estructura ciclolipopéptida aislado de *Bacillus* (Walton y Woodruff, 1949). En la actualidad, los ciclolipopéptidos representan compuestos atractivos y con gran potencial para la sustitución de los agroquímicos convencionales, sobre todo porque son biodegradables (Kim y col. 2004a). A continuación, se menciona una clasificación de los antibióticos lipopeptídicos sintetizados por *Bacillus* de acuerdo a su estructura química.

3.1 Clasificación estructural de los antibióticos lipopeptídicos de *Bacillus*

Los distintos lipopéptidos sintetizados por *Bacillus*, se han clasificados de acuerdo a su estructura química, en tres principales familias: a) Surfactina, b) Iturina y c) Fengicina/plipastatina (Tsuge y col. 2001; Jacques 2011, cuadro 1). Recientemente, algunos autores (ej. Béchet y col. 2012) mencionan a nuevas familias, conocido como las kurstakinas (Cuadro 1). Las diferencias estructurales y sus propiedades tanto bioquímicas y biológicas para cada uno de estos grupos, se explican con más detalle a continuación.

3.1.1 Familia de la surfactina

La surfactina se conoce desde los estudios realizados a finales de los 60's por parte de Arima y col. (1968), quienes lograron aislarla de sobrenadantes de cultivos de *Bacillus subtilis*. Jacques (2011) menciona en su revisión, que la familia de la surfactina representa a un grupo de más de 20 compuestos extracelulares con una alta actividad como surfactante y emulsificante, sintetizados por *Bacillus subtilis* y otras especies (*Bacillus coagulans* y *Bacillus mycoides*). Dentro del cuadro 1 se muestran los compuestos de esta familia: surfactina (Lee y col. 2007), la lichenisina (de *Bacillus licheniformis*, Yakimov y col. 1995), pumilacidina (de *Bacillus pumilus*, Naruse y col. 1990), entre otros como la halobacilina (Hasumi y col. 1995) y la bamilocina A (de *Bacillus amyloliquefaciens*, Lee y col. 2007).

Con excepción de la esperina, todos los miembros de la familia son heptapéptidos con una secuencia quiral LLDLLDL, unidos con un ácido graso β -hidroxilado (FA- β -OH); conservando una D-Leu4, D-Leu6 y un L-Asp4. Los residuos de aminoácidos en posición 2, 4 y 7 contienen grupos laterales alifáticos, incluyen a la valina, leucina e isoleucina, con algunas excepciones (Jacques, 2011). La esperina difiere del resto de la familia debido a que el Asp4 forma un anillo tipo lactona que involucra a su β -carboxilo en lugar del α -carboxilo de la leucina terminal, con respecto a la surfactina. La cadena del FA- β -OH para estos compuestos suele ser de 12-16 C, mostrando configuraciones *n*, *iso* y *anteiso* (Jacques, 2011).

La surfactina es capaz de disminuir la tensión superficial del agua hasta 27 mNm^{-1} y muestra una baja (10 mg l^{-1}) concentración crítica micelar ("CMC" concentración mínima de un surfactante a partir de la cual se forman micelas espontáneamente en una disolución). Debido a su naturaleza anfipática, es capaz de asociarse y anclarse a la bicapa lipídica; interfiriendo en la integridad biológica de las membranas de una manera dependiente de la concentración (Jacques, 2011). Esto es de suma importancia, ya que una concentración de surfactina cercana a la CMC ocasiona una completa solubilización de la bicapa lipídica y a la formación de micelas. Asimismo, es importante mencionar que el contenido de esteroides en la membrana disminuye la susceptibilidad biológica de ella a la surfactina, como sucede para los hongos, por lo que no se considera un antifúngico propiamente dicho. Aun así, existen reportes donde antibióticos del tipo surfactina, secretados por *Bacillus* spp., pueden inhibir la germinación de esporas de fitopatógenos *in vitro* como *Magnaporthe grisea*, el cual ataca al arroz (Tendulkar y col. 2007).

Cuadro 1. Estructura químicas de los compuestos lipopeptídicos sintetizados por *Bacillus*

Cepa	Familia	Compuesto	Estructura	Referencia	
<i>B. subtilis</i>	Surfactina	Surfactina	$\begin{array}{c} \text{R}^*\text{-CHCH}_2\text{CO-Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu}^{**} \\ \\ \text{O} \end{array}$	Lee y col. (2007)	
<i>B. pumilus</i>		Pumilacidina	$\begin{array}{c} \text{R-CHCH}_2\text{CO-Glu-Leu-Leu-Leu-Asp-Leu-Ile/Val} \\ \\ \text{O} \end{array}$	Naruse y col. 1990	
<i>B. licheniformis</i> BAS50		Lichenisina A	$\begin{array}{c} \text{R-CHCH}_2\text{CO-Glu-Leu-Leu-Val-Asn-Leu-Ile} \\ \\ \text{O} \end{array}$	Yakimov y col. (1995)	
<i>B. amyloliquefaciens</i> TF28	Iturina	Iturina A o C	$\begin{array}{c} \text{R-CHCH}_2\text{CO-Asn-Tyr-Ans-Gln-Pro-Asn-Ser} \\ \\ \text{NH} \end{array}$	Zhang y col. (2012)	
<i>B. mojavenensis</i> B0621A		Mojavensina A	$\begin{array}{c} \text{R-CHCH}_2\text{CO-Asn-Tyr-Asn-Gln-Pro-Asn-Asn} \\ \\ \text{NH} \end{array}$	Ma y col. (2012)	
<i>B. amyloliquefaciens</i> Q-426		Bacilomicina D	$\begin{array}{c} \text{R-CHCH}_2\text{CO-Asn-Tyr-Ans-Pro-Glu-Ser-Thr} \\ \\ \text{NH} \end{array}$	Zhao y col. (2013)	
<i>B. subtilis</i>		Bacilomicina F	$\begin{array}{c} \text{R-CHCH}_2\text{CO-Asn-Tyr-Ans-Gln-Pro-Asn-Thr} \\ \\ \text{NH} \end{array}$	Lee y col. (2008)	
<i>B. subtilis</i>		Bacilomicina L	$\begin{array}{c} \text{R-CHCH}_2\text{CO-Asp-Tyr-Ans-Ser-Gln-Ser-Thr} \\ \\ \text{NH} \end{array}$	Peypoux y col. (1984)	
<i>B. subtilis</i> FR-2		Bacilopeptina*	$\begin{array}{c} \text{R-CHCH}_2\text{CO-Asn-Tyr-Ans-Ser-Glu-Ser-Thr} \\ \\ \text{NH} \end{array}$	Kajimura y col. (1995)	
<i>B. subtilis</i>		Micosubtilina	$\begin{array}{c} \text{R-CHCH}_2\text{CO-Asn-Tyr-Asn-Gln-Pro-Ser-Asn} \\ \\ \text{NH} \end{array}$	Besson y col. (1978)	
<i>B. subtilis</i> CMB32		Fengicina/ pipastatina	Fengicina A	$\begin{array}{c} \text{R-CHCH}_2\text{CO-Asn-Orn-Tyr-Thr-Glu-Ala} \\ \quad \quad \\ \text{OH} \quad \text{O} \quad \\ \quad \quad \quad \text{Ile o Leu-Tyr-Gln-Pro} \end{array}$	Kim y col. (2010)
<i>B. amyloliquefaciens</i> Q-426			Fengicina B	$\begin{array}{c} \text{R-CHCH}_2\text{CO-Asn-Orn-Tyr-Thr-Glu-Val} \\ \quad \quad \\ \text{OH} \quad \text{O} \quad \\ \quad \quad \quad \text{Ile o Leu-Tyr-Gln-Pro} \end{array}$	Zhao y col. (2013)
<i>B. circulans</i> J2154	Otros	Circulocina 3	$\begin{array}{c} \text{R-CO-Thr-Leu-Ile-Thr-Asn-Ala} \\ \\ \text{O} \end{array}$ <p>R= HN=C(NH₂)-NH-(CH₂)_{16/18}-CH(OH)-CH₂-</p>	He y col. (2001)	
<i>Paenibacillus polymyxa</i> PKB1		Furaricidina	$\begin{array}{c} \text{R-CO-Thr-Val-Tyr-Thr-Asn-Ala} \\ \\ \text{O} \end{array}$ <p>R= HN=C(NH₂)-NH-(CH₂)₁₂-CH(OH)-CH₂-</p>	Li y Jensen (2008)	
<i>B. thuringiensis kurstaki</i> HD-1.		Kurstakina	$\begin{array}{c} \text{R-CO-Thr-Gly-Ala-Ser-His-Gln-Gln} \\ \\ \text{O} \end{array}$ <p>R= (CH₃)₂-CH-(CH₂)₇/ CH₃-(CH₂)₁₀/ (CH₃)₂-CH-(CH₂)₉</p>	Hathout y col. (2000)	
<i>B. licheniformis</i> 603		Antiadhesina	$\begin{array}{c} \text{R-CHCH}_2\text{CO-Asp-Leu-Leu-Val-Val-Glu}^*\text{-Leu} \\ \\ \text{O} \end{array}$ <p>Glu*=Glu/Glu-CH₃</p>	Batrakov y col. (2003)	
<i>B. amyloliquefaciens</i> LP03		Bamylocina	$\begin{array}{c} \text{R-CHCH}_2\text{CO-Glu-Leu-Met-Leu-Pro-Leu-Leu} \\ \\ \text{O} \end{array}$	Lee y col. (2007)	
<i>Bacillus</i> sp. A1238		Halobacilina	$\begin{array}{c} \text{R-CHCH}_2\text{CO-Gln-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu} \\ \\ \text{O} \end{array}$	Hasumi y col. (1995)	
<i>B. mojavenensis</i>		Mojavensina A	$\begin{array}{c} \text{R-CHCH}_2\text{CO-Asp-Tyr-Ans-Gln-Pro-Asn-Asn} \\ \\ \text{NH} \end{array}$	Ma y col. (2012)	

R= A menos de que sea especificado, R representa la cadena lateral de un ácido graso de longitud variable (frecuentemente entre C₁₄-C₁₇)

De igual manera, Gaofu y col. (2010) reportaron el aislamiento de un lipopéptido de la familia de la surfactina, al que denominaron WH1 fungin. Su estructura linealizada es: $\text{CH}(\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{13})\text{O}-\text{CH}_2\text{CO}-\text{Glu}_1-\text{Leu}_2-\text{Leu}_3-\text{Asp}_4-\text{Val}_5-\text{Leu}_6-\text{Leu}_7$ (donde la Leu_7 se une al ácido graso mediante su β -hidroxilación). Estos investigadores proponen un modelo de inhibición donde a altas concentraciones se induce la formación de poros sobre la membrana celular y a bajas concentraciones, se desencadena la apoptosis. Además de exhibir acción antibacteriana, lipopéptidos de la familia de la surfactina, como la antiadhesina (aislada de *Bacillus licheniformis* 603), son capaces de prevenir la adhesión a superficies sólidas y formación de agregados de bacterias como, *Corynebacterium variabilis* (Batrakov y col. 2003).

3.1.2 Familia de la iturina

Las iturinas comprenden numerosos compuestos de estructura similar, dentro de los cuales se encuentran: la iturina A, D, E; la bacillomicina F, D y L (conocida también como bacillopeptina) y la micosubtilina (Tsuge y col. 2001; Moyne y col. 2004; Jacques, 2011; Ongena y Jacques, 2007). Estos compuestos son heptapéptidos unidos a un ácido graso β -aminado ($\text{FA}-\beta\text{-HN}_2$), con una longitud de cadena de 14-17 carbonos. Todos los miembros poseen una secuencia quiral de aminoácidos LDDLLDL, con la secuencia conservada: L-Asn₁-D-Tyr₂-D-Asn₃. La iturina es un biosurfactante con una fuerte actividad antifúngica, capaz de disminuir la tensión superficial del agua a 43 mNm^{-1} y su concentración crítica micelar es de alrededor de 20 mg l^{-1} . Al igual que la surfactina, posee acción hemolítica pero tiene un mecanismo de acción distinto; es bioactiva contra hongos y levaduras, mas no para bacterias. La iturina ocasiona una perturbación osmótica debido a la formación de poros, mas no ocasiona la solubilización de la membrana como lo hace la surfactina (Álvarez y col. 2012). Por último, las iturinas tienen una alta afinidad por los esteroides de las membranas de células en eucariotes. Al unirse con estos forman poros en la membrana, resultando en la liberación de iones esenciales como el K^+ y el Na^+ , causando por lo tanto la muerte celular (Lee y col. 2008). La bacilomicina D, miembro de esta familia, tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: L-Asn₁-D-Tyr₂-D-Asn₃-L-Pro₄-L-Glu₅-D-Ser₆-L-Thr₇ (Moyne y col. 2004). Este lipopéptido exhibe acción antifúngica contra hongos filamentosos como *Aspergillus flavus* (Moyne y col. 2004) y también se ha encontrado que tiene acción antibacterial contra *X. campestris* pv. *cucurbitae* y *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* a concentraciones iguales o mayores a 0.01 mg/ml .

3.1.3 Familia de la fengicina/plipastatina

La familia de la fengicina/plipastatina cuenta con cuatro miembros principales; la fengicinas A y B, y la plipastatina A y B (Cuadro 1). Estos compuestos son lipodecapéptidos, con una secuencia peptídica que siempre es la misma: L-Glu-D-Orn-D-Tyr-D-Thr-L-Glu-D-(Ala o Val)-L-Pro-L-Gln-L-Tyr-L-Ile (Jacques, 2011; Ongena y Jacques, 2007), los cuales difieren en el aminoácido de la sexta posición, pudiendo ser alanina (para formas A) o valina (para formas B; Jacques, 2011; Ongena y Jacques, 2007). Todos los miembros presentan un anillo tipo lactona en la sección peptídica entre el carboxilo terminal de una isoleucina y un grupo hidroxilo de una tirosina en la posición tres. La cadena de ácido graso es β -hidroxilada con un esqueleto hidrocarbonado de 14-18 carbonos, por lo regular saturada.

Al contrario de la surfactina y la iturina, la fengicina posee menor actividad hemolítica pero mantiene una fuerte actividad antifúngica, específicamente contra hongos filamentosos. Por ejemplo, la fengicina producida por *Bacillus thuringiensis* CM26, inhibe el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* a concentraciones superiores de 100 µg/ml (Kim y col. 2004a).

El mecanismo de acción de la fengicina es menos conocido, pero se sabe que está relacionado con la interacción con la membrana. En la literatura existe el reporte que el empleo de fengicina A (producida por *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426) a concentraciones de 1.6 veces la MIC₁₀₀ (31.2 µg/ml) sobre células de *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae* no ocasiona una pérdida de viabilidad de las mismas (corroborado mediante una tinción con diacetato de fluoresceína), sugiriendo un efecto fungistático de la fengicina A (Zhao y col. 2012). Este es el único antecedente de un lipopéptido (de las tres familias principales) con actividad fungistática. Este grupo de investigación sugiere que, al menos para la fengicina, el blanco de acción no corresponde a los lípidos de membrana. Con respecto a esto, en otros reportes se menciona que los lipopéptidos, además de ocasionar daños en membrana, son capaces de inhibir ciertas enzimas importantes para mantener la homeostasis celular. Por ejemplo, la halobacilina (lipopéptido producido por *Bacillus* sp. A1238, similar a la surfactina) es capaz de inhibir la actividad catalítica de la acil CoA: colesterol aciltransferasa (Hasumi y col. 1995).

3.2 Biosíntesis de antibióticos lipopéptidos en *Bacillus*

La síntesis de estos antibióticos lipopeptídicos se lleva a cabo mediante grandes complejos multienzimáticos, llamados sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPS). Estas sintetasas están organizadas en módulos, cada uno sus propios dominios con actividad de: adenilación (A), tiolación (Te/At), condensación (C) y tioesterasa (TE) (Jacques, 2011). La ruta de síntesis de surfactina se muestra en la figura 4. Para llevar a cabo la síntesis, inicialmente el dominio de adenilación del primer modulo activa a un aminoácido (reconocido de manera específica), y lo convierte a un amino acil adenilato. Posteriormente, es llevado al dominio de tiolación (también llamado “peptidyl carrier proteína”; PCP), donde mediante su actividad fosfopantetenil transferasa, se une a un cofactor de 4'fosfopanteteína y se libera AMP. Este cofactor actúa como una articulación para que el aminoácido se movilice a través de los centros catalíticos. Después, un dominio de condensación cataliza la formación de un enlace peptídico entre dos aminoácidos unidos a dos PCP adyacentes. La síntesis finaliza en la mayoría de los casos, por el dominio de tioesterasa (Te/At) del último modulo, que toma también función de acil transferasa, transfiriendo una cadena de ácido graso β-hidroxilado (para el caso de la surfactina) a la parte peptídica y formando un anillo (Moyne y col. 2004; Jacques, 2011). De manera adicional, un dominio de epimerización (E), el cual solo se encuentra presente en algunos de los módulos, se encarga de darle a ciertos aminoácidos una configuración *D* (Figura 4) durante la síntesis de la parte peptídica. En general, se conoce poco acerca del mecanismo de transferencia del lípido a la parte peptídica durante los pasos iniciales de síntesis y no se han encontrado, dentro del “cluster” de síntesis de la surfactina, regiones que codifiquen para enzimas de activación del ácido graso. Sin embargo, se sugiere que durante los primeros pasos de síntesis, una ácido graso 3-hidroxi-CoA tioesterasa está presente. Algunos estudios (Krass y col. 2010) demuestran que en *Bacillus subtilis* existen cuatro ácido graso CoA ligasas (dos de ellas: LcfA y YhfL), que intervienen durante la

síntesis. Asimismo, Krass y col (2010) mencionan que el dominio de condensación “C” cataliza la transferencia del ácido graso β -hidroxilado activado con CoA al sitio donde es transferido al primer aminoácido del péptido.

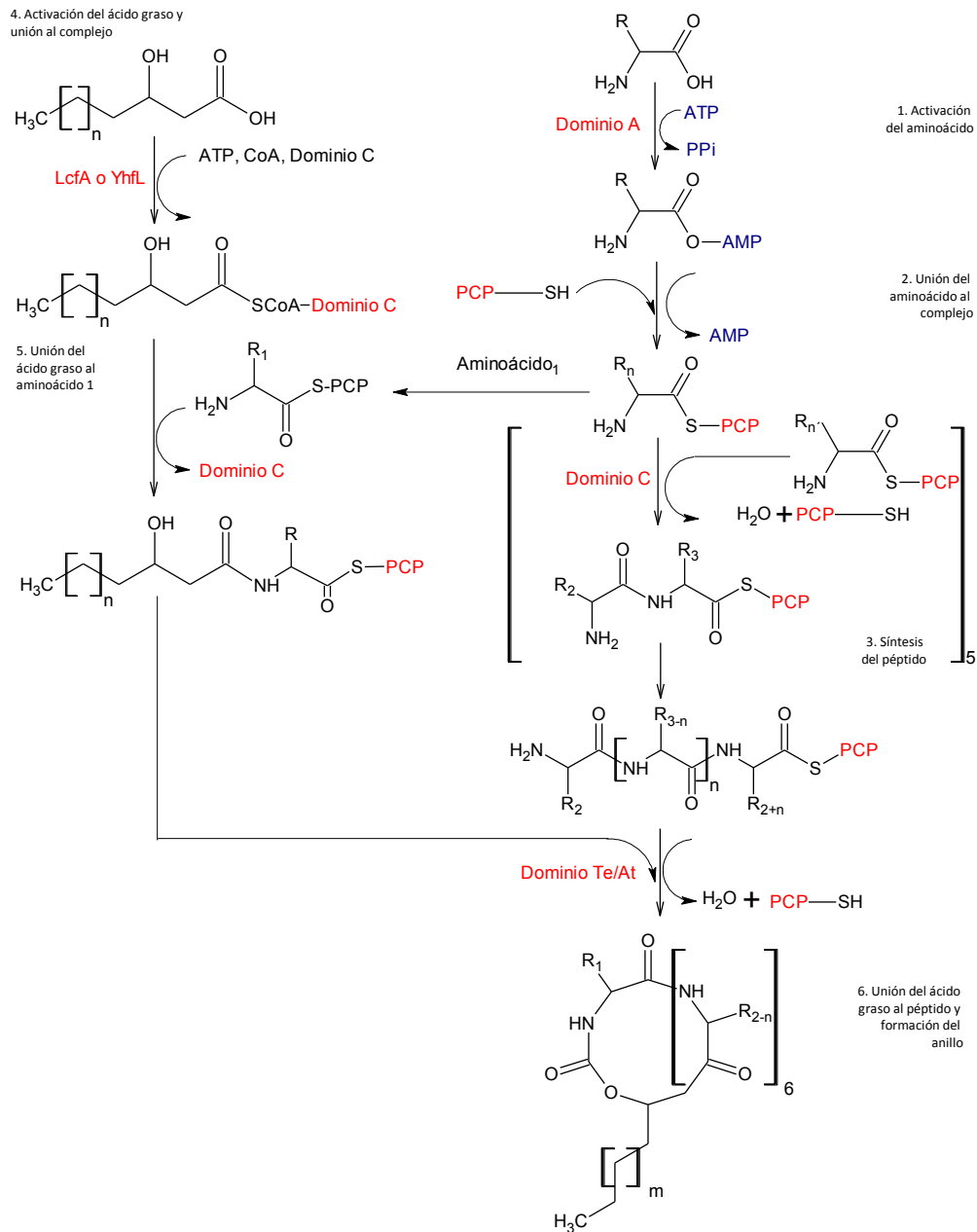


Figura 4. Ruta de síntesis de la surfactina. Letras en rojo representan los dominios de la sintetasa de surfactina involucrados en cada paso de síntesis.

Para el caso de la bacilomicina D, ya se ha realizado la caracterización y análisis del operón que codifica para su sintetasa en *Bacillus subtilis* AU195 (Moyné y col. 2004). La figura 5 muestra un diagrama del operón. Aquí puede observarse que están involucrados cuatro genes: *BamD*, *BamA*, *BamB* y *BamC*, en los que se encuentran codificadas enzimas necesarias para la síntesis de la parte

peptídica y la unión del ácido graso, tal como se ha descrito anteriormente. A diferencia de otras sintetetasas, como la de surfactina, la de bacilomicina D es capaz el activar el ácido graso con CoA y β -aminarlo en pasos previos a la formación del enlace amida que cierra el anillo peptídico.

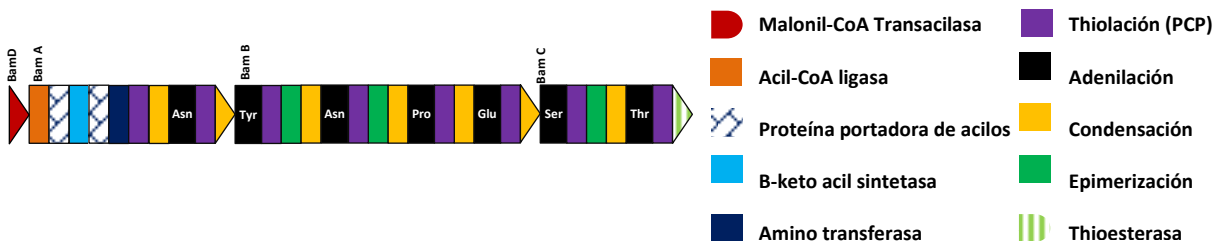


Figura 5. Operón de la sintasa de bacilomicina D de *Bacillus subtilis* AU195. Se indican con colores los distintos dominios catalíticos del complejo multienzimático (Moyné y col. 2004).

3.2.1 Perfil de ácidos grasos en *Bacillus*

Normalmente, en la síntesis de ácidos grasos (C_{14} y C_{16} , los de mayor abundancia en bacterias) se emplean como precursor a la acetil-coenzima A, la cual sufre una carboxilación para formar malonil-coenzima A. Sin embargo, *Bacillus subtilis*, también suele emplear la metil-butiril-coenzima A como iniciador para la síntesis de los ácidos grasos *anteiso*- C_{15} y *anteiso*- C_{17} . La metil-butiril-coenzima A es obtenida a partir de la síntesis del L- α -keto-beta-valerato (el ácido alfa-keto de la L-isoleucina). De manera similar puede emplear la *iso*-valeril-coenzima A y la *iso*-butiril-coenzima A (los α -keto ácidos correspondientes a la L-leucina y L-valina) para sintetizar al ácido graso *iso*- C_{16} (Kaneda, 1966, 1977).

Mencionado lo anterior, las bacterias del género *Bacillus* producen ocho distintos ácidos grasos: dos normales (*n*- C_{14} y *n*- C_{16}) y seis metilados en la cadena hidrocarbonada principal (*anteiso*- C_{15} , *anteiso*- C_{17} , *iso*- C_{14} , *iso*- C_{14} , *iso*- C_{15} , *iso*- C_{16} , y *iso*- C_{17}), estos últimos los de mayor abundancia (inclusive pueden representar más del 60 % del total de lípidos, Kaneda, 1966, 1977). Aunque pueden ocurrir excepciones, ya que por ejemplo, *B. cereus* sintetiza los ácidos *anteiso*- C_{13} , *iso*- C_{12} , *iso*- C_{13} y un *n*- C_{16} monoenoico, en adición a las demás especies (Kaneda, 1966, 1977). En general, por tipo de metilación, los *anteiso*- C_{15} y *anteiso*- C_{17} son los más abundantes, seguidos de los *iso*- C_{15} e *iso*- C_{17} ; después *iso*- C_{14} y *iso*- C_{16} , y por último *n*- C_{14} y *n*- C_{16} . Kaneda (1977) calculó la distribución de ácidos grasos en *Bacillus subtilis*, obteniendo: *anteiso*- C_{15} (33 %), *anteiso*- C_{17} (10 %), *iso*- C_{15} (14 %), *iso*- C_{17} (15 %), *iso*- C_{14} (4 %), *iso*- C_{16} (11 %), *n*- C_{14} (0 %) y *n*- C_{16} (6 %). De manera general, el ácido más abundante dentro del género es el *anteiso*- C_{15} (en medio de glucosa-extracto de levadura, específicamente).

Se pensaría que el perfil de ácidos grasos presentes en los lipopéptidos (surfactina, iturina y fengicina) corresponda exactamente al presente en la membrana de *Bacillus* spp.; sin embargo, esto no parece ser de esta forma. Por ejemplo, en *Bacillus subtilis* HC8, cada familia de lipopéptidos presenta un perfil de ácidos grasos distinto. En iturinas se presentan las cadenas: C_{14} , C_{15} , C_{16} y C_{17} ; en fengicina A: C_{14} , C_{15} , C_{16} , C_{17} , C_{18} , C_{15} , C_{16} , y C_{17} ; en fengicina B: C_{15} , C_{16} , C_{17} , C_{18} ; y en surfactina: C_{12} , C_{13} , C_{14} , C_{15} y C_{16} (Malfanova y col. 2012).

3.3 Operaciones de separación y técnicas de análisis para la identificación de lipopéptidos

Distintos protocolos se han desarrollado para lograr purificar e identificar los distintos lipopéptidos producidos por *Bacillus* spp. Los lipopéptidos son compuestos que, debido a su estructura anfipática, tienden a formar agregados en solución acuosa, lo que facilita su purificación. Es posible emplear esta propiedad en los primeros pasos de purificación, mediante el uso de ultrafiltración, una vez que la biomasa se ha retirado de los caldos de cultivo. A pesar de que los lipopéptidos poseen un peso molecular aproximado a los 1000 Da, es posible retenerlos en cartuchos con un tamaño de corte de 300 kDa, ya que tienden a formar vesículas (Yu y col. 2002). Posterior a estos primeros pasos, se hace uso recurrente de la precipitación ácida para co-precipitar toda la mezcla total de lipopéptidos sintetizados (Cuadro 2, Gong y col. 2014; Cao y col. 2012; Zhao y col. 2012; Ramarathnam y col. 2007). Posteriormente se hace uso de solventes orgánicos para operaciones de extracción líquido-sólido del material precipitado (Cuadro 2, Ma y col. 2012; Thasana y col. 2010; Béchet y col. 2013; Kim y col. 2004a; Kim y col. 2010; Cho y col. 2003).

Los extractos metanólicos (donde están contenidos los lipopéptidos) obtenidos por precipitación ácida, mantienen su actividad antimicrobiana aún después de ser sido sometidos a 100 °C durante 30 min, o bien, a un amplio rango de pH (2-12, Zhang y col. 2012). Por esta razón, pueden emplearse operaciones de evaporación, para retirar solventes.

Una vez que el material se ha extraído y concentrado, el uso de distintas etapas de cromatografía es necesario para purificar los compuestos y obtenerlos de manera pura. La cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) es la técnica más utilizada para la purificación de estos lipopéptidos, ya que se aprovecha el carácter hidrofóbico del lipopéptido conferido por la cadena de ácido graso (Cuadro 2). Por ejemplo, Kim y col. (2004a) purificaron y caracterizaron compuestos producidos por *Bacillus thuringiensis* CMB26, que poseen actividad antifúngica, mediante precipitaciones con ácido clorhídrico y extracción con cloroformo/metanol seguido de HPLC en fase reversa (RP-HPLC) y detectándolos a 215 nm. Por su parte, Cho y col. (2003) aislaron e identificaron homólogos de iturina A de una cepa *Bacillus subtilis* KS03 con otro protocolo de purificación. Este consistió en una extracción con butanol y una purificación con cromatografía de líquidos con una resina a base de Sefarosa CL-6B con grupos dietilainoetil (DEAE) y cromatografía de capa fina preparativa (TLC, Cuadro 2).

La cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) y la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) son herramientas útiles para la determinación de la secuencia peptídica y la cadena de ácido graso (Yang y col. 2006, 2007), respectivamente. Existen numerosos reportes sobre la identificación de lipopéptidos en *Bacillus* spp. mediante estas técnicas (Cuadro 2, Gong y col. 2014; Cao y col. 2012; Zhao y col. 2012; Ramarathnam y col. 2007; Tendulkar y col. 2007; Ma y col. 2012; Thasana y col. 2010; Béchet y col. 2013; Kim y col. 2004a; Kim y col. 2010; Cho y col. 2003). Los lipopéptidos cíclicos producidos por *Bacillus* spp. también pueden poseer cadenas de ácido graso con insaturaciones (Kim y col. 2004). Para resolver dichas estructuras, también pueden emplearse técnicas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN, Ma y col. 2012).

Cuadro 2. Reportes de aislamiento e identificación de lipopéptidos y otras proteínas sintetizadas por *Bacillus* con actividad antifúngica contra patógenos de importancia agrícola y otros patógenos.

Cepa	Lipopéptido	Operaciones de purificación	Técnica de Identificación	(<i>m/z</i>) de Homólogos	Actividad antimicrobiana	Referencia
<i>B. subtilis</i> fmbj	Bacilomicina D	Precipitación ácida Extracción líquido-sólido (MeOH) PR- HPLC (C ₁₈ , Agua/ACN) GFC (Sephadex LH-20, MeOH)	HPLC-ESI-CID-MS	1031, 1045, 1059, 1073 ([M+H] ⁺)	<i>A. flavus</i>	Gong y col. (2014)
<i>B. subtilis</i> SQR 9	Fengicina A, B Bacilomicina D, L	Precipitación ácida (pH=2) Extracción sólido-líquido (MeOH) RP-HPLC (ACN/Agua)	LC-MS-ESI	1063 (Bacilomicina L, [M+H] ⁺) 1017, 1031, 1045 (Bacilomicina D, [M+H] ⁺) 1506 (Fengicina B, [M+H] ⁺) 1435, 1449, 1463, 1492, 1477 (Fengicina A)	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	Cao y col. (2012)
<i>B. amyloliquefaciens</i> Q-426	Fengicina A y B Bacilomicina	Precipitación ácida (pH=2) Extracción sólido-líquido (MeOH) GFC (Sephadex LH-20, MeOH: Agua) RP-HPLC (C ₁₈)	MS-ESI	1449, 1463 (Fengicina A, [M+H] ⁺) 1477, 1505 (Fengicina B, [M+H] ⁺) 1045, 1059, 1045 (Bacilomicina D, [M+H] ⁺)	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>spinaciae</i>	Zhao y col. (2012)
<i>B. subtilis</i> 49	Bacilomicina D Fengicina	Precipitación ácida Extracción sólido-líquido (MeOH) GFC (Columna LH-20) HPLC (ACN/Agua)	MALDI-TOF-MS	1069, 1083, 1097, 1111 (Bacilomicina D [M+Na] ⁺) 1449-1543 (Fengicina, [M+H] ⁺)	<i>S. sclerotiorum</i> <i>F. graminearum</i>	Ramara-thnam y col. (2007)
<i>B. licheniformis</i> BC98	Surfactina	Extracción líquido-líquido (MeOH/ CHCl ₃) RP-HPLC (C ₁₈ , MeOH/Agua)	MALDI-TOF-MS 500 MHz 1H NMR	1007, 1021, 1035, 1049, 1063, 1077 ([M+H] ⁺)	<i>M. grisea</i>	Tendulkar y col. (2007)
<i>B. mojavensis</i> B0621A	Mojavensina A	Precipitación básica y ácida (pH=8,2) Extracción sólido-líquido (MeOH)	HR-ESI-MS QTOF-MS NMR	1084 ([M+H] ⁺)	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerium</i>	Ma y col. (2012)
<i>B. subtilis</i> SSE4	Subtulene A	Extracción líquido-líquido (Hexano) Extracción líquido-líquido (AcOEt) HPLC (C ₁₈ , Agua/MeOH)	microTOF HR-MS NMR	1079 [M+Na] ⁺	<i>Colletotrichum</i> sp.	Thasana y col. (2010)
<i>B. subtilis</i> BBG116	Micosubtilina	Extracción en fase sólida (C ₁₈), Extracción líquido-sólido (MeOH) RP-HPLC (C ₁₈ , ACN/Agua)	MALDI-TOF MS-MS-ESI	1057, 1085, 1071, 1099, 1085 ([M+H] ⁺)	<i>B. cinerea</i> <i>F. oxysporum</i>	Béchet y col. (2013)
<i>B. thuringiensis</i> CMB26	Fengicina	Precipitación ácida Extracción líquido-sólido (CHCl ₃ /MeOH) RP-HPLC (C ₁₈ , Agua/ACN)	MALDI-TOF-MS, Degradación de Edman, GC-MS	1463, 1477, 1491, 1505 ([M+H] ⁺)	<i>C. gloeosporioides</i> <i>E. coli</i> <i>P. rapae crucivora</i>	Kim y col. (2004)
<i>B. subtilis</i> CMB32	Iturina A Fengicina Surfactina	Precipitación ácida Extracción líquido-sólido (CHCl ₃ /MeOH) GFC (Sephadex LH-20) RP-HPLC (C ₁₈ , ACN/Agua)	MALDI-TOF-MS	1080 (Iturina A, [M+H] ⁺) 1486 (Fengicina, [M+H] ⁺) 1044 (Surfactina, [M+H] ⁺)	<i>C. gloeosporioides</i>	Kim y col. (2010)
<i>B. subtilis</i> KS03	Iturina A	Extracción líquido-líquido (<i>n</i> -Butanol) GFC (DEAE Sepafora CL-6B) TLC (Silica gel 60 F ₂₅₄ , CHCl ₃ /MeOH)	MS-MS-MALDI-TOF	1043, 1057, 1071 ([M+H] ⁺)	<i>C. gloeosporioides</i>	Cho y col. (2003)

GFC (Cromatografía de Filtración en Gel), DEAE (Diétil-Amino-Etanol), TCL (Cromatografía en Capa Fina), HPLC (Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución), ESI (Ionización por Electrospray), CID (Disociación Inducida por Colisión), MS (Espectrometría de Masas), LC (Cromatografía de Líquidos), MALDI-TOF (Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz-Time of Flight), NMR (Resonancia Magnética Nuclear), HR-ESI-MS (ESI-MS de Alta Resolución), QTOF-MS (Espectrometría de Masas en tándem con detección TOF y un analizador de masas cuadrupolar) y GC (Cromatografía de Gases).

El número de estructuras dilucidadas para los lipopéptidos de *Bacillus* spp., se incrementa constantemente. Hiradate y col. (2002) aislaron una nueva forma de iturina A de 1084 Da. Esta iturina con una cadena C₁₇ en su FA-β-NH₂, presenta una inusual metilación en el carbono 14 de la parte lipofílica. Entre algunos otros ejemplos, del hallazgo de lipopéptidos cíclicos con modificaciones específicas, se encuentra la “*Subtulene A*” (Thasana y col. 2010). Este lipopéptido posee la misma secuencia peptídica que la iturina A, pero difiere en su sección lipofílica, ya que posee un ácido graso insaturado (el 3-amino-13-metil-tetradeca-8-enoico); lo que resulta inusual. Estas diferencias, pueden ocasionar cambios en sus conformaciones activas, lo que repercute en su actividad biológica.

3.4 Comportamiento en fase acuosa de los lipopéptidos y la relación con su mecanismo de acción

Los lipopéptidos sintetizados por *Bacillus* presentan interesantes propiedades como biosurfactantes. La surfactina, como anteriormente mencionamos, cuenta con acción antibacteriana, es hemolítica, es capaz de secuestrar iones y forma poros iónicos en biomembranas. Asimismo, es inhibidor de enzimas como la c-AMP fosfodioesterasa (Hosono y Suzuki, 1983). Por otro lado, otros compuestos de menor capacidad biosurfactante, como la iturina A, exhiben una alta actividad antibiótica contra un gran número de hongos, mientras que su actividad antibacteriana está limitada a algunas bacterias tales como *Micrococcus luteus* (Maget-Dana y Peypoux, 1994). Estas diferencias en su acción antibiótica están estrechamente relacionadas a sus secuencias peptídicas y a las características de agregación que les confiere poseer una cadena de ácido graso; por lo que cambios mínimos en su estructura pueden afectar fuertemente su conformación activa.

La iturina A, al ser una sustancia anfipática, se sabe que interactúa con fosfolípidos e induce la formación de poros iónicos en membranas lipídicas (Maget-Dana y col. 1985). Esta actividad antifúngica está relacionada con su interacción a la membrana citoplásmica de las células blanco, en donde aumenta la permeabilidad de K⁺ (Maget-Dana y Peypoux, 1994). Una vez dentro de la membrana, las moléculas de iturina forman estructuras oligoméricas con actividad de poro iónico, que podrían ser agregados lipopeptídicos o agregados lipopéptido-fosfolípidos, los cuales crecen a un tamaño que permite liberar el potasio intracelular. Además, muestran que la iturina interactúa fuertemente con esteroides, formando complejos. Se sugiere que la estructura biológicamente activa es la tercia iturina/fosfolípido/esterol. Ya que las vesículas o micelas de la iturina exponen la D-Tyr₂ al medio acuoso, se ha propuesto que el grupo fenol de este residuo interactúa con el hidroxilo del ergosterol en la membrana de hongos (Nail-Nasir y Besson, 2012b). Esto pudiera explicar la gran variabilidad de MIC reportadas para distintas cepas de hongos, quizás por sus distintas proporciones y/o tipos de esteroides en su membrana. Esta interacción con esteroides es similar a como ocurre en otros antifúngicos que incrementan la permeabilidad de la membrana, como la amfotericina (Maget-dana y Ptak, 1990).

Dado que las estructuras dentro de las familias de lipopéptidos son muy similares, se pensaría que el mecanismo de acción es similar, pero los resultados de investigaciones realizadas para caracterizar su comportamiento surfactante, muestran diferencias notables, sugiriendo que pueden existir distintos mecanismos. Por ejemplo, al comparar la capacidad hemolítica de distintos lipopéptidos de

la familia de la iturina, la micosubtilina es la más activa, seguido de la iturina y la bacilomicina (Nail-Nasir y Besson, 2012a).

En relación a su comportamiento surfactante, los lipopéptidos de *Bacillus* spp., presentan fenómenos de auto-agregación en fase acuosa, el cual está íntimamente ligado a su actividad. Para el caso de la surfactina, sugieren que el fenómeno de autoasociación podría deberse a agregaciones micelares vía puentes de hidrógeno (Jauregui y col. 2013). Asimismo, este grupo reporta que otros lipopéptidos, como la micosubtilina, presentan este mismo comportamiento macromolecular al formar micelas. Sin embargo, ambos lipopéptidos presentan comportamientos con marcadas diferencias. En solución acuosa, la surfactina y la micosubtilina presentan una CMC (concentración crítica micelar) distinta y forman micelas de diámetro promedio distintos, dependiendo de la concentración. En mezcla forman micelas del mismo tamaño, sin importar la relación molar y sin poseer una distribución bimodal, sugiriendo que las micelas entre lipopéptidos en realidad son copoliméricas en su totalidad. Ello explicaría las probables interacciones sinérgicas con respecto a su actividad biológica.

Dentro de la literatura no existen reportes de la determinación de la CMC de distintos homólogos de un mismo lipopéptido. Sin embargo, se ha observado que la dosis necesaria para inhibir hongos fitopatógenos es menor a la CMC (al menos de las mezclas de homólogos de un mismo lipopéptido). Ello sugiere que el estado micelar del antibiótico no es necesario para su absorción en la membrana. Nazari y col. (2012) proponen que aquellos fungicidas lipopeptídicos, como la fengicina y la iturina, pueden solubilizar la membrana sin alcanzar una concentración crítica o desorden general, sino por una disrupción localizada, debida a la segregación espontánea de los lípidos y/o ocasionando defectos en el transporte celular.

Otro aspecto relevante es el hecho de que lipopéptidos como la iturina, son capaces de encapsular sustancias polares (como la carboxifluoresceína), ya que forman agregados en forma vesículas y/o micelas. Estos agregados presentan una distribución de tamaño que está en función de la concentración del lipopéptido (Grau y col. 2001). De acuerdo al diámetro promedio (150 nm) de los agregados de iturina, se llegó a la hipótesis de que las vesículas de iturina, funcionan como mecanismos de transporte de otros metabolitos antifúngicos de bajo peso molecular (Grau y col. 2001).

De acuerdo a este comportamiento agregacional, Grau y col. (2001) concluyen que las moléculas de iturina toman una organización lamelar (capaz de encapsular compartimentos acuosos) similar a la de algunos fosfolípidos y lisofosfolípidos. Asimismo, proponen que la iturina, al entrar en contacto con su membrana blanco y establecer interacciones lipopéptido-fosfolípido fuertes y favorables induce cambios de curvatura de membrana y la formación de poros iónicos.

3.6 Sección lipofílica de los lipopéptidos, un factor determinante para su actividad biológica

Por lo regular, los reportes encontrados en la literatura, determinan la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los homólogos de lipopéptido en mezcla. Sin embargo, se ha observado que la

sección lipofílica en los lipopéptidos es un factor determinante para su actividad biológica. Por ejemplo, la sustitución del ácido graso por una alanina en una molécula de iturina, ocasiona una pérdida total su actividad (Volpon y col. 2007), por lo que debe existir una longitud de cadena mínima para que estas moléculas sean efectivas.

En algunos estudios (e.g. Béchet y col. 2013; Kajimura y col. 1995; Dunlap y col. 2011), en los que se ha evaluado la MIC para diferentes homólogos, se ha observado que se correlaciona de manera positiva la actividad del antibiótico con un aumento en la longitud de la cadena de ácido graso, aunque nunca se muestra un análisis estadístico que sustente tal conclusión (Cuadro 3). La cepa de *Bacillus subtilis* reportada por Phae y Shoda (1991), es capaz de sintetizar iturina en seis diferentes homólogos, los cuales poseen las siguientes FA- β -NH₂: *n*-C₁₄, *anteiso*-C₁₅, *iso*-C₁₅, *n*-C₁₆, *iso*-C₁₆ y *n*-C₁₇. En este reporte se indica que la actividad antifúngica (contra hongos filamentosos) de los homólogos C₁₄₋₁₅ es menor con respecto a los C₁₆, no existiendo diferencia entre los C₁₄ y aquellos C₁₅.

Este hecho también se ha cumplido en lipopéptidos obtenidos por síntesis química, tal como lo reportó Makovitzki y col. (2006). Este grupo de investigadores sintetizaron dos pequeños péptidos capaces de inhibir el crecimiento de *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus flavus*. Las secuencias de estos dos péptidos son: KLLK y KAAAK unidos a tres diferentes cadenas lipofílicas (C₁₂, C₁₄ y C₁₆). Los resultados de Makovitzki y col. (2006) indican que la toxicidad de ambos lipopéptidos aumenta si lo hace la longitud de cadena del ácido graso, cumpliéndose aún cuando el microorganismo que se pretende inhibir es un hongo filamentoso o una levadura. Por ejemplo, Phae y col. (1990) determinó la MIC de distintos homólogos de iturina A para inhibir a dos levaduras: *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida tropicalis*. Sus resultados mostraron que ambas levaduras tienen una susceptibilidad similar al lipopéptido, cumpliéndose la correlación antes mencionada.

3.5 Efecto de los lipopéptidos en la morfología de los hongos fitopatógenos y bacterias

Estudios con SEM (*Scanning Electron Microscopy*) y TEM (*Transmission Electron Microscopy*) revelan que la bacilomicina D lesiona la pared y membrana celular tanto de la hifa como de la espora de *Aspergillus flavus*. Esto ocasiona que el citoplasma y los organelos celulares salgan de la célula a través de agujeros en la membrana (Gong y col. 2014). Un efecto similar ha sido observado por causa de otros lipopéptidos, como la surfactina. Por ejemplo, la surfactina aislada *Bacillus licheniformis* BC98, ocasiona la formación de hifas anormales con forma de bulbo, así como un citoplasma anormal, en *Magnaporthe grisea* (Tendulkar y col. 2007). En este caso, el citoplasma de las células control es denso, homogéneo y uniforme. Por el contrario, el citoplasma de las muestras tratadas con el lipopéptido fue granular, fibroso y vacuolado. Asimismo, provoca el adelgazamiento de la membrana citoplásmica sin provocar su ruptura y una elongación de la mitocondria de tres a cuatro veces respecto al control.

Por otra parte, la mezcla total de lipopéptidos (de diversas familias) sintetizados por *B. subtilis*, ocasionan la desorganización del citoplasma, la desintegración de la membrana y finalmente la lisis celular en bacterias como *Xanthomonas campestris* pv. *curcubitae* (Zerriouh y col. 2011).

Cuadro 3. Concentración mínima inhibitoria 100 (MIC₁₀₀) reportadas para distintos lipopéptidos.

Cepa productora	Lipopéptido	Actividad contra	Homólogo	PM (Da)	MIC (μM)	Referencia
<i>B. subtilis</i> BBG116	Micosubtilina	<i>B. cinerea</i>	<i>iso</i> -C ₁₆	1070	32	Béchet y col. (2013)
			<i>n</i> -C ₁₆	1070	16	
			<i>iso</i> -C ₁₇	1084	16	
			<i>anteiso</i> -C ₁₇	1084	8	
<i>B. subtilis</i> BBG116	Micosubtilina	<i>B. cinerea</i>	<i>iso</i> -C ₁₆	1070	32	Béchet y col. (2013)
			<i>n</i> -C ₁₆	1070	16	
			<i>iso</i> -C ₁₇	1084	16	
			<i>anteiso</i> -C ₁₇	1084	8	
<i>B. subtilis</i> FR-2	Bacilopeptina	<i>S. cerevisiae</i>	<i>n</i> -C ₁₄	1020	>98	Kajimura y col. (1995)
			<i>iso</i> -C ₁₅	1034	>96.7	
			<i>iso</i> -C ₁₆	1048	23.85	
<i>B. subtilis</i> FR-2	Bacilopeptina	<i>F. oxysporum</i>	<i>n</i> -C ₁₄	1020	>98	Kajimura y col. (1995)
			<i>iso</i> -C ₁₅	1034	>96.7	
			<i>iso</i> -C ₁₆	1048	23.85	
<i>B. subtilis</i> FR-2	Bacilopeptina	<i>A. niger</i>	<i>n</i> -C ₁₄	1020	>98	Kajimura y col. (1995)
			<i>iso</i> -C ₁₅	1034	>96.7	
			<i>iso</i> -C ₁₆	1048	5.9	
<i>B. subtilis</i> FR-2	Bacilopeptina	<i>A. oryzae</i>	<i>n</i> -C ₁₄	1020	>98	Kajimura y col. (1995)
			<i>iso</i> -C ₁₅	1034	>96.7	
			<i>iso</i> -C ₁₆	1048	11.9	
<i>B. subtilis</i> FR-2	Bacilopeptina	<i>P. thomii</i>	<i>n</i> -C ₁₄	1020	>98	Kajimura y col. (1995)
			<i>iso</i> -C ₁₅	1034	>96.7	
			<i>iso</i> -C ₁₆	1048	11.92	
<i>B. mojavensis</i> B0621A	Majavensina A	HL-60	<i>anteiso</i> -C ₁₅	1084	100 (IC ₅₀) ^{/-2}	Ma y col. (2012)
<i>B. mojavensis</i> B0621A	Fengicina B	HL-60	<i>iso</i> -C ₁₆	1492	100 (IC ₅₀)	Ma y col. (2012)
<i>B. mojavensis</i> B0621A	Fengicina B	HL-60	<i>anteiso</i> -C ₁₇	1506	1.6 (IC ₅₀)	Ma y col. (2012)
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	Micosubtilina	<i>S. cerevisiae</i>	<i>anteiso</i> -C ₁₇	1100	3.6	Fickers y col. (2009)
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	Micosubtilina	<i>Y. lipolytica</i>	<i>anteiso</i> -C ₁₇	1100	7.27	Fickers y col. (2009)
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	Micosubtilina	<i>C. albicans</i>	<i>anteiso</i> -C ₁₇	1100	29	Fickers y col. (2009)
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	Micosubtilina	<i>A. fumigatus</i>	<i>anteiso</i> -C ₁₇	1100	>272.7	Fickers y col. (2009)
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	Micosubtilina	<i>A. parasiticus</i>	<i>anteiso</i> -C ₁₇	1100	>272.7	Fickers y col. (2009)
<i>B. subtilis</i>	Iturina A	<i>G. zeae</i>	-C ₁₄	1042	0.032	Dunlap y col. (2011)
			-C ₁₅	1056	0.016	
<i>B. subtilis</i>	Fengicina	<i>G. zeae</i>	-C ₁₆	1462	0.064	Dunlap y col. (2011)
			-C ₁₇	1476	0.064	
			-C ₁₈	1490	0.032	
Cepa productora	Lipopéptido	Actividad contra	Homólogo	PM (Da)	MIC (μg/ml)	Referencia
<i>B. subtilis</i> UMAF6614 y UMAF6639	Bacilomicina	<i>X. campestris</i>	/- ₁	/- ₁	10 ⁻³	Zeriuoh y col. (2011)
<i>B. subtilis</i>	Iturina D	<i>F. oxysporum</i>	/ - ₁	1043	30 ⁻³	Besson y Michel (1987)
				1058		
				1072		
<i>B. subtilis</i>	Iturina D	<i>S. cerevisiae</i>	/ - ₁	1043	15 ⁻³	Besson y Michel (1987)
				1058		
				1072		
<i>B. subtilis</i>	Iturina E	<i>S. cerevisiae</i>	/ - ₁	1057	30 ⁻³	Besson y Michel (1987)
				1071		
				1085		
<i>B. subtilis</i>	Iturina E	<i>F. oxysporum</i>	/ - ₁	1057	40 ⁻³	Besson y Michel (1987)
				1071		
				1085		
<i>B. subtilis</i> fmbJ	Bacilomicina D	<i>A. flavus</i>	/- ₁	/- ₁	200-400 ⁻³	Gong y col. (2014)
<i>B. amyloliquefaciens</i> Q-426	Fengicina	<i>F. oxysporum</i>	/- ₁	1462 1448	31 ⁻³	Zhao y col. (2012)
<i>B. subtilis</i> RB14-CS	Plipastatina	<i>R. solani</i>	/- ₁	/- ₁	100000 ⁻³	Mizumoto y col. (2007)
<i>B. subtilis</i> RB14-CS	Iturina	<i>R. solani</i>	/- ₁	/- ₁	12500 ⁻³	Mizumoto y col. (2007)

/-₁ No indicado en referencia. /-₂ Concentración inhibitoria 50. /-₃ MIC reportada para toda la mezcla de homólogos.

3.6 Importancia de los compuestos lipopeptídicos para reducir la incidencia de enfermedades en plantas

El análisis del genoma de cepas de *Bacillus*, tales como el de *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* CAU B946, han demostrado que destinan cerca de 8.5 % de su información genómica para la síntesis de lipopéptidos, policétidos y otros compuestos de origen no ribosomal (Blom y col. 2012). El silenciamiento de los genes relacionados con la síntesis de estos compuestos compromete su capacidad para inhibir fitopatógenos, lo que hace énfasis en su importancia para aplicaciones agrícolas. El cuadro 4 muestra algunos ejemplos reportados en la literatura acerca del uso de *Bacillus* spp. como agentes de control biológico. En algunos de ellos (Asaka y Shoda 1996; Romero y col. 2007; Álvarez y col. 2012; Yáñez-Mendizábal y col. 2011) se resalta la importancia de metabolitos como los lipopéptidos, sideróforos o enzimas líticas en su acción de control biológico.

Con respecto a los lipopéptidos, el grupo de Koumoutsi y col. (2004) usando mutantes de *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, comprobaron la importancia de los mismos para la antibiosis *in vitro* de fitopatógenos por parte de *Bacillus* sp. Mutantes en un solo gen (para *bmy*, *fen*, o *srf*) mostraron solo un retraso en su habilidad para inhibir el crecimiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* DSMZ 62313. Sin embargo, en dobles mutantes (en *bmy* y *fen*) no se inhibió el crecimiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* DSMZ 62313, sugiriendo que ambos lipopéptidos actúan de manera complementaria o sinérgica. Asimismo, se ha demostrado que mutantes de *Bacillus amyloliquefaciens* C06 no productoras de bacilomicina D, poseen menor capacidad para inhibir la germinación de conidias de *Monilinia fructicola* (Liu y col. 2011). Otros autores han resaltado la importancia de la iturina sobre la antibiosis. Inclusive, la pérdida en su capacidad de sintetizar lipopéptidos (como la iturina) puede conllevar a la pérdida total de su capacidad de ejercer biocontrol (Zeriuoh y col. 2011). Por ejemplo, la cepa productora de iturina denotada como *Bacillus subtilis* RB14, es capaz de suprimir la enfermedad conocida como “marchitamiento fúngico” (*damping-off* en inglés) causado por *Rhizoctonia solani* en semillas de tomate. Sin embargo, mutantes en *lpa-14*, gen necesario para su síntesis, fueron incapaces de suprimir la enfermedad. Por otro lado, mutantes que fueron restauradas con el gen (mediante la inserción de un plásmido), recuperaron su capacidad de biocontrol (Asaka y Shoda, 1996). Con respecto a otros lipopéptidos, no involucrados directamente en la antibiosis de hongos, Pal Bais y col. (2004) indican que, una vez que *Bacillus subtilis* 6051 forma un biofilm estable y secreta surfactina, es capaz de proteger a las plantas contra bacterias fitopatógenas. Si ocurre una supresión de algún gen involucrado en la síntesis de surfactina, *Bacillus subtilis* M1 se vuelve poco eficiente para ejercer acción de biocontrol sobre *P. syringae* en raíces de *Arabidopsis*. La capacidad de control biológico para las distintas cepas de *Bacillus subtilis* que han tenido éxito en su comercialización como agentes de control biológico, esta relacionada con su habilidad de sintetizar estos antibióticos de naturaleza lipopeptídica. En este contexto, Raghavendra y McSpandden-Gardener (2005) desarrollaron oligonucleótidos específicos para la amplificación por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) de cinco genes (*bmyB*, *fenD*, *ituC*, *srfAA* y *srfAB*) involucrados en la biosíntesis de estos metabolitos, observando que las cepas de *Bacillus subtilis* GB03, QST713 y MBI 600 (principios activos de diferentes productos de biocontrol biológico) fueron positivas para la amplificación de dichos genes (a excepción de *ituC* en GB03).

Cuadro 4. Inhibición de fitopatógenos mediante cepas de *Bacillus* e importancia de los lipopéptidos en su acción de control biológico.

Cepa	Patógeno	Enfermedad	Cultivo	Efecto	Referencia
<i>B. subtilis</i> CAS15	<i>F. oxysporum</i> schl. f. sp. <i>Capsici</i>	Marchitamiento por <i>Fusarium</i>	<i>Capsicum annuum</i>	CAS15 productora de bacililactina, redujo la incidencia de la enfermedad 12-56 %, sin embargo, la adición de hierro a las plantas reduce su efecto de biocontrol.	Yu y col.(2011)
<i>B. amyloliquefaciens</i> PPCB004	<i>A. citri</i>	Antracnosis	<i>Citrus</i> sp.	Disminución en el DSI de 92 % a 50 % en frutos de limón infectados artificialmente con <i>Alternaria citri</i> e inoculadas. Mutantes PPCB004itu- no mostraron diferencia significativa en el DSI con respecto al tratamiento control.	Arrebola y col. (2010)
<i>B. subtilis</i> RB14	<i>R. solani</i>	"Damping-off"	<i>Solanum lycopersicum</i>	Disminución en el porcentaje de plantas enfermas al emplear RB14 y aumento en la longitud de tallos y peso seco de los mismos con respecto a un control. Mutantes incapaces de sintetizar iturina mostraron un % de incidencia estadísticamente igual al control.	Asakaya y Shoda (1996)
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> C9	<i>R. solani</i>	Segmentación del tallo en pastos	<i>Zoysia</i> sp.	Disminución del SDE. Un componente activo contra el hongo resultó ser mezcla de estereoisómeros de 3,4-dihidroxi-3-metil-2-pentanona. Asimismo, caldos de cultivo libre de células de C9 demostraron actividad quitinasa.	Islam y col. (2012)
<i>B. subtilis</i> UMAF6614	<i>P. fusca</i>	Oidio de las cucurbitáceas	<i>Cucumis melo</i>	Reducción de la severidad en 90 % con respecto a un control. Mutantes de UMAF6614 incapaces de sintetizar bacilomicina o fengicina pierden su capacidad de ejercer acción de biocontrol.	Romero y col. (2007)
<i>B. amyloliquefaciens</i> MEP ₂ 18 y ARP ₂ 3	<i>S. sclerotiorum</i>	Pudrición del tallo	<i>Glicine max</i>	La aplicación de estas cepas productoras de lipopéptidos resultó en una eficiente protección con respecto a las plantas no inoculadas o plantas inoculadas con cepas no productoras de lipopéptidos.	Álvarez y col. (2012)
<i>B. subtilis</i> CPA-8	<i>M. fructicola</i> <i>M. laxa</i>	Moniliasis (Pudrición parda)	<i>Prunus</i> sp.	Disminución del porcentaje de incidencia de la enfermedad en plantas tratadas con suspensiones bacterianas de <i>Bacillus</i> con respecto al control. Mutantes incapaces de producir fengicina pierden su acción de biocontrol.	Yáñez-Mendizábal y col. (2011)
<i>B. amyloliquefaciens</i> DGA14	<i>T. paradoxa</i> <i>C. musae</i> <i>F. verticillioides</i>	Pudrición de la corona	<i>Musa paradisiaca</i>	Aplicaciones postcosecha en banano de <i>B. amyloliquefaciens</i> , redujo la incidencia de la enfermedad a niveles significativamente menores que aquellos frutos tratados con fungicidas o controles absolutos.	Alvindia y Natsuaki (2009)
<i>B. amyloliquefaciens</i> PPCB004	<i>C. gloeosporioides</i> <i>Phomopsis</i> spp.	Antracnosis "Phomopsis rot"	<i>Carica papaya</i>	Aplicaciones de PPCB004 y 1-metil ciclopropeno redujeron DSI y SDE de la antracnosis y phomopsis después de almacenamiento y maduración.	Osman y col. 2011
<i>B. subtilis</i> KS03	<i>C. trifolii</i>	Antracnosis	<i>Medicago sativa</i>	Disminución del DSI y SDE de plantas inoculadas con filtrados de medios de cultivo con respecto a un control. Disminución en la formación de apresorios, generación de conidios y porcentaje de germinación del patógeno.	Douville y Boland (1992)
<i>B. amyloliquefaciens</i> IN937a y IN937b	<i>C. gloeosporioides</i>	Antracnosis	<i>Capsicum annuum</i>	Disminución de la severidad de la enfermedad. Plantas tratadas con la mezcla de bacterias y el patógeno, tienen actividades SOD y PO de 25-30 % más con respecto a un control inoculado con el patógeno.	Jetiyanon y col. (2007)
<i>B. subtilis</i> SSE4	<i>C. gloeosporioides</i>	Antracnosis	<i>Dendrobium</i> sp.	Disminución del tamaño de la lesión significativamente menor entre un tratamiento control a base de hojas inoculadas con el patógeno comparadas contra aquellas hojas tratadas con 20 % v/v de sobrenadantes de <i>B. subtilis</i> .	Thasana y col. (2010)

DSI. Índice de la incidencia de la enfermedad ("Disease severity index"); indica el porcentaje de plantas con síntomas de la enfermedad comparadas con el número de plantas evaluadas. **SDE.** Severidad de la enfermedad o índice de severidad. Escala arbitraria para indicar de manera ponderada entre plantas sanas y enfermas. **PAL.** Actividad fenilalanina amonio liasa. **PPO.** Polifenol oxidasa. **POD.** Peroxidasa.

II. Antecedentes

1.0 Desarrollo del biofungicida comercial *Fungifree AB*®

Dentro del Instituto de Biotecnología de la UNAM y en colaboración con el CIAD-Culiacán, se ha desarrollado una tecnología a nivel industrial para la producción y formulación de un biofungicida para el control de la antracnosis del mango (enfermedad causada por *Colletotrichum gloeosporioides*) y otras enfermedades (Serrano-Carreón y col. 2010). Actualmente, este producto está siendo comercializado bajo el nombre *Fungifree AB*®, el cual posee como principio activo la cepa de *Bacillus* sp. 83. En términos del gen ribosomal (16s), *Bacillus* sp. 83 muestra un 99% de identidad con las secuencias de *B. subtilis* 168 y *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 (Aragón-Gómez, 2012). El producto comercial está sustentado en pruebas de efectividad biológica positivas a nivel de campo (Galindo-Fentanes y col. 2005) a partir de las cuales se definieron las dosis y frecuencias de aplicación. Su registro permite su empleo para el control de enfermedades (como la antracnosis y la cenicilla polvorienta) ocasionadas por hongos en más de veinte cultivos (Galindo y col. 2013, 2015).

La cepa *Bacillus* sp. 83 fue aislada del follaje de mango y seleccionada mediante ensayos *in vitro* en donde demostró actividad antagonista contra el hongo patógeno *Colletotrichum gloeosporioides*. En estos ensayos, se observaron halos de inhibición que evidenciaron la producción de sustancias fungicidas, sugiriendo a la antibiosis como mecanismo de control biológico de la bacteria. Aún se desconoce la identidad de los antibióticos generados durante el proceso de fermentación, pero se sabe que existe una actividad antifúngica residual dentro del producto final, derivado de los metabolitos generados durante este proceso, los cuales permanecen activos aún después de obtener la formulación final. Existen pocos antecedentes sobre la identificación de antibióticos lipopeptídicos producidos por *Bacillus subtilis* 83. Solis-Arcos (2010) logró la separación de tres diferentes compuestos termorresistentes con actividad antifúngica contra *Fusarium* sp., de caldos de cultivo de la cepa de *Bacillus* sp. 83, mediante extracciones con butanol y separación por RF-HPLC. Sin embargo, no se realizaron estudios acerca de su estructura química ni de su actividad biológica. Los resultados de Solis-Arcos (2010) sugieren la presencia de antibióticos lipopéptidicos, como iturinas, surfactinas y otros aún no identificados, ya que los tiempos de retención de esos compuestos son similares a los obtenidos por estándares comerciales. Otros resultados que sugieren la posible presencia de este tipo de compuestos, en los caldos de cultivo de *Bacillus* sp. 83, son los resultados reportados por Aragón-Gómez (2012), quien logró amplificar mediante PCR, los genes: *minA*, *srfA* e *ituD* (involucrados en la síntesis de los antibióticos: macroactina, surfactina e iturina, respectivamente) a partir de DNA genómico de *Bacillus* sp. 83.

III. Justificación, hipótesis y objetivos

Justificación

Se desconocen los mecanismos de acción de la cepa *Bacillus* sp. 83 para el control de la antracnosis del mango y otras enfermedades en plantas causadas por hongos fitopatógenos. Análisis de su genoma y ensayos de inhibición *in vitro* contra fitopatógenos, sugieren que la antibiosis es el mecanismo que está operando; sin embargo, no se han identificado con detalle los metabolitos antifúngicos.

Hipótesis

Bacillus sp. 83 produce antibióticos de origen lipopéptídico capaces de inhibir el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Objetivo general

Identificar, cuantificar y evaluar la actividad antifúngica de los compuestos lipopeptídicos producidos por *Bacillus subtilis* 83.

Objetivos particulares

Aislar e identificar aquellos compuestos lipopeptídicos producidos por *Bacillus subtilis* con la capacidad de inhibir *in vitro* el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* 09.

Determinar la dosis mínima inhibitoria de cada uno de los compuestos lipopeptídicos producidos por *Bacillus* sp. 83, activos contra esporas y micelio de *Colletotrichum gloeosporioides* 09.

IV. MATERIALES Y METODOS

1. Materia prima y microorganismos

Como materia prima para el aislamiento de antibióticos lipopéptidicos se empleó un caldo de cultivo donde fue propagada la cepa de *Bacillus* sp. 83 en modo lote alimentado, la cual se encontraba en fase estacionaria de crecimiento al momento de la toma de muestra (para más detalles acerca de la fermentación, véase la figura anexa A14, incluida en los anexos). Para los ensayos de inhibición se empleó una cepa de *Colletotrichum gloeosporioides* 09 aislada de filósfera de *Carica papaya* proporcionada por el Área de Horticultura del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Unidad Culiacán.

2. Purificación de lipopéptidos con actividad antifúngica

2.1 Centrifugación y ultrafiltración

El caldo de cultivo (20 l) de *Bacillus subtilis* se centrifugó en una centrífuga CEPA® LE/GLE (Lahr, Schwarzwald, DEU) de flujo continuo, la cual ofrece hasta 40,000 x g. Después de esta operación, el caldo libre de células se ultrafiltró mediante un equipo para ultrafiltración Amicon DC10L (Danvers, MA, USA) con capacidad máxima de 20 litros en modo discontinuo. Se emplearon tres diferentes tamaños de corte: 3, 10 y 100 kDa. Los cartuchos de ultrafiltración poseían las siguientes características: 1) 3 kDa, UFP-3-E-9A (Amersham Biosciences, Needham, MA, USA); 2) 10 kDa, H10P10-20 (Amicon, Beverly, MA, USA) y 3) 100 kDa, H5P100-43 (Amicon, Danvers, MA, USA). Para los tres tamaños de corte, la presión de trabajo se controló por abajo de 20 psi durante la operación.

2.2 Precipitación ácida y extracción sólido-líquido de los antibióticos lipopeptídicos

La muestra obtenida mediante ultrafiltración (correspondiente a un corte de $x > 100$ kDa) se llevó a pH=2 con una solución concentrada de HCl (6N) con el propósito de precipitar la muestra. Se incubó a 4 °C, durante una noche. Posteriormente se centrifugó a 12,000 x g. La pastilla se disolvió durante 4 horas en metanol, repitiéndose la extracción con metanol durante dos ocasiones. Mas adelante, este extracto soluble fue concentrado a 1/50 del volumen inicial mediante una operación de evaporación a vacío con un rotavapor® BU'CHI R-3 (Flawil, CHE), de una capacidad de entre 50 y 4000 ml, a 65°C.

2.3 Cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC)

La fracción concentrada fue fraccionada mediante cromatografía, en una primera etapa (Etapa 1), utilizando un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de Waters Serie 600 acoplado a un detector UV/VIS 2487 (Milford, MA, USA). Se usó una columna para fase reversa C₁₈ COSMOSIL 5 µM-AR-II, 4.61 D x 250 mm (Nacalai Tesque, Kyoto, JNP) a un flujo de 5 ml/min de fase móvil a base de agua (0.1 % v/v ácido fórmico) y acetonitrilo (0.1 % v/v de ácido fórmico). La temperatura de la columna fue de 30 °C. Los compuestos fueron detectados a una longitud de onda de 200 nm. El

programa de elución consistió en un gradiente de acetonitrilo, iniciando con 30 % v/v de acetonitrilo (0-1 min), prosiguió a 63 % v/v (1-17 min) y 100 % v/v (17-26 min), para luego descender a 45 % v/v (26-27 min) y 30 % v/v (27 min-45 min). Las fracciones recolectadas fueron sometidas a una operación de evaporación a vacío en un rotavapor BUCHI R-3 a 65 °C y liofilizadas en un equipo Free zone 4.5 (LABCONCO, Kansas, MO, USA) a -47 °C y 0.2 mBar. Al término de ésta, las muestras fueron suspendidas en metanol grado HPLC. Con este material se procedió a los bioensayos de inhibición *in vitro* en caja de Petri contra *Colletotrichum gloeosporioides* (como más adelante se menciona). Identificadas las fracciones activas, éstas fueron sometidas nuevamente a un fraccionamiento, en una segunda etapa (Etapa 2) de RP-HPLC bajo las mismas condiciones, con la excepción de emplear flujo isocrático a 55 % v/v agua y 45 % v/v de acetonitrilo. Para identificar preliminarmente los lipopéptidos con actividad antifúngica se emplearon los estándares de antibióticos comerciales de iturina A y surfactina (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, USA) de *Bacillus subtilis*, para compararlos en base a su tiempo de retención.

3. Identificación de compuestos con actividad antifúngica mediante espectrometría de masas

Las muestras con actividad antifúngica se disolvieron en una solución de 60/40 % v/v de acetonitrilo-agua (acidificado con 1 % v/v de ácido acético) e inyectadas directamente a un espectrómetro de masas a una concentración aproximada de 200 ng/μL. El equipo empleado fue un espectrómetro de masas LCQ DUO (Ion Trap Mass Spectrometer, Finnigan, San Jose, CA, USA) con una fuente de electrospray (ESI) de 2.1 a 3.1 kV. Posteriormente se realizó un análisis MS/MS para dilucidar la secuencia de la parte peptídica, mediante un espectrómetro Thermo-Scientific LTQ (Linear Trap Quadrupole, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) con una fuente de ionización de electrospray (ESI).

4. Bioensayos de inhibición en caja de Petri

Las fracciones con actividad antifúngica fueron detectadas mediante un ensayo *in vitro* en cajas de Petri. Se colocó un explante del hongo fitopatógeno en el centro de una caja de Petri con medio sólido de papa y dextrosa (PDA) como nutrientes, y se llevó a incubación durante 48 h a 29 °C. Posteriormente, se colocaron 50 μL de la muestra en dos orificios equidistantes (laterales) realizados con la ayuda de un sacabocados de 5 mm de diámetro, en cada placa. Finalmente, las cajas se incubaron a 29 °C por 60 horas y se comparó el crecimiento del hongo fitopatógeno en presencia del tratamiento y del testigo, para obtener el porcentaje de inhibición. Para ello, se mide (en centímetros) tanto del crecimiento radial de los tratamientos como el del control, y se calcula el porcentaje de inhibición, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición radial} = \frac{100 (\text{Crecimiento neto del control} - \text{Crecimiento neto del tratamiento})}{\text{Crecimiento neto del control}}$$

5. Cuantificación de bacilomicina D

La cuantificación de los compuestos aislados fue realizada mediante HPLC (empleado el equipo descrito en el apartado 2.3 de Materiales y Métodos), en una columna analítica Nucleosil 120-5 C₁₈ (Macherey-Nagel, Duren, DEU) a un flujo de 1.0 ml/min y 30 °C. Se empleó como patrón la iturina A (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, USA), la cual posee una mezcla de iturinas con cadenas hidrocarbonadas de C₁₃₋₁₇ con 95 % de pureza. Las muestras fueron suspendidas en metanol grado HPLC. La detección se realizó a 200 nm. Para ver detalles respecto a la curva estándar empleada, ver figura A1, incluida en los anexos.

6. Determinación de la concentración mínima inhibitoria 100 (MIC₁₀₀) para esporas y micelio

Para caracterizar la actividad antifúngica de los distintos homólogos de bacilomicina D de *Bacillus* sp. 83 se determinó su concentración mínima inhibitoria 100 (MIC₁₀₀). Esta MIC₁₀₀ se definió como la concentración (en μM) de bacilomicina D, a la cual se disminuyó en un cien por ciento el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* 09 con respecto a un control sin antibiótico, después de 58 h. Se determinó la MIC₁₀₀ para esporas y micelio de los distintos compuestos aislados. Para ello, se realizaron cultivos en medio líquido en matraces agitados de 50 ml de capacidad máxima, con 10 ml de medio PDB (que consiste en 200 g/l de infusión de papa, 20 g/l de dextrosa a pH=5.5). Los matraces fueron inoculados con una suspensión de esporas para alcanzar una concentración inicial de 2×10^5 esporas/ml. Para el caso de la MIC_{100-Espora} los distintos tratamientos fueron adicionados al tiempo cero en un volumen de 100 μL de MeOH y llevados a incubación a una velocidad de 120 rpm a 29 °C durante 58 h en oscuridad. Al finalizar este tiempo, se obtuvo el peso seco del micelio por tratamiento, mediante gravimetría. Finalmente, se obtuvo el porcentaje de inhibición con respecto a un control negativo, el cual consistió en esporas incubadas bajo las mismas condiciones y adicionadas con 100 μL de MeOH. Asimismo, también fue empleado un control absoluto que consistió en incubar esporas sin la adición del antibiótico ni solvente (MeOH).

Para el caso de la determinación de la MIC_{100-Micelio}, se esperó un lapso 12 h (tiempo en el cual las esporas iniciales han germinado, ver figuras A8 y A9, incluidas en los anexos) antes de la adición de los distintos tratamientos) y se procedió de la misma forma para determinar el porcentaje de crecimiento micelial con respecto al control. En la figura anexa A8 (incluida en el anexo) puede consultarse la cinética de germinación y de crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* 09 en este medio de cultivo (PDB).

A partir de los datos de biomasa de micelio, obtenida tras la exposición a diferentes concentraciones de bacilomicina D, se construyó un gráfico donde se indica el porcentaje de crecimiento micelial (con respecto al control negativo) en función de la concentración de bacilomicina D, en sus distintos homólogos. Estos datos fueron ajustados a dos distintos modelos matemáticos: uno de tipo logístico para la determinación de MIC_{100-Micelio}, y otro que describe una distribución de tipo Weibull (Chin-Diew, 2014) para MIC_{100-Espora}, los cuales se describen a continuación.

Weibull	$\%Crecimiento\ micelial = a \left(\frac{c-1}{c} \right)^{\frac{1-c}{c}} \left[\frac{X-d}{b} + \left(\frac{c-1}{c} \right)^{\frac{1}{c}} \right]^{c-1} e^{- \left[\frac{X-d}{b} + \left(\frac{c-1}{c} \right)^{\frac{1}{c}} \right]^c + \frac{c-1}{c}}$
Logístico	$\%Crecimiento\ micelial = \frac{\%Max}{1 + \left[\frac{X}{IC_{50}} \right]^{-s}}$

Donde: % Crecimiento micelial, es el porcentaje de crecimiento con respecto a un control negativo (a las 58 h); IC_{50} es la concentración inhibitoria a la cual se alcanza el cincuenta por ciento del crecimiento máximo (en $\mu M_{Antibiótico}$) con respecto al control negativo, % Max es el porcentaje máximo de crecimiento micelial a las 58 h, X es la concentración del homólogo de bacilomicina D en μM , S es la pendiente en μM^{-1} ; y a, b, c y d son constantes de ajuste. Los valores para la dosis mínima inhibitoria (MIC_{100}) se calcularon a partir de los datos simulados, donde el porcentaje de crecimiento micelial del tratamiento fuese estadísticamente igual al control a las cero horas ($p < 0.05$). Los análisis de varianza (ANOVA) y los análisis de comparación de medias (por una prueba de Tukey) se realizaron mediante Minitab 17 ($\alpha = 0.05$). El ajuste de los datos al modelo logístico y de Weibull se realizó mediante Sigma Plot (Versión 12.0). Para evidenciar los cambios en la morfología causados por la adición de bacilomicina D se capturaron microfografías en campo claro (Nikon 40X/0.65 160/0.17) de las esporas (en proceso de germinación) e hifa de *Colletotrichum gleosporioides* 09 en sus distintos homólogos a las 58 h de cultivo. Asimismo, al momento final del cultivo (58 h) y previo a la determinación del peso seco, se recolectó de los matraces el conjunto de los *pellets*, y se colocaron en una caja de Petri para capturar fotografías (PowerShot, Cannon, 12.1 Mpx).

7. Determinación del efecto fungistático de la bacilomicina D

Para discernir si la actividad antifúngica de la bacilomicina D resulta ser un efecto fungicida o fungistático, se realizó una prueba que consistió en incubar esporas de *Colletotrichum gleosporioides* 09 a una concentración inicial de 2×10^5 esporas/ml en matraces de 50 ml de capacidad (con 10 ml de medio PDB); a 120 rpm y 29 °C durante 58 h (tiempo en el cual, el tratamiento control alcanza su máximo de biomasa, ver figuras A8 y A9, incluidas en los anexos) con bacilomicina D. Transcurrido este tiempo, se retiró el sobrenadante mediante una operación de centrifugación y lavados con medio PDB fresco. Estas esporas que fueron expuestas a la bacilomicina D, se llevaron nuevamente a incubación bajo las mismas condiciones durante 58 h (para un total de 116 h). Al finalizar este periodo de incubación, se determinó el peso seco de la biomasa mediante gravimetría y se comparó su crecimiento (en gramos de biomasa por litro de cultivo) con respecto a tres controles. El primero consistió en un control absoluto, donde esporas en medio PDB se incubaron únicamente durante 58 h; un segundo, que correspondió a un control negativo, en el cual esporas adicionadas con 100 de MeOH (cantidad de solvente en el que son suspendidos los tratamientos de bacilomicina D) se incubaron a durante 58 h; y un tercero, en el que esporas incubadas durante 58 h en solución fisiológica (0.085 % p/v NaCl) fueron transferidas e incubadas a medio PDB fresco durante 58 h adicionales. Para los tratamientos con bacilomicina D, se emplearon dos homólogos: 1045 Da (Pico 5) y 1072 (Pico 15) para realizar esta prueba. Estos homólogos se emplearon de manera individual a las siguientes concentraciones: 1X, 1.6X y 2.1X la MIC_{100} determinada para esporas.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.0 Purificación y aislamiento de lipopéptidos antifúngicos de *Bacillus* sp. 83

1.1 Purificación de lipopéptidos antifúngicos de *Bacillus* sp. 83

El diagrama mostrado en la figura 6, indica las distintas fracciones que mostraron actividad antifúngica contra *Colletotrichum gloeosporioides*, después de una operación de purificación. Los resultados de los ensayos de inhibición para cada etapa de purificación se explican a continuación.

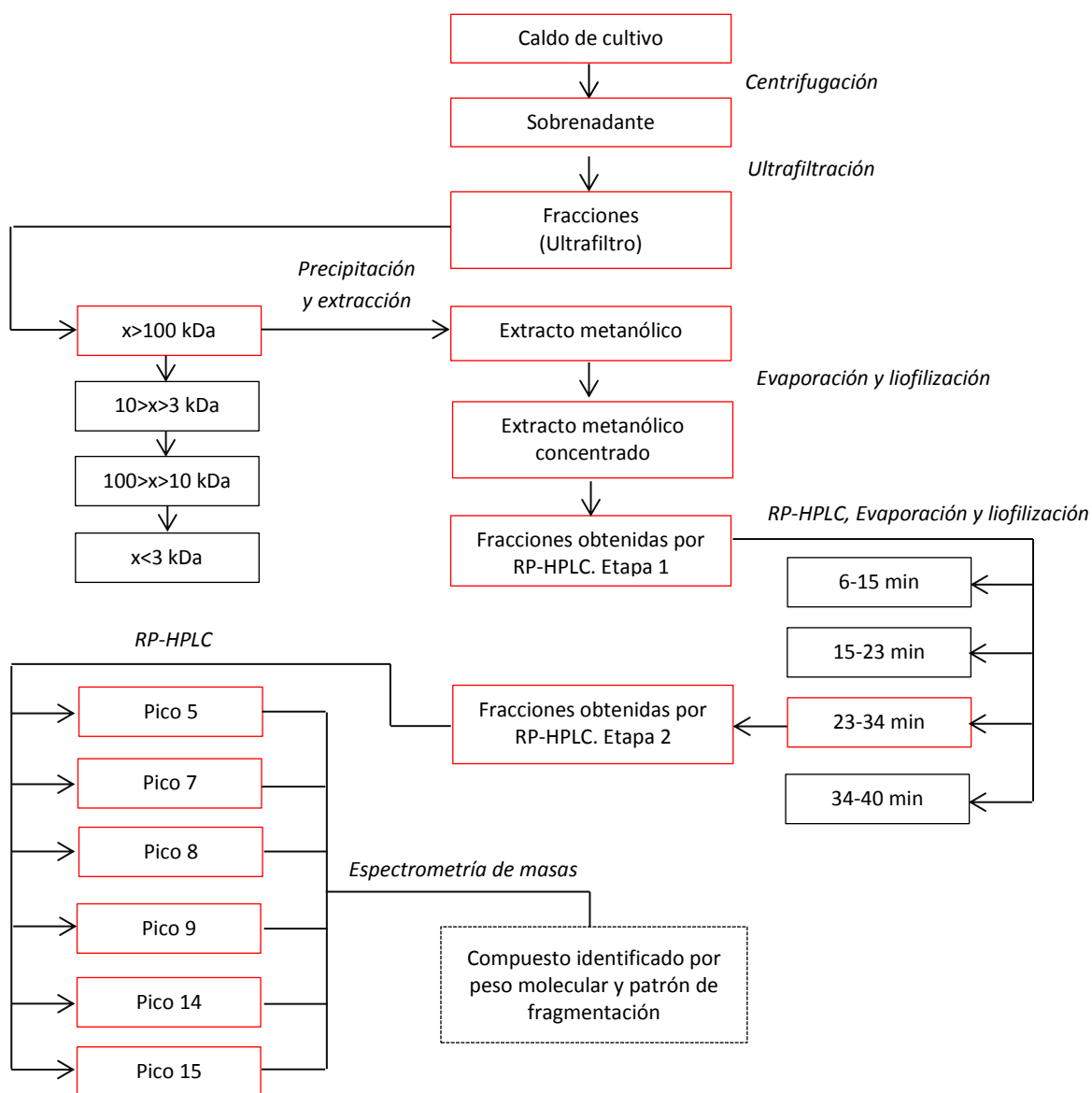


Figura 6. Diagrama de flujo para el aislamiento e identificación de los compuestos lipopeptídicos con actividad antifúngica de *Bacillus* sp. 83. Los recuadros rojos indican muestras que presentaron actividad antifúngica, tras una operación de separación. Las condiciones operacionales se indican en *Materiales y Métodos*.

Todos los bioensayos de inhibición del crecimiento radial realizados durante las etapas de purificación fueron en caja de Petri, donde se comparó el crecimiento radial de un explante de *C. gloeosporioides* sometido a diferentes tratamientos, con respecto a un control (de acuerdo a lo definido en Materiales y métodos, sección 5.0). El medio de cultivo libre de células de *Bacillus* sp. 83 (recolectado en fase estacionaria) presentó una alta actividad antifúngica contra *Colletotrichum gloeosporioides* (del 52.3 % de inhibición del crecimiento radial con respecto al control), ver figura 7. A partir de este medio, se obtuvieron cuatro fracciones mediante ultrafiltración, designadas como: $x > 100$ kDa, $100 > x > 10$ kDa, $10 > x > 3$ kDa y $x < 3$ kDa. Con la finalidad de realizar un análisis comparativo de la actividad, las fracciones fueron ajustadas en volumen con respecto al sobrenadante inicial del cual fueron generadas. Al realizar la prueba de inhibición de crecimiento radial se encontró que la actividad antifúngica del sobrenadante (52.3 %) permaneció únicamente en la fracción de $x > 100$ kDa (con 42.5 %). El porcentaje de inhibición de crecimiento radial de esta fracción, representa un 84 % de la obtenida con el sobrenadante. Se presentó actividad residual, menor al 3 %, en las fracciones restantes (figura 7), razón por la cual no fueron procesadas.

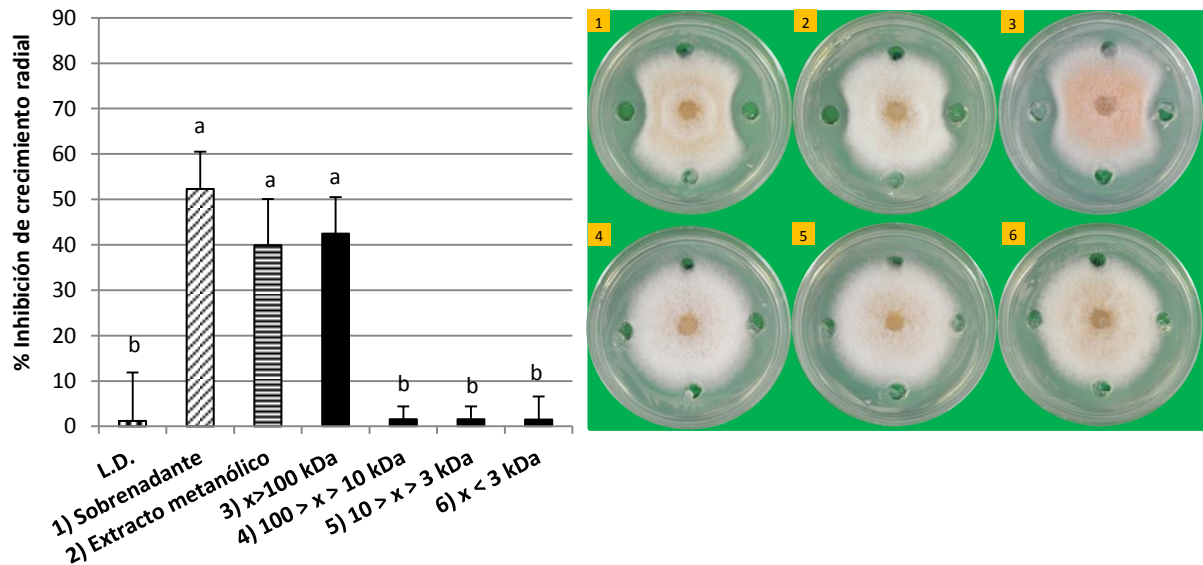


Figura 7. Porcentaje de inhibición para las fracciones obtenidas mediante ultrafiltración y precipitación ácida de sobrenadantes de *Bacillus* sp. 83. Literales distintas entre tratamientos indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a una prueba de Tukey ($p < 0.05$). L.D. Muestra el límite de detección de la técnica. Las fotografías de la derecha muestran las cajas de Petri a partir de las cuales se calculó la inhibición para los distintos tratamientos. Los distintos tratamientos y los controles fueron adicionados en los posos horizontales y verticales, respectivamente. A excepción de 2 (donde fue empleado MeOH) el control ("c") consistió en agua.

La retención de la actividad en la fracción $x > 100$ kDa no corresponde al peso molecular reportado para estos antibióticos lipopeptídicos (1.0-1.5 kDa). Esto se debió a que, en solución acuosa, forman agregados (vesículas y micelas), que pueden inclusive pueden los 100 kDa (Ishigami y col. 1995). Posteriormente, se procedió a una precipitación con HCl y extracción con metanol a partir de la fracción correspondiente a $x > 100$ kDa. Mediante este procedimiento se logró mantener una actividad antifúngica de 39.9 % de inhibición de crecimiento radial con respecto a un control sin antibiótico (ver

figura 7), lo que representa un 84.8 % de rendimiento con respecto al del sobrenadante. En el cuadro A1 (incluida en los anexos) se muestra la tabla general de rendimiento.

Más adelante, el extracto metanólico fue llevado a una operación de evaporación a vacío, con la finalidad de disminuir su volumen y facilitar su fraccionamiento mediante RP-HPLC. Su volumen fue reducido a 1/50 del volumen original en comparación al sobrenadante del cual fue generado. Al realizar un ensayo de inhibición radial de esta muestra concentrada se obtuvo un valor del 74.6 % de inhibición con respecto al control, el cual se muestra en la figura 8. Una vez concentrado el extracto metanólico, este fue fraccionado mediante RP-HPLC (Etapa 1). El cromatograma correspondiente a este fraccionamiento y los ensayos de actividad antifúngica *in vitro* de las fracciones generadas se muestran en las figuras 8, 9 y 10. Se recolectaron volúmenes de cuatro distintos tiempos de elución correspondientes a los intervalos 6-15 min, 15-23 min, 23-34 min y 34-40 min (Figura 9). Tras retirar el solvente mediante evaporación a vacío y liofilización, el material en polvo fue resuspendido en metanol para proceder a los ensayos de inhibición radial. Los volúmenes de las muestras fueron ajustados, para poder comparar su actividad con respecto al extracto metanólico (concentrado). Los resultados de estos ensayos de inhibición del crecimiento radial indican que la fracción correspondiente al intervalo de recolección de 23-34 minutos mantuvo la actividad antifúngica (81 % de inhibición radial) proveniente del extracto, lo que representa un 100 % de rendimiento con respecto al extracto metanólico concentrado (y un 53 % de rendimiento con respecto al sobrenadante inicial). La fracción de 34-40 min mantuvo una actividad residual (de 7.5 % de inhibición radial); sin embargo, al ser estadísticamente igual al error de la técnica ($p < 0.05$), esta muestra no fue procesada. Cabe destacar, que los compuestos presentes en la fracción de 23-34 min eluyeron de la columna cuando el porcentaje de acetonitrilo fue superior al 80 % v/v. Esto fue un indicativo de su alta hidrofobicidad, como se esperaba de los antibióticos lipopéptidos. La identificación preliminar realizada de manera cualitativa por PR-HPLC indicó que existen compuestos con tiempos de elución muy similares a estándares de iturina y surfactina en el caldo de cultivo de *Bacillus subtilis* 83 (recolectado en la fase estacionaria de cultivo, ver figura A1, incluida en los anexos).

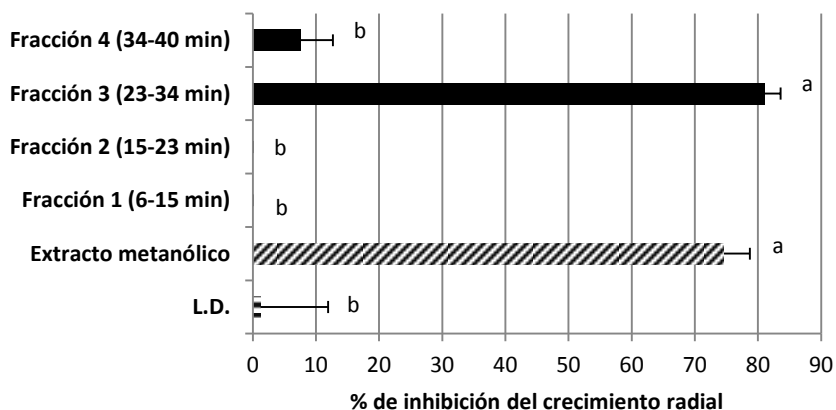


Figura 8. Porcentaje inhibición para las fracciones obtenidas por RP-HPLC. Etapa 1. Letras distintas entre tratamientos indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a una prueba de Tukey ($p < 0.05$). L.D. Muestra el límite de detección de la técnica.

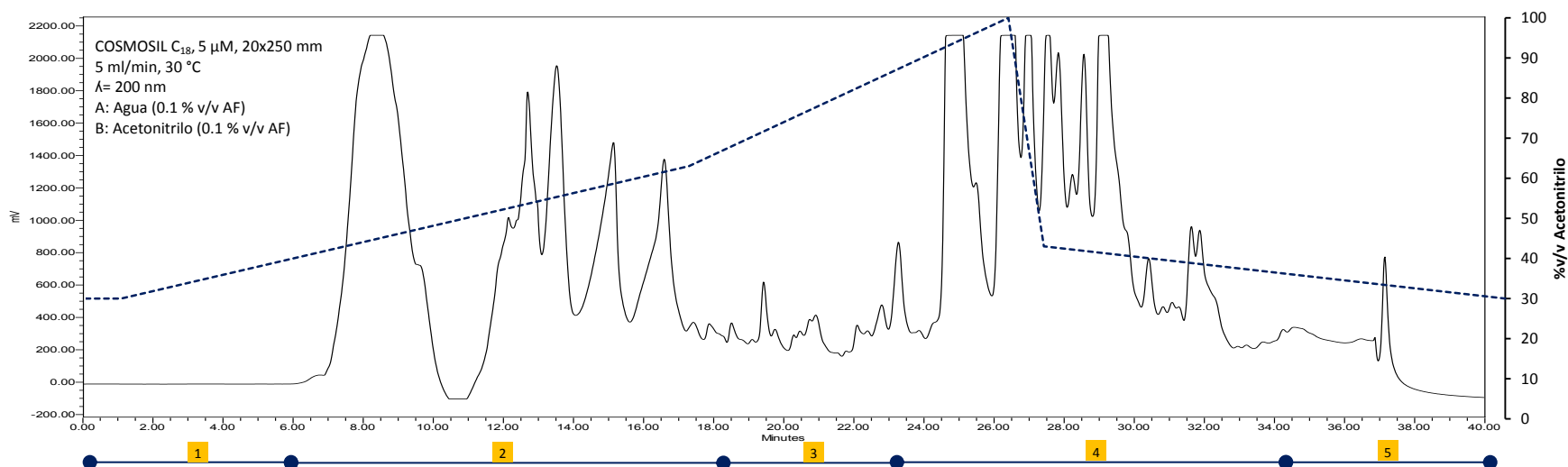


Figura 9. Cromatograma del extracto metanólico de lipopéptidos obtenidos mediante RP-HPLC. Etapa 1. Los números indican las fracciones a las cuales se les determinó su actividad antifúngica contra *C. gloeosporioides* 09. Los círculos azules muestran los rangos de tiempo que incluyen cada número.

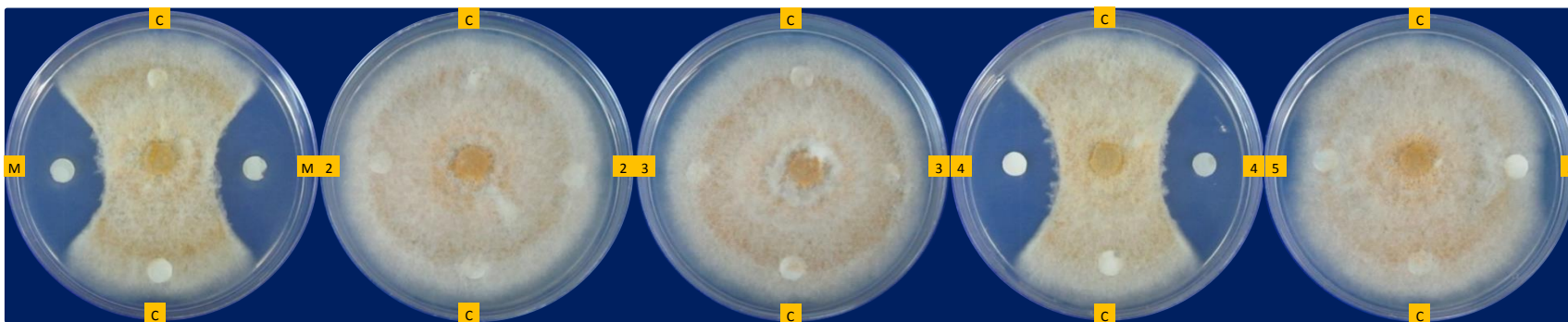


Figura 10. Ensayo de actividad antifúngica contra *C. gloeosporioides* 09 para las fracciones obtenidas por RP-HPLC. Etapa 1. Los números indican la fracción que fue depositada en los sensidiscos (con excepción de 1). “C” representa el control interno por caja donde fueron inoculados 100 μ L MeOH, “M” representa la mezcla total de las fracciones.

La fracción de 23-34 min fue fraccionada nuevamente, en una segunda etapa de RP-HPLC, con la finalidad de resolver los picos dentro de la misma. El uso de un nuevo gradiente no favoreció la resolución de los compuestos, por lo que se optó por un flujo isocrático (45 % v/v acetonitrilo). En esta corrida, se recolectaron quince picos. Las soluciones de los picos recolectados (generadas a partir de una solubilización en MeOH de las muestras liofilizadas) fueron ajustadas en volumen, para que los resultados de inhibición del crecimiento radial fueran comparables con respecto a la fracción de 23-34 min (Etapa 1). Los resultados de estos bioensayos de inhibición del crecimiento radial se indican en las figuras 11, 12 y 13. Los picos designados como 5, 7, 8, 9, 14 y 15, con tiempos de elución de 28.5, 37.1, 39.5, 43.5, 62.3 y 71 min, respectivamente, mostraron actividad antifúngica. Se obtuvieron valores promedio de 65, 26, 42, 50, 56 y 56 % de inhibición del crecimiento radial (con respecto al control), respectivamente; contra un 84.8 % obtenido a partir de la fracción de 23-34 min de la etapa 1 de RP-HPLC (Figura 11). Con excepción del pico 5, ningún pico alcanzó por sí mismo, el porcentaje de inhibición obtenido al emplear la fracción de 23-34 min. Suponiendo que la actividad antifúngica de este pico sea menor o igual con respecto a los otros picos, el pico 5 demostró ser de importancia para la antibiosis *in vitro*, debido a que es el más abundante en la mezcla (37 % del área total del cromatograma calculada a 200 nm). Los picos 8, 9 y 14 poseen un porcentaje de abundancia muy similar (7 %, 8%, 7 % y 7 %, respectivamente) en la mezcla; obteniendo mediante los mismos, porcentajes de inhibición estadísticamente iguales (42 %, 50 % y 56 %, respectivamente). Por otro lado, el pico 15, el cual posee en promedio 1.7 veces la abundancia de los picos 8, 9 y 14, obtuvo un valor de inhibición radial estadísticamente igual a éstos, lo que indicaría que el pico 15 fuese el menos activo entre estos cuatro picos. Hasta ese momento, inferimos que dentro de la mezcla, existían compuestos con diferente actividad antifúngica. Sin embargo, existía la posibilidad de que los distintos compuestos presentasen diferente difusividad dentro del agar (en los ensayos con cajas de Petri) lo que hubiera impedido discernir cuales son más activos. Por esta razón, se optó por realizar los ensayos para la determinación de sus MIC₁₀₀ en matraces agitados, donde se favorece la homogeneidad del antibiótico en todo el medio del cultivo gracias a la agitación. Como posteriormente discutiremos, existen diferencias en actividad entre los compuestos en la mezcla. Con respecto a los picos denotados como 1, 2, 3, 4, 6, 10, 11, 12 y 13, éstos presentaron una actividad residual menor al 4.7 %, por lo que no fueron procesados.

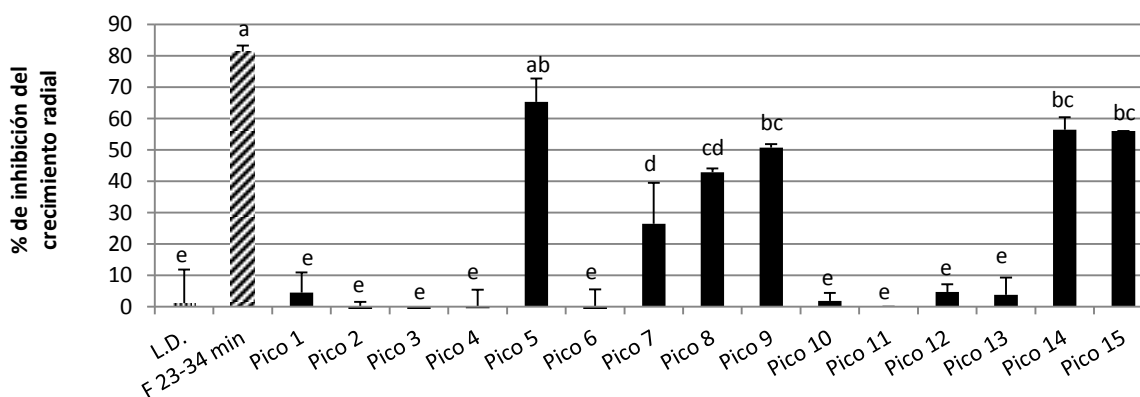
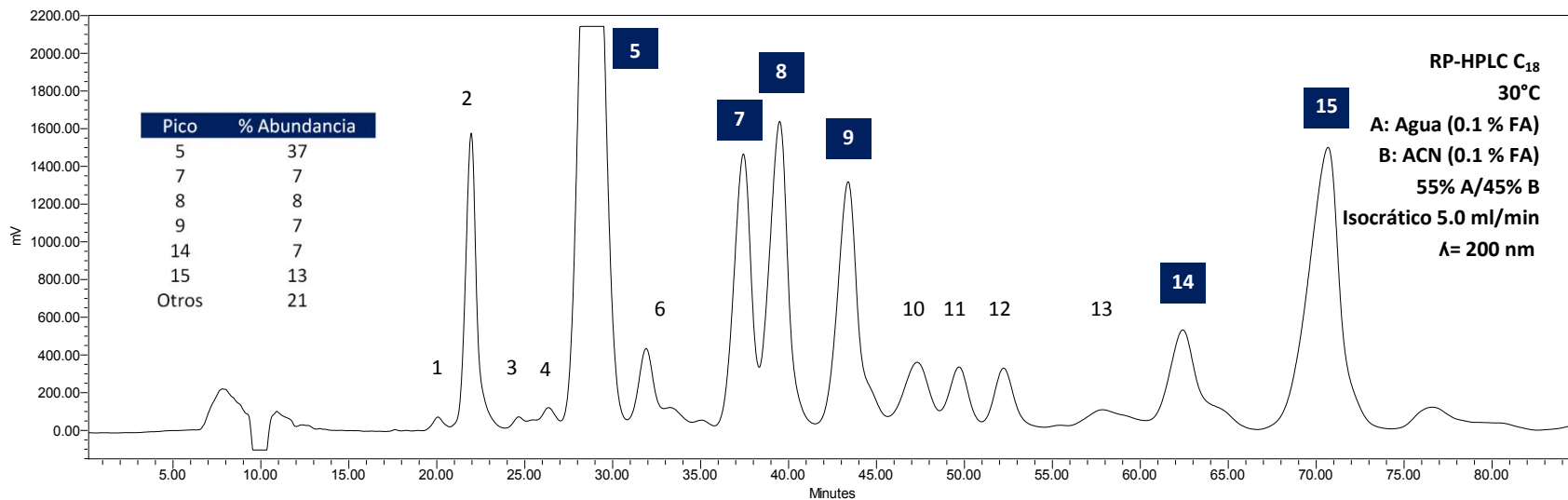


Figura 11. Porcentaje inhibición radial para las fracciones obtenidas por RP-HPLC. Etapa 2. Letras distintas entre tratamientos indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a una prueba de de Tukey ($p < 0.05$). L.D. Muestra el límite de detección de la técnica.



actividad antifúngica en ensayos *in vitro*. En la tabla se indica el porcentaje de abundancia (porcentaje del área total descrita por el cromatograma) del pico para cada uno de los picos que presentaron actividad antifúngica *in vitro*

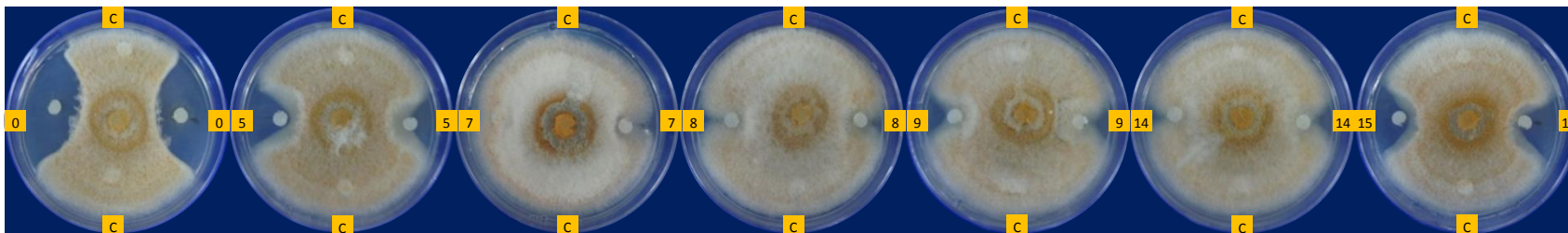


Figura 13. Efecto de los picos colectados mediante RP-HPLC (Etapa 2) sobre el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides*. Los números corresponden aquellos picos recolectados en el cromatograma de la figura 12, los cuales presentaron actividad antifúngica. Los sensibilizados indicados con "C" corresponden al control negativo (MeOH). La fotografía con número de sensibilizado 0 corresponde al control de la fracción de 23-34 min (el conjunto de todos los picos recolectados). Los picos no mostrados no presentaron actividad.

La figura 14 muestra los cromatogramas de un RP-HPLC analítico para cada uno de los picos resueltos (durante la Etapa 2 de RP-HPLC): 5, 7, 8, 9, 14 y 15. Se realizó un barrido de absorbancias, mediante el uso de un detector de arreglo de diodos Waters 2996 (no mostrado). Este análisis indicó que la longitud de onda a la cual poseen su máximo de absorbancia es alrededor de los 200 nm (no observándose otros máximos), por lo que fue empleada esta longitud de onda para realizar la determinación de su concentración para futuros ensayos.

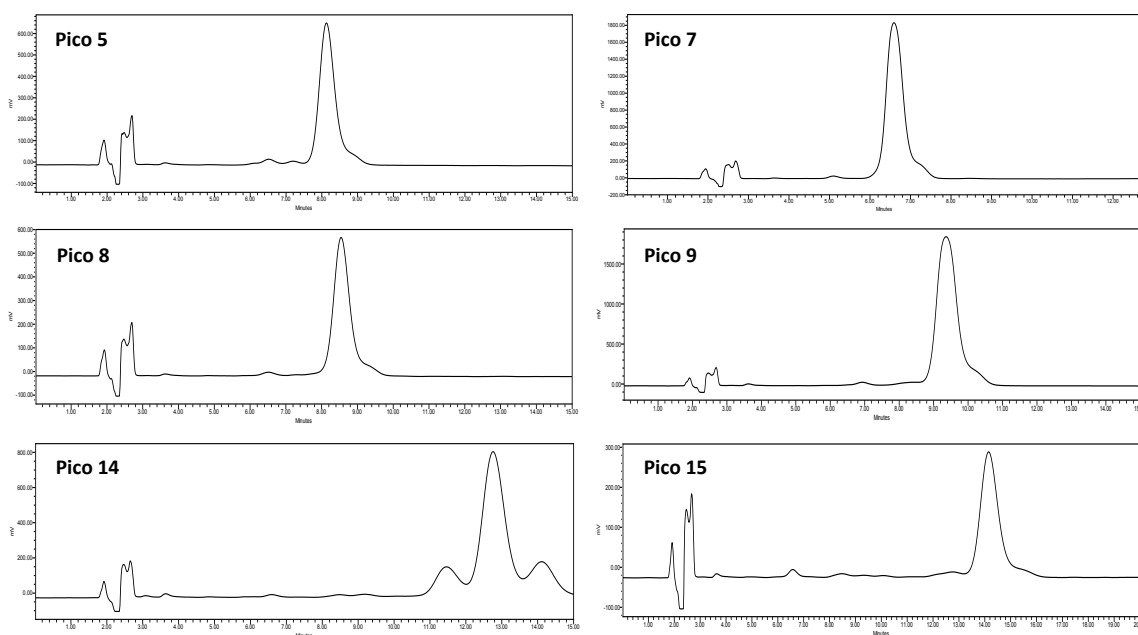


Figura 14. Cromatogramas de los picos purificados mediante RP-HPLC analítico. C₁₈ Fase móvil: A: Agua (0.1 % Ácido fórmico), B: Acetonitrilo (0.1 % Ácido fórmico); A: 55 %/B: 45 % Isocrático. 30 °C, λ = 200nm.

1.2 Determinación de la estructura de los compuestos aislados

Una vez que fueron aislados los compuestos con actividad antifúngica, se procedió a identificarlos mediante espectrometría de masas. Los espectros resultantes del ESI-MS para cada uno de los picos recolectados (aquellos con actividad antifúngica) permitió determinar su peso molecular (Figura 15). Los iones obtenidos para cada uno de los picos fueron: picos 5 (m/z = 1045.75 y 1067.75), 7 (m/z = 1059.679 y 1081.75), 8 (m/z = 1059.83 y 1081.83), 9 (m/z = 1059.75 y 1081.75), 14 (m/z = 1073.75) y 15 (m/z = 1073.75 y 1095.83); los cuales corresponden a sus formas $[H+M]^+$ y $[Na+M]^+$, respectivamente. De acuerdo a las secuencias reportadas en la literatura (Cuadro A2, incluido en los anexos), el peso molecular de estos compuestos corresponde a bacilomicina D, un lipopéptido de la familia de la iturina. Las diferencias encontradas en peso molecular (de 14 Da), se deben a la presencia de ácidos grasos con distintas longitudes de cadena asociados al péptido, en teoría C₁₅-C₁₇. Por esto, son considerados como homólogos de bacilomicina D. Estos homólogos pueden ser clasificados en tres distintos grupos isoméricos: 1044 (C₁₅), 1058 (C₁₆) y 1072 Da (C₁₇). De acuerdo a otros autores (eg. Cho y col. 2003) corresponderían a formas *n*-, *iso*-, o *anteiso*- de las cadenas de ácido graso del lipopéptido.

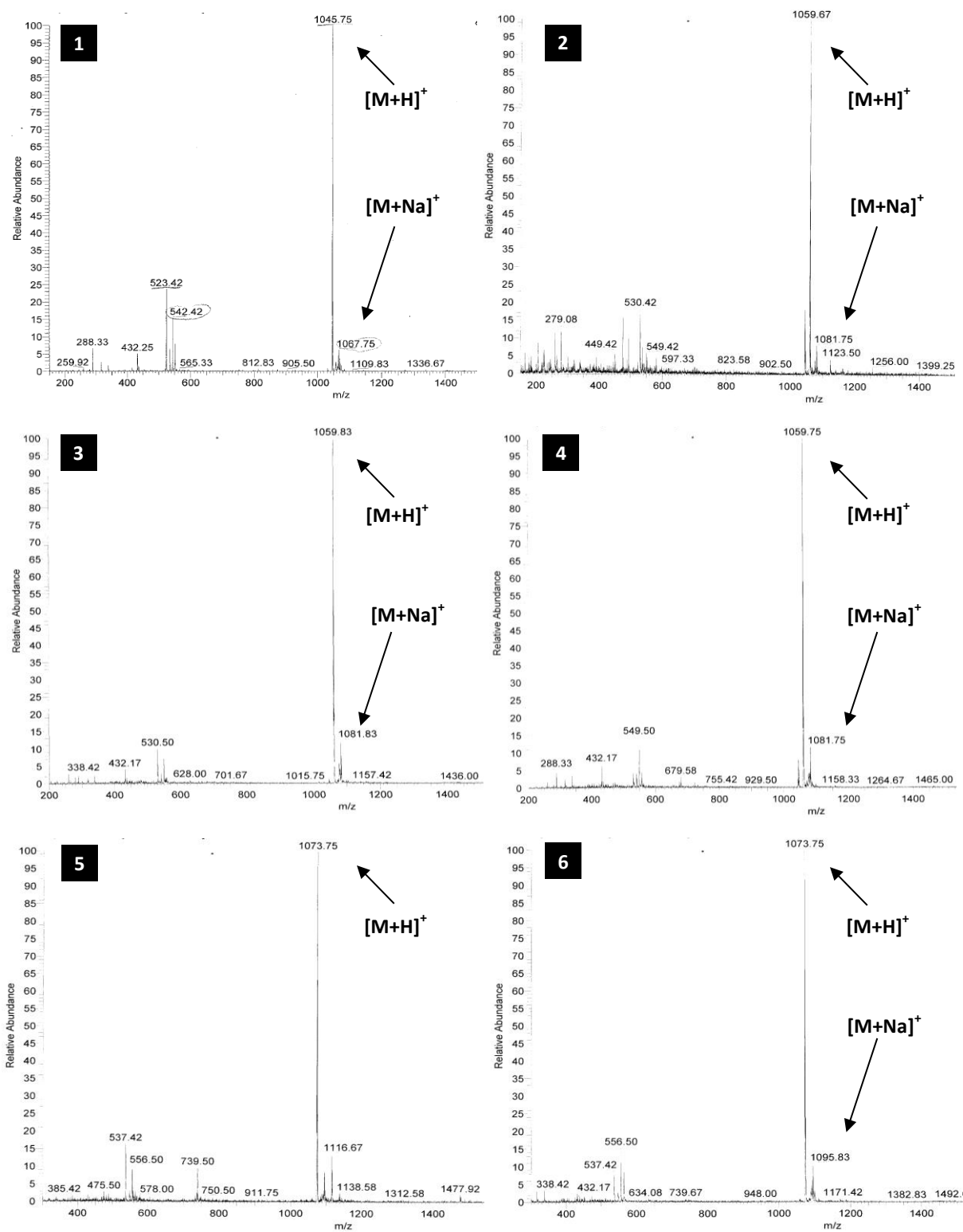


Figura 15. Espectros de masas correspondientes a los picos purificados por presentar actividad antifúngica. 1 (Pico 5, 1044 Da), 2 (Pico 7, 1058 Da), 3 (Pico 8, 1058 Da), 4 (Pico 9, 1058 Da), 5 (Pico 14, 1072 Da) y 6 (Pico 15, 1072 Da).

Para confirmar que los compuestos aislados poseen la secuencia peptídica característica de la bacilomicina D, se procedió a un análisis LC-ESI-MS/MS. Este análisis comprobó que los cambios de 14 Da entre homólogos, ocurren por la adición de un metilo (CH_2) en la estructura del ácido graso y no por modificaciones dentro de la secuencia peptídica. La figura 16 muestra el patrón de fragmentación obtenido por ESI-MS/MS de un ión precursor de $m/z = 1045$ Da (correspondiente al pico 5). Este patrón indica que el pico 5 corresponde a bacilomicina D con una longitud de cadena en su ácido graso de C_{14} , en discrepancia a lo esperado (C_{15}). Más adelante aclararemos la causa de esta discrepancia. El patrón indica que el lipopéptido sufrió una ruptura del enlace peptídico en Pro₄, lo cual generó un ión con la siguiente secuencia: Pro₄-Glu₅(CH_3)-Ser₆-Thr₇-(FA- β -NH₂)-Asn₁-Tyr₂-Asn₃. Esta es la secuencia característica de la bacilomicina D (Gong y col. 2014).

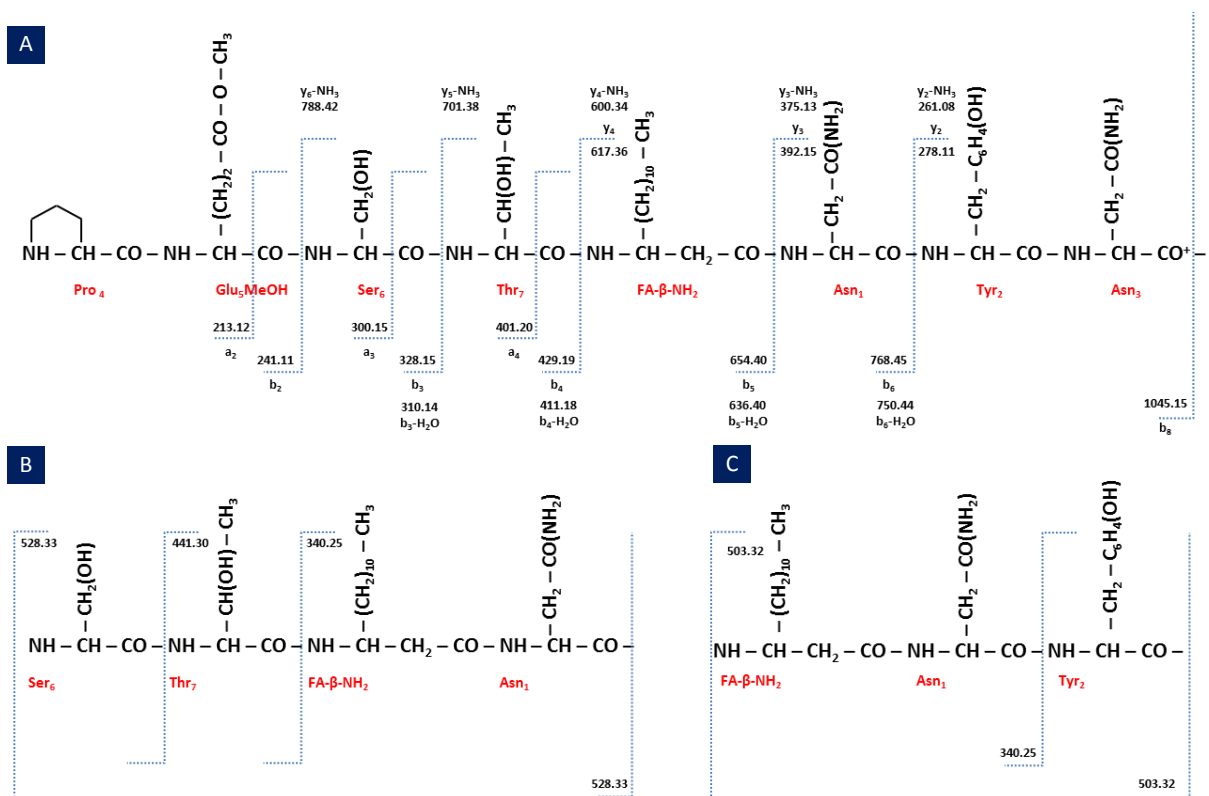


Figura 16. Patrón de fragmentación ESI-MS/MS obtenido para la bacilomicina D, a partir de un ión precursor de $[M+H]^+ = 1045$ Da (Pico 5). A. Secuencia lineal tras la ruptura en Pro₄. B. y C. representan secuencias parciales obtenidas por otras rupturas internas.

Por otro lado, se encontraron secuencias que corresponden a cortes internos dentro del péptido generando los iones con m/z de 528.33, 503.32, 441.30, y 340.25, entre otros (Figura 16). Los espectros del ESI-MS/MS de los picos 7, 8, 9, 14 y 15, se muestran en las figuras A3, A4, A5, A6 y A7 (incluidas en los anexos). Las secuencias peptídicas para estos otros picos correspondió de igual forma a bacilomicina D, pero con distintas longitudes de cadena en su ácido graso. Se llegó a esta conclusión debido a que los iones de naturaleza lipopeptídica encontrados entre distintos picos diferían en 14 Da de peso molecular y los iones de naturaleza peptídica no presentaban diferencias. Para ilustrar estas

sutiles diferencias en la longitud de la cadena de ácido graso, se muestra el cuadro 5, en donde se compara el patrón de fragmentación del pico 5 (1045 Da) con respecto al del pico 7 (1058 Da).

Iones de naturaleza lipopeptídica donde se cumple esta diferencia (en 14 Da) son los siguientes: FA-Asn, Thr-FA-Asn, FA-Asn-Tyr, Ser-Thr-FA-Asn, FA-Asn-Tyr-Asn, Pro-Glu(CH₃)-Ser-Thr-FA-Asn, Tyr-Asn-Pro-Glu(CH₃)-Ser-Thr-FA. Para ambos compuestos, los iones detectados en el ESI-MS/MS (derivados a partir de sus iones precursores) suelen presentar la pérdida o ganancia de grupos funcionales como +CO, +NH₃, +H₂O, -CO, -NH, y -H₂O. Estos cambios se explican por los mecanismos de fragmentación simples de moléculas ocurridas durante la espectrometría de masas (Yang y col. 2006). Por ejemplo, para ácidos aminados, el grupo NH₃ puede agregarse al C-terminal, incrementando su masa en 17 Da. Esto explica la presencia de iones tipo b-NH₃ dentro del espectro MS/MS de la bacilomicina D (figura 16).

Retomando la discusión acerca de la discrepancia de la longitud de la cadena, después de realizar el ensamble de la estructura a partir del patrón de fragmentación (Figura 16), observamos que en aquellos iones donde está presente el ácido glutámico (el quinto residuo), siempre existe un aumento de 14 Da con respecto al peso molecular teórico calculado. Por ejemplo, el ion b₂(Pro₄-Glu₅) que en teoría tendría un peso de 199 Da, dentro del patrón de fragmentación es de 213 Da. Dado que el análisis de MS/MS no es capaz de dilucidar cuál es la modificación exacta, se plantean diferentes posibilidades. La primera de ellas, es que el el ácido glutámico (el quinto residuo de la parte peptídica), tenga una metilación, derivada de las condiciones de extracción y precipitación, como ya ha sido reportado (Besson y Michel, 1987). Dado que la muestra proveniente del extracto metanólico fue sometida a una evaporación (a 60 °C) previo a ser liofilizada, es probable que haya ocurrido una reacción de esterificación entre el grupo carboxilo del ácido glutámico y el grupo hidroxilo del metanol, ya que existían las condiciones ácidas necesarias para que se llevará a cabo esta reacción (donde el HCl, empleado durante la precipitación ácida, fungiera como catalizador). La metilación del ácido glutámico en la bacilomicina D, corresponde a lo reportado en otros lipopéptidos aislados con operaciones de purificación similares (como la evaporación de las muestras a pH bajos en presencia de metanol), por ejemplo, la antiadhesina (Batrakov y col. 2003). Debido a que sólo se vio modificado Glu₅, puede dar indicios de que la conformación nativa del lipopéptido no expone los otros grupos hidroxilo hacia fuera de la estructura.

Otra posibilidad es que la sintasa de bacilomicina D de *Bacillus* sp. 83 reconozca además de un ácido glutámico, otro tipo de aminoácidos modificados, cuya cadena lateral corresponda a acilos de los ácidos carboxílicos tales como: ácido α -metil-propanoico, ácido β -metil-propanoico, ácido *n*-butanoico, entre otros isómeros estructurales. Este tipo de modificaciones se han observado en trabajos previos para otros lipopéptidos. Por ejemplo, Chen y col. (2010) reportan una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens*, capaz de sintetizar una fengicina en la que el residuo en la posición 6 es un ácido aminobutírico (donde normalmente está situado una Ala o Val).

Cuadro 5. Comparación del patrón de fragmentación ESI-MS/MS de los homólogos de bacilomicina D de 1044 Da (Pico 5) y 1058 Da (Pico 7).

Pico 5 (1044 Da) C ₁₄			Pico 7 (1058 Da) C ₁₅		
m/z	Iones Peptídicos	+/-	m/z	Iones Peptídicos	+/-
70	Pro	-CO	70	Pro	-CO
87	Asn	-CO			
116	Glu(CH ₃)	-CO	116	Glu(CH ₃)	-CO
136	Tyr	-CO	136	Tyr	-CO
213	Pro-Glu(CH ₃)	-CO	213	Pro-Glu(CH ₃)	-CO
241	Pro-Glu(CH ₃)		241	Pro-Glu(CH ₃)	
261	Tyr-Asn	-NH ₃			
278	Tyr-Asn		278	Tyr-Asn	
300	Pro-Glu(CH ₃)-Ser	-CO	300	Pro-Glu(CH ₃)-Ser	-CO
310	Pro-Glu(CH ₃)-Ser	-H ₂ O	310	Pro-Glu(CH ₃)-Ser	-H ₂ O
328	Pro-Glu(CH ₃)-Ser		328	Pro-Glu(CH ₃)-Ser	
375	Asn-Tyr-Asn	-NH ₃			
392	Asn-Tyr-Asn		392	Asn-Tyr-Asn	
411	Pro-Glu(CH ₃)-Ser-Thr	-H ₂ O	410	Pro-Glu(CH ₃)-Ser-Thr	-H ₂ O
429	Pro-Glu(CH ₃)-Ser-Thr				
849	Asn-Tyr-Asn-Pro-Glu-Ser-Thr	+CO			
m/z	Iones lipopeptídicos	+/-	m/z	Iones lipopeptídicos	+/-
184	FA	-NH ₃ -CO	198	FA	-NH ₃ -CO
340	FA-Asn		354	FA-Asn	
355	Thr-FA	+CO			
396	Ser-Thr-FA Ser-Thr-FA	-NH ₃ -H ₂ O			
441	Thr-FA-Asn		455	Thr-FA-Asn	
503	FA-Asn-Tyr		517	FA-Asn-Tyr	
528	Ser-Thr-FA-Asn				
555	Ser-Thr-FA-Asn	+CO	569	Ser-Thr-FA-Asn	+CO
617	FA-Asn-Tyr-Asn		631	FA-Asn-Tyr-Asn	
636	Pro-Glu(CH ₃)-Ser-Thr-FA	-H ₂ O			
654	Pro-Glu(CH ₃)-Ser-Thr-FA				
			669	Glu(CH ₃)-Ser-Thr-FA-Asn	-NH ₃
			746	FA-Asn-Tyr-Asn-Pro	+H ₂ O
718	Thr-FA-Asn-Tyr-Asn				
750	Pro-Glu(CH ₃)-Ser-Thr-FA-Asn	-H ₂ O			
768	Pro-Glu(CH₃)-Ser-Thr-FA-Asn		782	Pro-Glu(CH₃)-Ser-Thr-FA-Asn	
			854	FA-Asn-Tyr-Asn-Pro-Glu(CH ₃)	-NH ₃
902	Pro-Glu(CH ₃)-Ser-Thr-βFA-Asn-Tyr	-CO			
950	Tyr-Asn-Pro-Glu(CH₃)-Ser-Thr-FA Pro-Glu(CH₃)-Ser-Thr-FA-Asn-Tyr	+H ₂ O +H ₂ O	973	Tyr-Asn-Pro-Glu(CH₃)-Ser-Thr-FA Thr-FA-Asn-Tyr-Asn-Pro-Glu(CH₃)	+CO
1010	Asn-Tyr-Asn-Pro-Glu(CH ₃)-Ser-Thr-FA	-2H ₂ O	1043	Asn-Tyr-Asn-Pro-Glu(CH ₃)-Ser-Thr-FA	-NH ₃

Se sabe que pequeñas modificaciones en la posición o estructura en la secuencia peptídica en un lipopéptido puede ocasionar cambios conformacionales, los cuales repercuten en su actividad y especificidad. En el caso específico de metilaciones de algunos de los residuos, Liu y col. (2009b) reportan que surfactinas metiladas (en Glu1) en comparación a aquellas sin modificación, poseen una actividad biosurfactante mayor, pero disminuye su capacidad antitumoral contra una línea celular Hela. Para nuestro caso, resultaría interesante evaluar la actividad biológica de la forma no metilada de la bacilomicina D y compararla con su forma modificada, para concluir si esta metilación en Glu5, le confiere alguna ventaja o desventaja en su actividad biológica. En caso de que esta modificación repercutiese de manera positiva en su actividad, se abre la pauta para estudiar si la adición de otros grupos funcionales, específicamente en este residuo, resultan beneficiosos para su toxicidad o le confieren algún otro tipo de especificidad. En caso contrario, podría concluirse que este aminoácido no es importante para la función biológica del lipopéptido, que concordaría con el hecho de que en la posición 5 de las iturinas, siempre existe un aminoácido variable (ver cuadro A2, incluido en los anexos) al contrario de los primeros tres residuos (Asn-Tyr-Asn). Para finalizar, en la figura 17 se muestra una propuesta de la estructura del homólogo de bacilomicina D de 1044 Da (C_{14}) aislada, aunque es necesario corroborar la modificación en Glu₅ mediante técnicas como RMN.

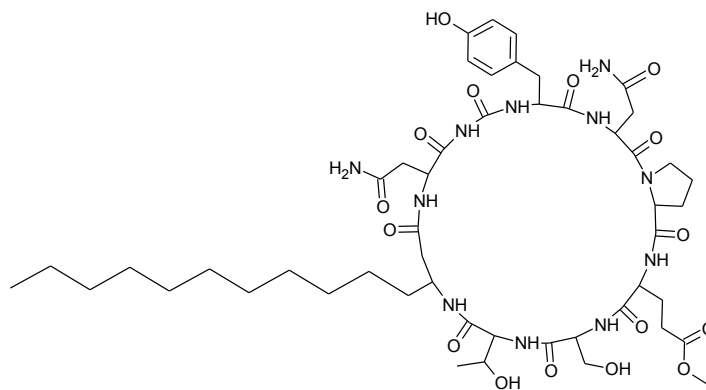


Figura 17. Estructura del homólogo de bacilomicina D de 1044 Da (C_{14}), sintetizada por *Bacillus* sp. 83.

1.3 Perfil de homólogos de bacilomicina D en caldos de cultivo de *Bacillus* sp. 83.

En la figura 18 se indica el porcentaje de abundancia para cada uno de los seis homólogos de bacilomicina D encontrados en caldos de cultivo de *Bacillus* sp. 83. Como anteriormente mencionamos, estos se clasificaron en tres grupos isoméricos, de acuerdo a su peso molecular: 1045, 1058 y 1072 Da, correspondientes a homólogos que cuentan con cadenas lipofílicas de 14, 15 y 16 carbonos, respectivamente (una deducción obtenida a partir del espectro ESI-MS/MS).

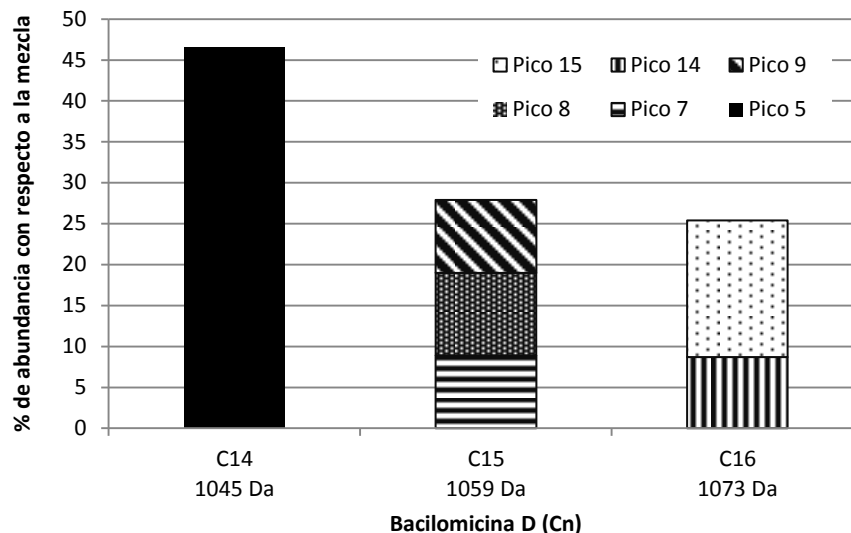


Figura 18. Distribución de los distintos homólogos de bacilomicina D en sobrenadantes de *Bacillus sp. 83*

El grupo con cadena lipofílica C_{14} es el más abundante con 46 % con respecto a la mezcla total, mientras que los homólogos con cadenas C_{15} y C_{16} contribuyen en un 28 % y 25 %, respectivamente. En el grupo C_{14} , se detectó solo un homólogo (Pico 5), el cual contribuye con el 46 % total del grupo; mientras que en los grupos de C_{15} y C_{16} , éstos poseen tres y dos homólogos, respectivamente (figura 18). En el caso del grupo con cadenas C_{15} , su 28 % de abundancia se distribuyó de manera equitativa en sus tres homólogos (8.9 %, 10.1 % y 8.9 %, correspondientes a los picos 7, 8 y 9, respectivamente). Para el grupo con cadena C_{15} , la relación de porcentaje de abundancia de un homólogo con respecto al otro es cercana a 1:2 (8.7 % y 16.7 %, para el pico 14 y 15, respectivamente).

Con anterioridad se discutió que el tiempo de elución (durante RP-HPLC) para cada uno de estos homólogos es distinto, inclusive si poseen el mismo peso molecular. Esto podría deberse a que los ácidos grasos presentes en su estructura, son isómeros estructurales. La distribución de los ácidos grasos y sus isómeros, reportada para *Bacillus subtilis* (en medio de cultivo conteniendo glucosa-extracto de levadura; Kaneda, 1977) no corresponde al encontrado en los homólogos de bacilomicina D de *Bacillus sp. 83* (obtenidos mediante el uso de un medio de cultivo mineral). Se esperaría que las cadenas C_{15} y C_{17} , fuesen las más abundantes de acuerdo a lo reportado (47 y 25 % del total de lípidos, respectivamente; Kadena, 1977) mientras que las cadenas C_{14} y C_{16} fuesen las menos abundantes (4 y 17 %, respectivamente; Kaneda, 1977). Sin embargo, no ocurrió de esta manera, ya que en la mezcla de bacilomicina D de *Bacillus sp. 83*, el homólogo con una longitud C_{14} (1045 Da) es el más abundante con 46 %, y en segundo lugar se encuentran los homólogos C_{15} y C_{16} con una abundancia similar de 28 y 25 %, respectivamente. Por otro lado, no se detectó al homólogo C_{17} , el cual de acuerdo al perfil de Kaneda (1977), tendría que ser el segundo más abundante.

Las diferencias en el perfil de ácidos grasos normalmente reportado para *Bacillus subtilis* (Kaneda, 1966, 1977) y el encontrado en los homólogos de bacilomicina D (de *Bacillus sp. 83*) puede deberse al uso de distintos medios de cultivo. Se sabe que el uso de medios de cultivo enriquecidos en

aminoácidos, en específico: leucina, isoleucina y valina; ocasionan un aumento en la abundancia de ácidos grasos metilados (por ejemplo, los *anteiso* C₁₅ y C₁₇) con respecto a los no metilados (*n*-C₁₄ y C₁₆; Kaneda, 1977). Asimismo, también existen otras posibilidades, como el hecho que existen variaciones en los perfiles de ácidos grasos de acuerdo a la cepa en estudio, tal como sucede en *B. cereus* quien sintetiza los ácidos *anteiso*-C₁₃, *iso*-C₁₂, *iso*-C₁₃ y un *n*-C₁₆ monoenoico, en adición a las demás especies (Kaneda, 1966, 1977). Por otro lado, no se conoce si la sintasa de bacilomicina (u otros lipopéptidos) une ácidos grasos con cierta longitud de cadena de manera preferente ocasionando, esta discrepancia entre las longitudes de ácidos grasos encontradas en los lipopéptidos y aquellas normalmente encontradas en membrana. Con respecto a esta interrogante, al comparar la distribución de longitudes de cadena de ácido graso de los distintos homólogos de bacilomicina D (C₁₄: C₁₅: C₁₆ = 46 %: 28 %: 25 %) en *Bacillus* sp. 83, con respecto a los reportados en otros lipopéptidos (de otras cepas) existen notables diferencias. Por ejemplo, en comparación a la abundancia de los homólogos de surfactina (C₁₃: C₁₄: C₁₅ = 22 %: 16 %: 61 %) sintetizados por *Bacillus licheniformis* (Pecci y col. 2010), los homólogos de bacilomicina D (sintetizados por *Bacillus* sp. 83) no presentan el homólogo C₁₃; y la abundancia de homólogos C₁₄ y C₁₅ son alrededor del doble con respecto a los de surfactina. Asimismo, el homólogo C₁₆ no está presente en los homólogos de surfactina. Con respecto a la distribución de longitudes de cadena de ácido graso de los homólogos de fengicina A y B de (C₁₄:C₁₅:C₁₆:C₁₇ = 1.6 %: 7.8 %: 10.5 %: 80.2 %), los homólogos de bacilomicina D de *Bacillus* sp. 83 no presentan la cadena C₁₇ (la cual es la de mayor abundancia en la fengicina, Pecci y col. 2010). Es importante mencionar que los solventes utilizados para recuperar los lipopéptidos pueden ser distintos de acuerdo al reporte. Por esta razón, existe la posibilidad de que al emplear un solvente diferente para la extracción o en su caso una mezcla (por ejemplo, cloroformo: metanol, acetonitrilo: metanol), el perfil encontrado de bacilomicina D pueda cambiar; favoreciéndose la abundancia de ciertos homólogos o mejorando los rendimientos de extracción.

2.0 Determinación de la concentración mínima inhibitoria 100 de bacilomicina D de *Bacillus* sp. 83

2.1 MIC₁₀₀ bacilomicina D para espora

A partir ensayos de inhibición en cultivos sumergidos fue posible la determinación de la concentración mínima inhibitoria 100 para esporas de los homólogos de bacilomicina D. La figura 19 muestra los resultados de estos ensayos. Cada gráfico indica el porcentaje de crecimiento micelial (en biomasa seca) con respecto a un control negativo, en función de la concentración de bacilomicina D, cuando el momento del contacto entre el hongo (esporas) e inhibidor ocurrió a las 0 h.

Al comparar la biomasa seca entre el control absoluto y el control negativo (al que se adicionó solvente) no existió una diferencia estadística significativa, por lo que se descarta un efecto del metanol sobre el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* 09 (ver figura A11, incluida en los anexos).

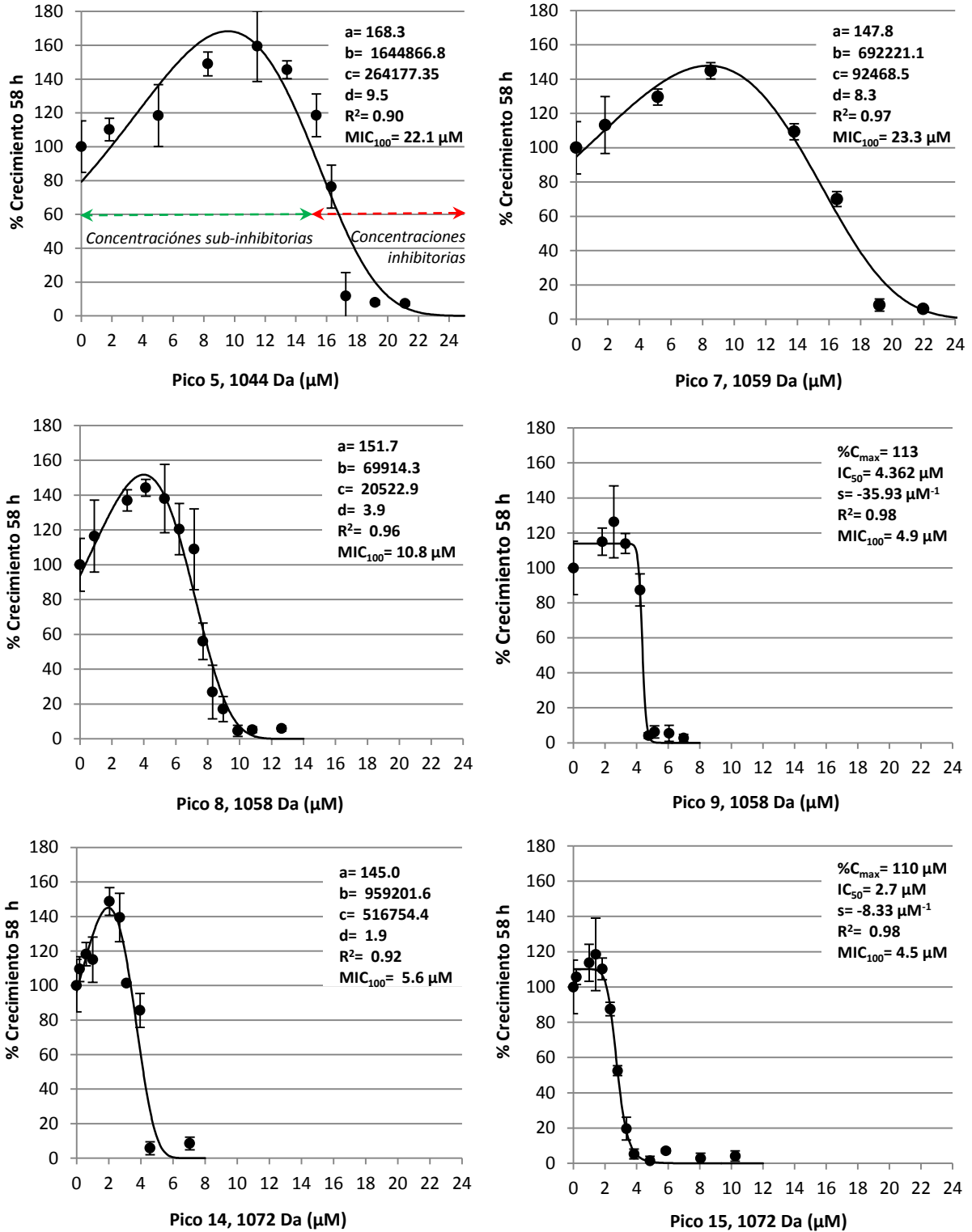


Figura 19. Porcentaje de crecimiento micelar de *Colletotrichum gloeosporioides* 09 (a las 58 h) con respecto a un control, en función de la concentración de homólogos de bacilomicina D C_{14-16} cuando el momento del contacto entre el hongo (esporas) e inhibidor ocurrió a las 0 h de cultivo.

Aclarado lo anterior, se procedió a realizar un ajuste de los valores del porcentaje de crecimiento de biomasa con respecto al control negativo a dos modelos matemáticos: Weibull y logístico, con la finalidad de determinar su $MIC_{100-Esporas}$. La decisión de ajustar los datos obtenidos para uno u otro modelo, dependió de la tendencia que indicó el análisis estadístico entre medias (para cada concentración de bacilomicina D) con respecto al control (ver figura A11, incluida en los anexos). Para los seis casos, el coeficiente de determinación, R^2 , fue mayor a 0.9, por lo que se consideraron adecuados para predecir sus $MIC_{100-Espora}$. A partir del ajuste de los datos, fue posible observar dos fenómenos: la toxicidad entre homólogos de bacilomicina D es distinta, y la biomasa del hongo en función de la concentración de bacilomicina D, describe un comportamiento de campana (a excepción del pico 15 y 9).

Con respecto a su toxicidad, los homólogos de bacilomicina D pueden ser clasificados en tres grupos: alta, media y baja. Los de alta toxicidad son: pico 15 (C_{16} , 1072 Da) con una $MIC_{100-Espora} = 4.5 \mu M$, pico 9 (C_{15} , 1058 Da) con una $MIC_{100-Espora} = 4.9 \mu M$ y el pico 14 (C_{16} , 1072 Da) con $MIC_{100-Espora} = 5.6 \mu M$. Los de baja toxicidad corresponden a los picos 5 (C_{14} , 1044 Da) y 7 (C_{15} , 1072 Da) con una $MIC_{100-Espora} = 22 \mu M$ y $23.3 \mu M$, respectivamente. Por último, con una toxicidad intermedia, se encuentra el pico 8 (C_{15} , 1058 Da) con una $MIC_{100-Espora} = 10.8 \mu M$ (Figura 19). La explicación de estas diferencias en toxicidad será abordada en la sección 4.0 (*“Efecto de la longitud de la cadena de ácido graso sobre la actividad antifúngica de los homólogos de bacilomicina D”*), de resultados y discusión (pág. 49).

Tal como se mencionó anteriormente, la biomasa del hongo, en función de la concentración de bacilomicina D, describe un comportamiento de campana (Figura 19). En la gráfica de inhibición podemos observar dos rangos de concentración: una sub-inhibitoria, en la que el crecimiento del hongo no se ve afectado (e inclusive puede aumentar con respecto al control) y otra inhibitoria. Dentro del rango de concentraciones sub-inhedorias existe una concentración óptima de bacilomicina D a la cual se obtiene un máximo de biomasa. Los parámetros “ a ” y “ d ” (que corresponden a un porcentaje de crecimiento en μM) del modelo Weibull predicen este máximo. Para los homólogos, C_{14} (Pico 5, 1044 Da), C_{15} (Pico 7, 1058 Da), C_{15} (Pico 8, 1058 Da) y C_{16} (Pico 14, 1072 Da); “ d ” tuvo un valor de: $9.5 \mu M$, $8.3 \mu M$, $3.9 \mu M$ y $1.9 \mu M$. A las concentraciones óptimas determinadas para los picos 5, 7, 8 y 14, el crecimiento de *Coletotrichum gloeosporioides* 09 puede incrementar entre un 40 y un 68 % con respecto al control. Este trabajo es el primer reporte sobre este tipo de efecto estimulante del crecimiento, para este tipo de antibióticos. Esto pone en evidencia que compuestos con propiedades tensoactivas como los lipopéptidos, son herramientas útiles que facilita la adquisición de nutrientes para el microorganismo que los sintetiza (en este caso, *Bacillus*), así como a otros (como *Colletotrichum* a concentraciones sub-inhedorias).

Sin embargo, para los picos 9 y 15, al no encontrarse diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones subletales con respecto al control, se concluyó que no existe una concentración óptima para el crecimiento del hongo (donde se favorezca su crecimiento). Por esta razón, para estos dos picos (9 y 15), se empleó un modelo de tipo logístico, el cual no predice un máximo. Cabe aclarar que entre los seis homólogos, éstos dos picos resultaron ser los más tóxicos para las esporas. A pesar

de ello, una fotografía del conjunto de *pellets* de *C. gloeosporioides* obtenidos tras 58 h de crecimiento en matraces, muestra que existe un mayor número de “*pellets*” en aquellos tratamientos donde se adicionó bacilomicina D a concentraciones sub-letales (iguales o cercanas a las necesarias para obtener un máximo de biomasa) en comparación a los *pellets* obtenidos en los controles (Figura 20).

Es probable que a concentraciones sub-inhedoras, las propiedades biosurfactantes del lipopéptido eviten la formación de agregados de esporas (ver figura A10, incluida en el anexo) y mejore la transferencia de nutrientes hacia el hongo, ya que existen un mayor número de núcleos (de “*pellets*”) en formación al inicio del cultivo con respecto al tratamiento control. Esto concuerda con lo reportado por Batrakov y col. (2003), quienes mencionan que es posible prevenir la adhesión de células mediante el uso de lipopéptidos como la surfactina.

En este trabajo no se llevarón a cabo estudios para caracterizar la capacidad surfactante de la bacilomicina D aislada. Sin embargo, resulta interesante el estudio de las propiedades surfactantes de los lipopéptidos, ya que si estos son capaces de solubilizar el mucílago de esporas de hongos fitopatógenos a las concentraciones presentes en las plantas, estas esporas perderían la capacidad de adherirse al tejido de su hospedero, dejándolas expuestas a otros factores ambientales. De comprobar esta hipótesis, se estaría reportando un novedoso mecanismo de acción de control biológico indirecto por parte de los lipopéptidos de *Bacillus* spp. En este contexto, Sela-Buurlage y col (1991) muestran que algunos surfactantes (como el Triton-100 y el SDS) son capaces (aún a bajas concentraciones) de reducir el porcentaje de adhesión de esporas a superficies sólidas, sin repercutir en su viabilidad, tal como pudo haber ocurrido a concentraciones sub-letales de bacilomicina D.

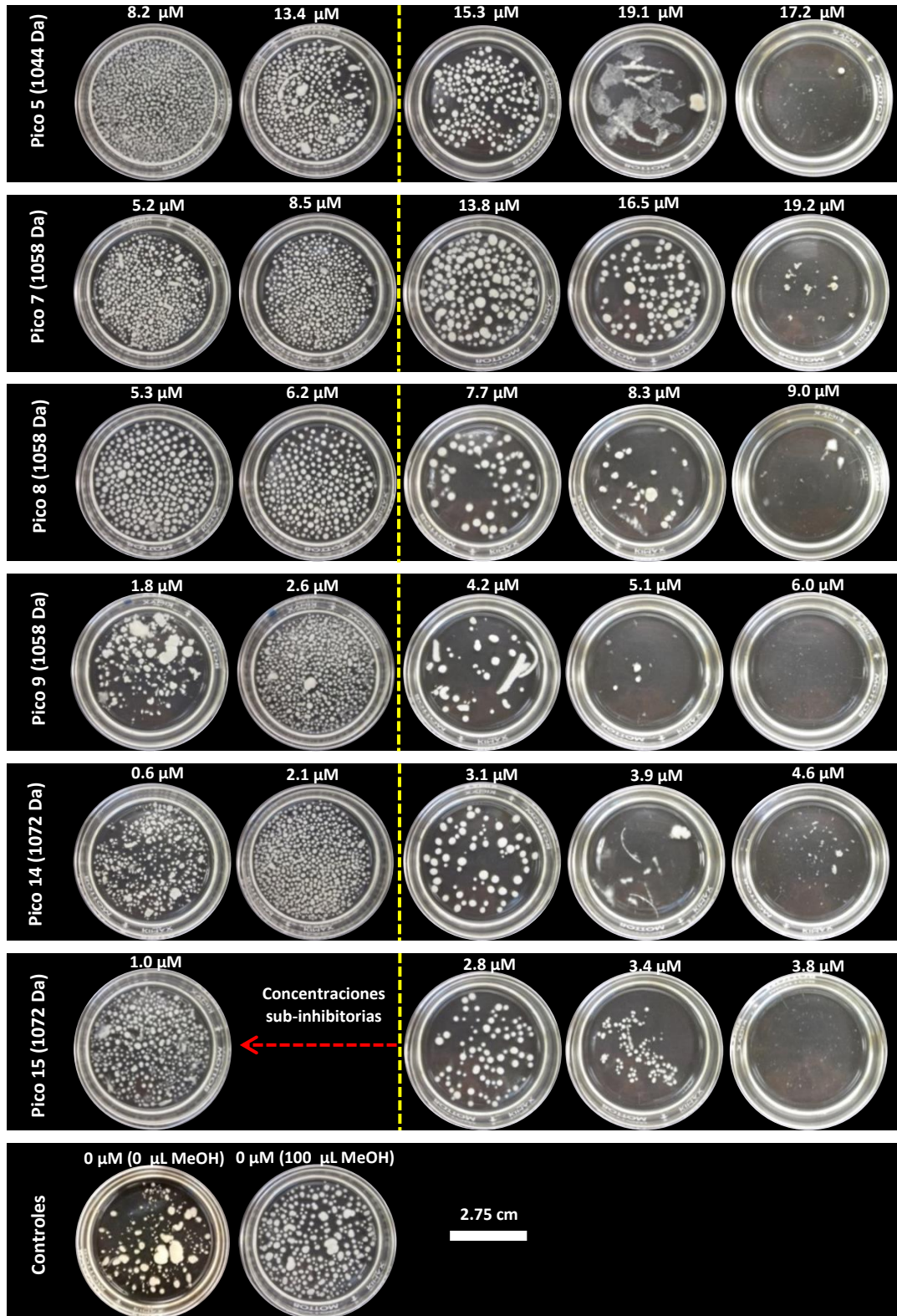


Figura 20. Conjunto de *pellets* de *Colletotrichum gloeosporioides* 09 (58 h) en función de la concentración de bacilomicina D cuando el momento del contacto entre el hongo (esporas) y el inhibidor ocurrió a las 0 h de cultivo. Los *pellets* corresponden a las 58 h de cultivo. Fotografías a la izquierda de la línea amarilla indican *pellets* obtenidos a concentraciones sub-letales del inhibidor de acuerdo a la MIC_{100-Espora} determinada.

2.2 MIC₁₀₀ bacilomicina D para micelio

Al igual que ocurrió con las esporas, el crecimiento del micelio también puede ser detenido por la adición del lipopéptido. Sin embargo, al contrario de las esporas, donde existen claras diferencias en toxicidad entre los distintos homólogos, las MIC_{100-Micelio} son muy similares (con excepción del pico 15, el cual fue el más tóxico para el micelio). Las MIC_{100-Micelio} de los homólogos son: C₁₄ (Pico 5, 1044 Da), C₁₅ (Pico 7, 1058 Da), C₁₅ (Pico 8, 1058 Da), C₁₅ (Pico 9, 1058 Da), C₁₆ (Pico 14, 1072 Da) y C₁₆ (Pico 15, 1072 Da) son: 25.4 μM, 26.9 μM, 17.1 μM, 22.6 μM, 23.8 μM y 8.8 μM, respectivamente (Figura 21).

A diferencia de lo que ocurrió en los ensayos para determinar la MIC₁₀₀ para esporas, en el caso del micelio no se favoreció el crecimiento del hongo bajo ninguna concentración. Se debe mencionar que en los ensayos para la determinación de la MIC₁₀₀ contra micelio, el contacto entre el antibiótico y el hongo ocurrió una vez que el inóculo de esporas germinó y generó micelio (12 h). Esto significa que el número y morfología de los *pellets* (a las 12 h) son los mismos tanto para los cultivos control como para los distintos tratamientos. Dado que este comportamiento sucedió para los seis homólogos, sugerimos que una vez que las esporas se han aglutinado y formado los núcleos de los *pellets*, ya no es posible disgregarlos mediante el uso de bacilomicina D.

Aparentemente, las MIC₁₀₀ de esporas y de micelio son muy similares; sin embargo, tomando en consideración que la biomasa de las esporas y la del micelio no es la misma al inicio del experimento, al calcular las MIC₁₀₀s específicas se ven claras diferencias. Estas diferencias serán abordadas en el siguiente apartado de resultados y discusión (4.0 “Efecto de la longitud de la cadena de ácido graso sobre la actividad antifúngica de los homólogos de bacilomicina D”).

Con respecto a lo anterior, bajo condiciones *in vitro*, donde se pretende infectar plantas con alguna especie *Colletotrichum* sp., normalmente son requeridos inóculos de 10⁵ y 10⁶ conidias*ml⁻¹ para que ocurra una infección por parte del patógeno (Mercure y col. 1994; Venegas-Brito, 2015). Este intervalo de concentraciones de inóculos, es similar al empleado durante los ensayos *in vitro* (2x10⁵ conidiasml⁻¹) de este trabajo, al momento de determinar la MIC₁₀₀ de bacilomicina D tanto para esporas como para micelio.

Para futuros ensayos *in planta*, podría partirse de estos datos para determinar la concentración efectiva de bacilomicina D en plantas de mango. Mediante estos ensayos, podría comprobarse si puede facilitarse el crecimiento del patógeno cuando son adicionadas concentraciones de bacilomicina D, menores a las inhibitorias. Ya que de ser así, aquellas formulaciones para el control biológico que pueden hacerse en base a estos lipopéptidos, deberán estar bajo un estricto control de calidad y muy claros instructivos de empleo, para evitar efectos no deseados.

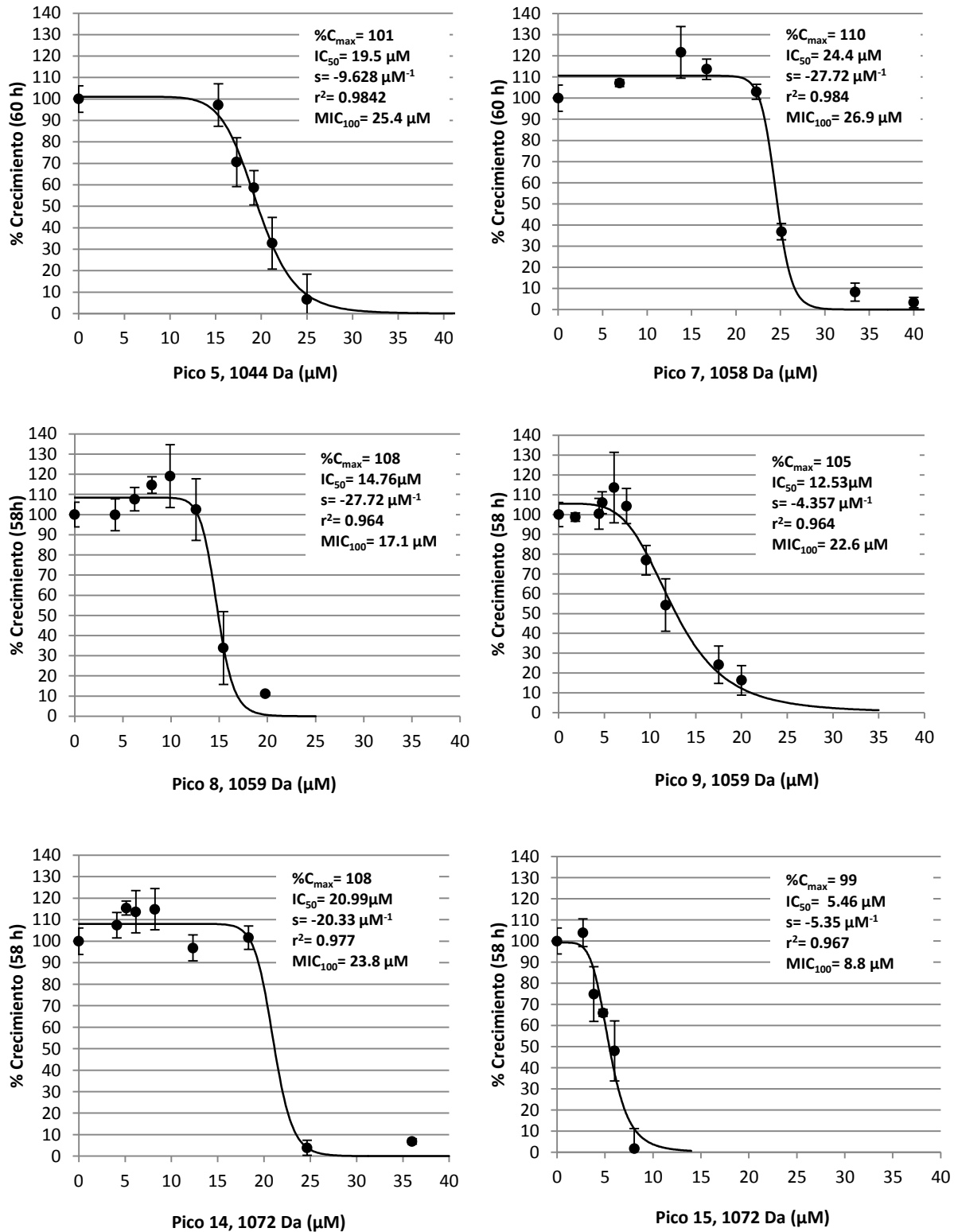


Figura 21. Porcentaje de crecimiento micelar de *Colletotrichum gloeosporioides* 09 (58 h) con respecto a un control, en función de la concentración de homólogos de bacilomicina D C_{14-16} cuando el momento del contacto entre el hongo (micelio) e inhibidor ocurrió a las 12 h.

4.0 Efecto de la longitud de la cadena de ácido graso sobre la actividad antifúngica de los homólogos de bacilomicina D

La mayoría de los reportes de la literatura hacen uso de las mezclas de lipopéptidos para calcular la concentración mínima inhibitoria 100 contra algún patógeno (por ejemplo, Romero y col. 2007). Sin embargo, de acuerdo a nuestros resultados, surgió la siguiente hipótesis: “La toxicidad de la bacilomicina D contra esporas, correlaciona de manera positiva con la longitud de la cadena lipofílica del antibiótico”, tal y como a continuación describiremos.

En la figura 22 se muestra a manera de resumen, las distintas concentraciones mínimas inhibitorias de bacilomicina D, calculadas para inhibir el crecimiento de esporas y micelio de *Colletotrichum gloeosporioides* 09. Como antes mencionamos, los homólogos de bacilomicina D se distribuyeron en tres distintos grupos de isómeros: de 1044 Da, 1058 Da y 1072 Da.

Con respecto a la MIC_{100-Esporas} para el único homólogo de 1044 Da, la dosis resultó de 22 µM, la cual es estadísticamente igual a la de su homólogo de 1058 Da (Pico 7) con 23 µM. Sin embargo, este último, posee una MIC_{100-Espora} 2.0 y 4.6 veces mayor con respecto a picos como el 8 y pico 9 (con MIC_{100-Espora} de 11 y 5 µM, respectivamente) que comparten el mismo peso molecular. Estas diferencias de actividad pueden deberse quizás a que estos tres aislados, cuentan con isómeros estructurales en su cadena lipofílica, donde P5 podría poseer al ácido metil-tridecílico (o tridecanoico) o al ácido mirístico (ó tetradecanoico); mientras que P7, al ácido *n*-pentadecanoico ó el ácido *iso o anteisometil*-mirístico en su parte lipofílica. En caso de que P5 corresponda al *n*-mirístico y P7 al *iso o anteisometil*-mirístico, se explicaría su similitud en actividad.

Por otro lado, P8 y P9 pueden representar homólogos con tres ácidos posibles: al ácido *n*-pentadecanoico ó el ácido *iso o anteiso* metil-mirístico. Sin embargo, dado que poseen una mayor actividad con respecto a su isómero P7, lo más probable es que P8 y P9 tengan al ácido *iso o anteisometil*-mirístico y al ácido *n*-pentadecanoico, respectivamente. Es posible que la posición de la metilación en *iso o anteiso* en el ácido mirístico ocasione la diferencia entre P7 y P8 (donde P9, con mayor actividad con respecto a estos dos, posea al ácido *n*-pentadecanoico). Asimismo, los homólogos de 1072 Da, representados por los picos 14 y 15, poseen una MIC₁₀₀ para espóra estadísticamente iguales, lo que probablemente signifique que los ácidos grasos correspondientes para ambos sean al ácido *n*-palmítico y al ácido metil-pentadecanoico.

Recordemos que el pico designado como 14, es en realidad una mezcla de al menos tres compuestos (de acuerdo a los cromatogramas del material purificado, ver figura 14). En este pico, el análisis mediante ESI-MS no mostró compuestos con diferentes pesos moleculares, por lo que es probable puedan encontrarse aquí varios isómeros estructurales del ácido graso C₁₆ (*n*-, *iso*-, *anteiso*- u otros) que presenten sinergia o al menos aditividad en su actividad.

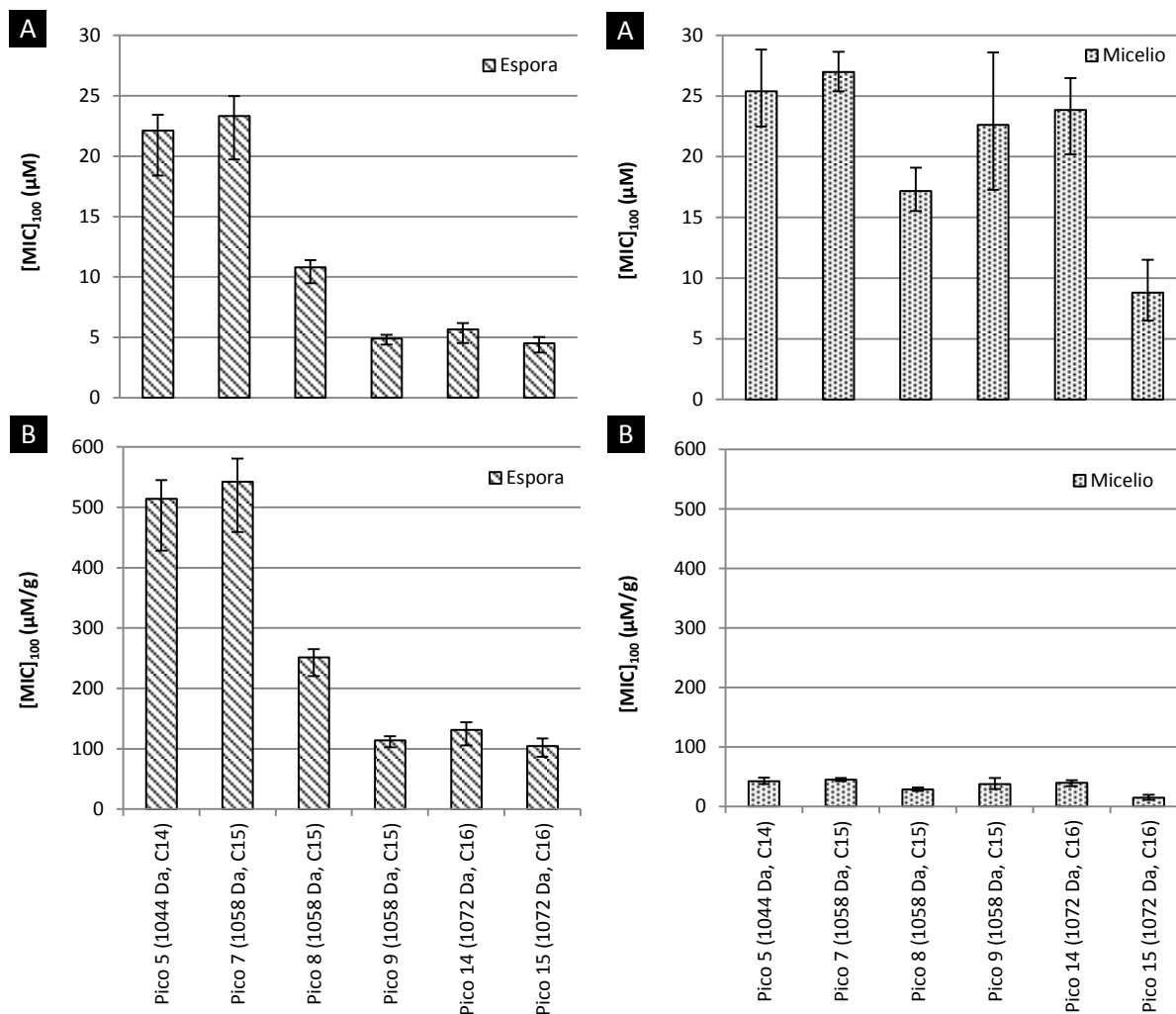


Figura 22. Concentraciones mínimas inhibitorias 100 (para espora y micelio) de los distintos homólogos de bacilomicina D C_{14-16} de *Bacillus* sp. 83 contra *Colletotrichum gloeosporioides* 09. Barras de error indican el intervalo de confianza ($p < 0.05$). A. MIC volumétricas; B. MIC específica.

En el caso de las MIC calculadas para micelio, la toxicidad de los homólogos es muy similar, y tal parece que no existe una correlación clara entre la actividad del homólogo y la longitud del ácido graso. Las $MIC_{100-Micelio}$ calculadas para los picos 5, 7, 8, 9, 14 y 15 fueron en promedio: 25, 27, 17, 23, 24 y 9 μM , respectivamente. De acuerdo a nuestros análisis, los picos 5, 7, 9 y 14 no poseen diferencias significativas en actividad contra micelio, siendo en promedio 2.75 menos activas con respecto a al pico 15, el cual resultó con una $MIC_{100-Micelio} = 9 \mu M$. Por otro lado, el pico 8 presentó una $MIC_{100-Micelio} = 17 \mu M$, la cual es estadísticamente igual a la del pico 9. Mediante los análisis ESI-MS/MS no es posible explicar las diferencias exactas entre las cadenas lipofílicas (posiciones de las metilaciones) de los homólogos aislados. Por ello, será necesario llevar a cabo estudios de RMN para explicar estas posibles diferencias en toxicidad, ya que también pueden existir otros escenarios no considerados hasta el momento que expliquen la diferencia en toxicidad de los homólogos.

Cuando las MIC_{100-Espora} y MIC_{100-Micelio} son expresadas en función de la biomasa inicial al momento del contacto entre el hongo y el inhibidor, es decir, en dosis específicas, los homólogos de bacilomicina D designados como P5, P6, P7, P8, P9, P14 y P15 muestran que las MIC_{Espora} son en promedio 12.3, 12, 8.7, 3, 3.2 y 7 veces más altas que la necesaria para inhibir el crecimiento del micelio, respectivamente. Estos resultados concuerdan con otros reportes (eg. Zhao y col. 2012), ya que al parecer, el micelio en hongos filamentosos, es más susceptible a la acción de los lipopéptidos en comparación a sus esporas.

Una probable explicación a estos resultados, es el hecho de que las esporas de especies de *Colletotrichum* spp. poseen, a diferencia del micelio, dos paredes celulares (Akay e Ishida, 1967); lo que es congruente ya que estas esporas asexuales son mecanismos de resistencia para asegurar su progenia bajo condiciones ambientales no favorables. Asimismo, se conoce que la pared celular del tubo germinativo es mucho más delgada con respecto a la espora o el micelio maduro (Akay e Ishida, 1967), lo que haría más susceptible al micelio momentos después de la germinación con respecto a las esporas.

Por otro lado, las esporas de *Colletotrichum* poseen numerosos gránulos de lípidos y de carbohidratos citoplásmicos (Akay e Ishida, 1967) empleados como fuentes de carbono para el desarrollo del tubo germinativo y el apresorio melanizado. Esto es importante mencionar debido a que durante esta etapa del desarrollo en *Colletotrichum*, se requiere una alta actividad enzimática en los peroxisomas, organelos donde participan enzimas relacionadas con la β -oxidación de los ácidos grasos, oxidasas y catalasas (Asakura y col. 2012). Estas y otras enzimas, como las lacasas (oxidasas esenciales para la producción de melanina en el apresorio), podrían estar involucradas en la detoxificación de antibióticos como los lipopéptidos. En el caso específico de las lacasas, estas enzimas podrían ocasionar modificaciones en los residuos (que contienen grupos fenólicos) esenciales para la actividad antifúngica de lipopéptidos, como es el caso de la tirosina en la bacilomicina D. Por lo anterior, al hipotetizar que la bacilomicina D fuese capaz de internalizarse al atravesar la pared y la membrana celular; las esporas en germinación de *Colletotrichum* podrían existir numerosos mecanismos de detoxificación para contender el estrés debido al antibiótico.

En resumen, las concentración mínima inhibitoria específica (MIC₁₀₀) de bacilomicina D (en sus diferentes homólogos) para micelio son entre tres y doce veces menores que las necesarias para inhibir la germinación de las esporas. Esto puede deberse muy probablemente a las diferencias en composición de membrana y/o pared celular entre esporas y micelio de este hongo.

Para futuros estudios, será necesario estudiar si *Colletotrichum* posee la capacidad de degradar enzimáticamente los compuestos lipopéptidicos producidos por *Bacillus*, o bien, poseen algún otro mecanismo de resistencia.

5.0 Cambios en la morfología de spora y micelio de *C. gloeosporioides* 09 por exposición a bacilomicina D

Micrografías del micelio de *Colletotrichum gloeosporioides* 09 sometido a distintas concentraciones de homólogos de bacilomicina D, indican cambios morfológicos en las esporas en germinación e hifas en crecimiento, con respecto a un control sin antibiótico (Figura 23). Las micrografías de la figura 23 corresponden a un experimento cuando el momento del contacto entre el hongo y el antibiótico ocurrió a las 12 h después de haber inoculado las esporas en el medio de cultivo. Para el control, las esporas en germinación generan tubos germinativos con forma elipsoide, del cual se generan tubos germinativos a partir de los cuales crecen hifas y se forma el micelio.

A las 58 h, en el control no se presentó esporulación y solo es posible encontrar micelio. Este micelio es septado, dentro del cual siempre están presentes numerosos cuerpos esféricos, que podrían corresponder a reservas de lípidos en forma de glóbulos, tal como revelan las micrografías electrónicas de las esporas mostradas en otros estudios (Akai e Ishida, 1967). Asimismo, no se presentó pigmentación oscura en los cultivos (incluyendo aquellos adicionados con antibiótico), lo que significa que bajo estas condiciones, la germinación de los conidios está inclinada hacia tubos germinativos (los cuales forman hifas) y no a la formación de apresorios melanizados (Perfect y col. 1999). Esta pigmentación oscura derivada de la melanina, sí fue observada para esta cepa de *C. gloeosporioides* 09, pero sólo en cultivos sólidos (con medio PDA).

Con lo que respecta a los cultivos donde fue adicionada cierta cantidad de antibiótico, la exposición del hongo a bacilomicina D ocasionó cambios en la morfología del micelio con respecto al control. Estos cambios morfológicos se caracterizan por ser zonas dilatadas en forma de bulbo en secciones longitudinales y/o apicales de la hifa (mas frecuentemente en estas últimas). En la figura 23 se muestran las micrografías de tales estructuras atípicas ocasionadas por el lipopéptido. A una concentración de 25 μM de bacilomicina D C_{14} (Pico 5, 1044 Da), la cual corresponde a la MIC_{100} (determinada para micelio) se observa que las hifas presentan estos cambios morfológicos en los ápices (puntas de las hifas). Por otro lado, a una dosis mayor (35 μM), el antibiótico impidió el crecimiento de los tubos germinativos aún después de 58 h de cultivo, presentándose una morfología atípica en los mismos. Asimismo, en los tratamientos a una concentración de 24 μM , se observaron hifas desprovistas de los cuerpos esféricos intraceulares antes mencionados.

La respuesta del micelio de *C. gloeosporioides* a los otros homólogos de bacilomicina D a dosis iguales o superiores a la MIC_{100} fue similar a la observada con el homólogo C_{14} (Pico 5, 1044 Da): esporas detenidas en su germinación e hifas con dilataciones en las zonas apicales. La presencia de estas dilataciones en forma de bulbo en los ápices de las hifas puede significar que la bacilomicina D provoca un estrés osmótico. Esto concuerda con el hecho de que estos lipopéptidos (de la familia de la iturina) actúan como permeabilizadores de membrana, generando desbalance en la homeostasis de iones metálicos (como el K^+) de la célula. Sugerimos que este antibiótico podría anclarse a zonas específicas de la membrana del hongo, donde se encuentra más comprometida, tal como el ápice, ya que es allí donde ocurre el proceso de reestructuración de la membrana y pared celular. Sin embargo,

dada la resolución de la técnica empleada en nuestro estudio, será necesario describir este efecto con técnicas de microscopía más sofisticadas con mayor resolución como microscopía electrónica o microscopía de alta resolución. La dilatación de las hifas que observamos tras adicionar bacilomicina D a cultivos de *Colletotrichum gloeosporioides* desarrollados en matraces agitados, también pueden ser indicio de fenómenos como la anastomosis, la cual podría ocurrir entre esporas en germinación bajo un estrés (por ejemplo debido a antibióticos). Este fenómeno puede presentarse en condiciones *in vitro* para *C. gloeosporioides* (Roca y col. 2004), aunque para nuestro caso, solo es una hipótesis que necesitaría ser abordada.

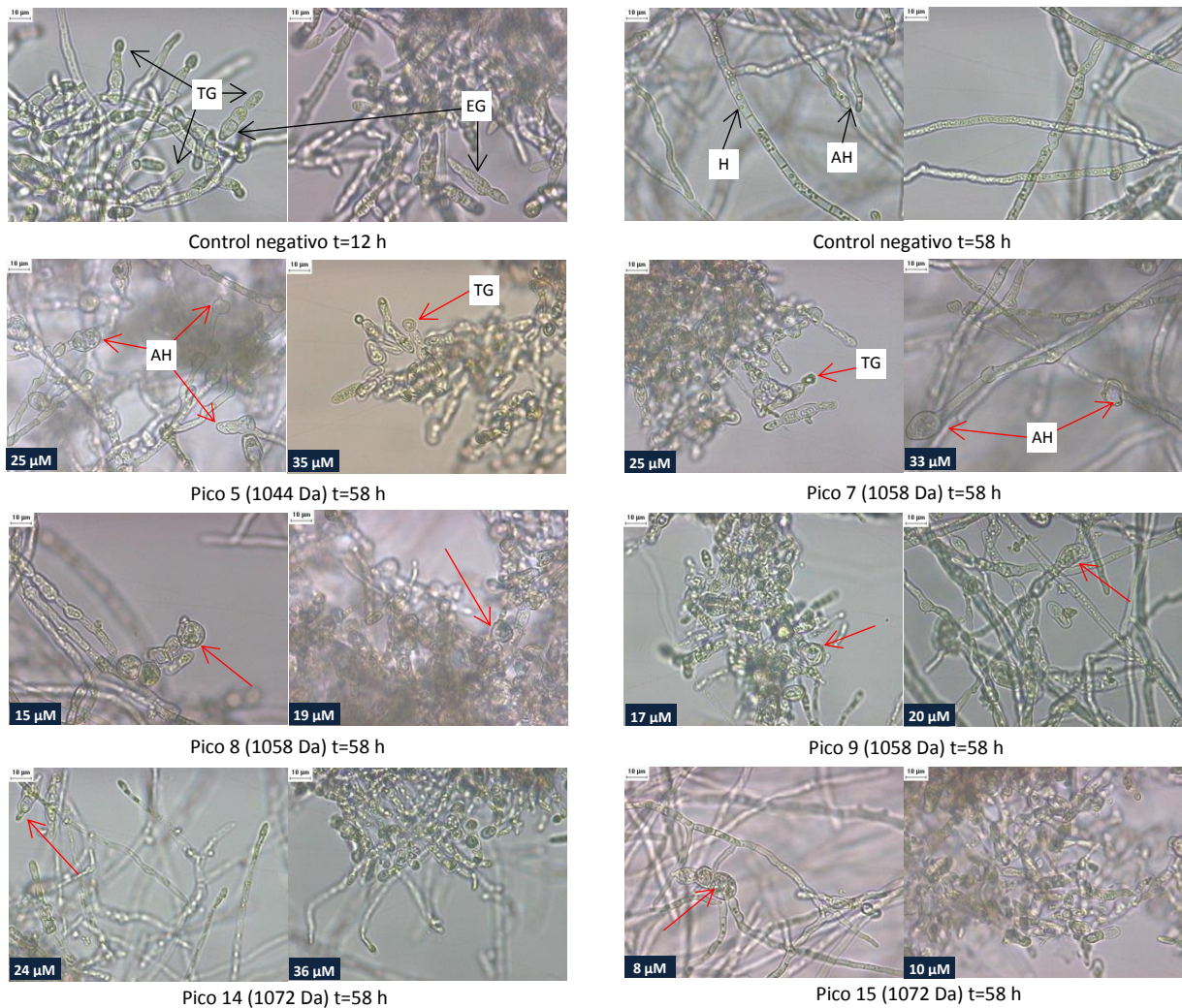


Figura 23. Cambios en la morfología de esporas (en proceso de germinación) y micelio de *Colletotrichum gloeosporioides* 09 causados por la adición de bacilomicina D al medio de cultivo. TG (Tubo germinativo), AH (Ápice de la hifa), EG (Espora en germinación), H (Hifa). La concentración del inhibidor se indica en los cuadros azules. Las flechas de color rojo indican ejemplos de estructuras atípicas con respecto al control. Todas las micrografías corresponden a campo claro (40X/0.65 160/0.17).

6.0 Efecto fungistático de la bacilomicina D sobre *C. gloeosporioides* 09

Aunque la bacilomicina D (en sus distintos homólogos) inhibe la germinación de la spora, en nuestros ensayos comprobamos que ésta germinación puede recuperarse parcialmente una vez que el lipopéptido es retirado del medio de cultivo. Esto ocurrió aún cuando se haya empleado una concentración superior a la $MIC_{100-Espora}$ determinada, sugiriendo que la bacilomicina D de *Bacillus* sp. 83 actúa como un agente fungistático. En la figura 24 se muestran los resultados de las pruebas mediante las cuales se llegó a esta conclusión. Para el homólogo C_{14} (Pico 5, 1044 Da) una vez que a esporas sometidas a 1X, 1.5X y 2X la $MIC_{100-Espora}$ (23 μ M, 36 μ M y 48 μ M) se les retiró el medio de cultivo (el cual contenía el antibiótico) y se incubaron nuevamente, estas generan un 68 %, 59 % y 72 % de la biomasa obtenida por el control. Un resultado similar fue obtenido para el homólogo C_{14} (Pico 5, 1044 Da): 57 %, 43 %, y 50 % de crecimiento con respecto al control al emplear 1X, 1.5X y 2X la $MIC_{100-Espora}$ (5 μ M, 8.1 μ M y 10.6 μ M), respectivamente. Esto sugiere que el mecanismo de acción para ambos homólogos podría ser el mismo. Con excepción de la concentración 1X $MIC_{100-Espora}$ del homólogo C_{14} (Pico 5, 1044 Da), la biomasa seca de los otros tratamientos mostraron ser estadísticamente diferentes con respecto control de esporas suspendidas en solución fisiológica, para ambos homólogos.

Una hipótesis que explicaría este hecho, es que la concentración determinada como $MIC_{100-Espora}$ sea mucho menor a la necesaria para ocasionar la pérdida total de la viabilidad celular, ya que a bajas concentraciones de estos lipopéptidos se ocasiona solo una permeabilización de membrana y conforme aumenta se provoca la solubilización de la bicapa lipídica (como sucede en el caso de la surfactina). Es por ello que podría existir una concentración letal muy superior a la $MIC_{100-Esporas}$ determinada (de más de 2X). Otra posible explicación por la cual también pudo disminuir la biomasa seca obtenida, es debido a las limitaciones propias a la metodología utilizada. Esta constituye en centrifugar las esporas tratadas para retirar el sobrenadante (con el antibiótico), generando que éstas se aglutinen. Esto provocaría la formación de escasos *pellets* y de un mayor tamaño, así como una menor área de transferencia para la adquisición de nutrientes en comparación a los cultivos control. La figura 25 muestra el conjunto de los *pellets* obtenidos durante este ensayo (en cultivos en líquido); los cuales para su visualización fueron colocados en una caja de Petri previo a la determinación de la biomasa seca. Esto se realizó con la finalidad de observar las diferencias en su morfología. Aquí puede observarse que tanto para los cultivos que fueron tratados con bacilomicina D, como para el control de esporas suspendidas en solución fisiológica, los *pellets* obtenidos son mucho más grandes pero menos numerosos que los obtenidos en los controles (denotados como “0 μ M, 0 μ L MeOH” y “0 μ M, 100 μ L MeOH”).

Para futuros estudios, la acción fungistática de la bacilomicina D podrían ser corroborada mediante una tinción con fluoróforos que indiquen viabilidad o muerte celular (como el diacetato de fluoresceína y el yoduro de propidio, respectivamente) de las esporas sometidas a bacilomicina D, en conjunto a técnicas que permitan el estudio de un gran número de eventos, como la citometría de flujo.

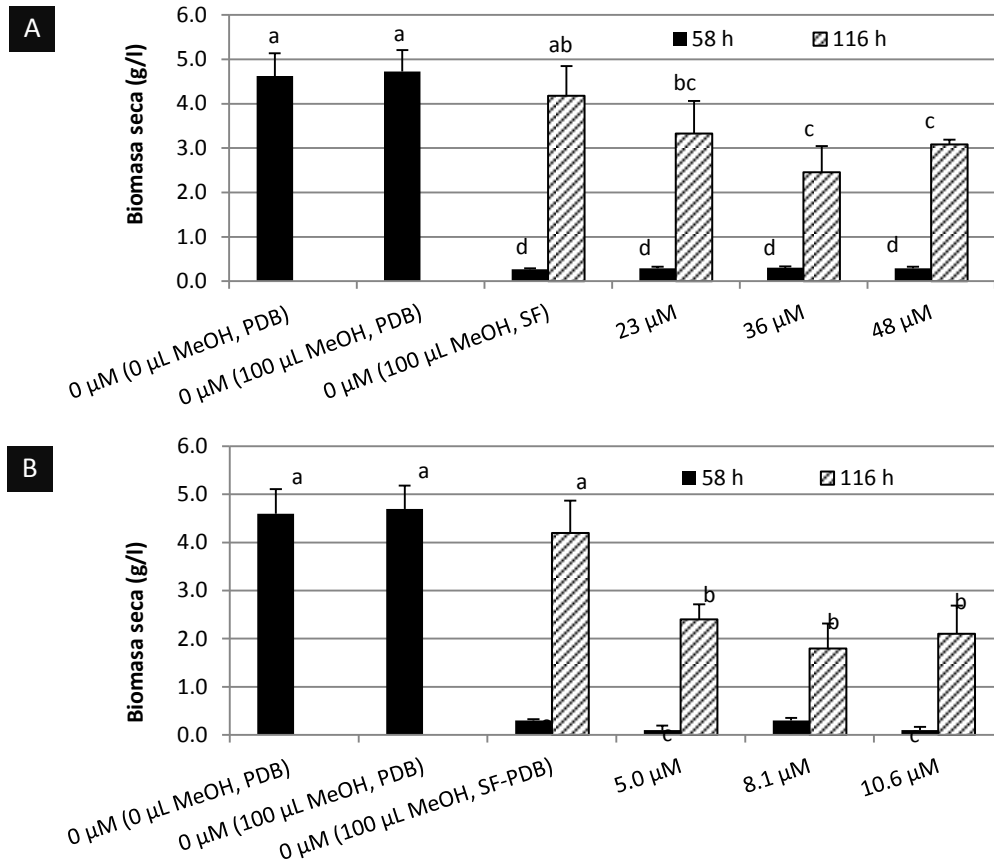


Figura 24. Determinación del efecto fungistático de la bacilomicina D. A. Ensayo para pico 5, C₁₄ 1044 Da y B. Ensayo para el pico 15 C₁₆, 1072 Da) durante 58 h o 116h (para aquellos que fueron sometidos a un lavado del medio de cultivo e incubados por una segunda ocasión). “0 μM (0 μL MeOH)” es un control absoluto, “0 μM (100 μL MeOH)” y “0 μM (SF-PDB)” son controles negativos.

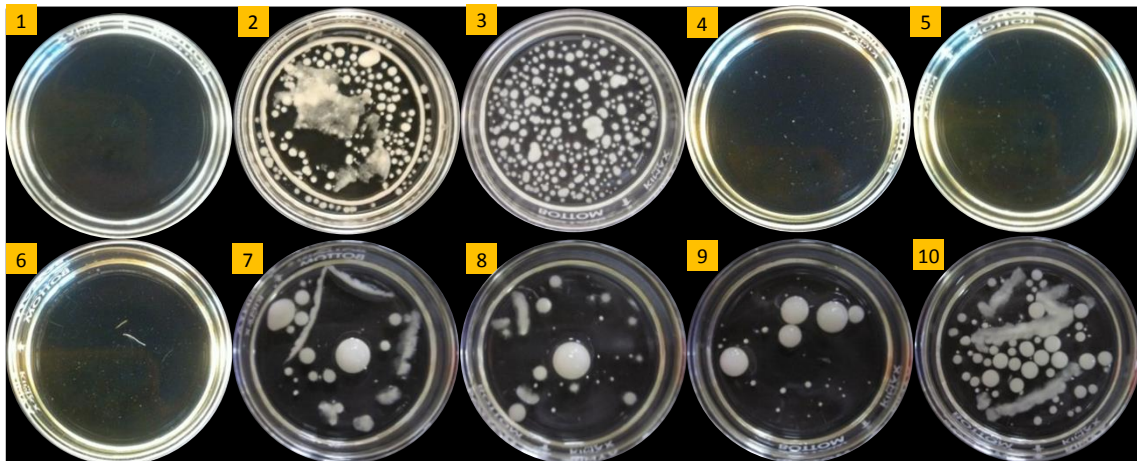


Figura 25. Morfología del pellet en *Colletotrichum gloeosporioides* 09, después de que esporas sometidas a concentraciones iguales o mayores a la MIC₁₀₀ de bacilomicina D C₁₄ (Pico 5, 1044 Da) fueran incubadas en medio fresco sin antibiótico. 1. En solución fisiológica, 0 μM (58 h); 2. En PDB, 0 μM, 0 μL MeOH, 58h; 3. En medio PDB, 0 μM, 100 μL MeOH (58 h); 4. En medio PDB, 23 μM (58 h); 5. En PDB, 36 μM (58 h); 6. En medio PDB, 48.7 μM (58 h). 10, 7, 8 y 9 corresponden al material de 1, 4, 5 y 6 (a las 58 h) recuperado en medio PDB fresco e incubado 58 h más, respectivamente.

Como se mencionó, el hecho de que existan esporas capaces de germinar y generar micelio aún después de una exposición a bacilomicina D (a la MIC₁₀₀) indica que este lipopéptido posee un carácter fungistático. Es probable que su acción antifúngica ocurra solo después de que la spora haya entrado en su proceso de germinación, ya que el lipopéptido no es capaz de alcanzar y ocasionar daños en su membrana blanco en una spora que cuenta con una doble pared celular a diferencia del micelio (Akay e Ishida, 1967). Si este no fuese el caso, es decir, que la bacilomicina D sí sea capaz de atravesar las paredes celulares de la spora, éstas tendrían que poseer otro mecanismo de resistencia.

Entre las diferentes posibilidades, resulta difícil pensar que se traten de proteasas ya que como se sabe, estos lipopéptidos son resistentes a éstas debido a la configuración en L y D de los aminoácidos presentes en el anillo. Aunque podría tratarse de alguna amidasa u otra hidrolasa que rompa el enlace amida entre el ácido graso y la parte peptídica de la bacilomicina D, ocasionando que pierda su actividad (toxicidad). Sin embargo, no existen reportes en la literatura que soporten esta hipótesis.

Es importante resaltar que las esporas del hongo, son células en latencia, por lo que es difícil pensar que cuenten con la maquinaria necesaria, para la degradación del antibiótico hasta momentos después de su germinación. Aunque los mecanismos de resistencia por parte de bacterias y hongos a antibióticos que involucren la inhibición de la síntesis de proteínas o DNA son bien conocidos (Vranakis y col. 2014); para el caso de los lipopéptidos (sintetizados por *Bacillus*) no se han estudiado los mecanismos de resistencia en otros microorganismos. El caso más similar de resistencia es el reportado en *Candida* sp. para resistir la acción de la amfotericina B, un antibiótico que poseé al igual que las iturinas, un blanco de acción en membrana uniéndose a esteroides y formando poros iónicos. Una cepa de *Candida albicans* se vuelve resistente a la amfotericina B si la síntesis de esteroides es inhibida. Se deduce a partir de lo anterior, que *C. albicans* al modular su contenido de esteroides en membrana, disminuye la afinidad de la misma a la amfotericina B (Akins y Sobel, 2009).

VI. Conclusiones

En este estudio se identificaron y caracterizaron los distintos lipopéptidos producidos por *Bacillus* sp. 83, el ingrediente activo del biofungicida comercial *Fungifree AB*[®] y que están involucrados en la inhibición *in vitro* contra *Colletotrichum gloeosporioides* 09. Los principales hallazgos de este trabajo fueron:

- *Bacillus* sp. 83 sintetiza compuestos lipopeptídicos correspondientes a bacilomicina D, la cual es capaz de inhibir *in vitro* la germinación de esporas y el crecimiento del micelio.
- Los lipopéptidos aislados e identificados de *Bacillus* sp. 83 corresponden a seis homólogos de bacilomicina D, clasificados en tres distintos grupos isoméricos: 1044, 1058 y 1072 Da. La secuencia peptídica de estos compuestos correspondió a [Asn₁-Tyr₂-Asn₃-Pro₄-Glu₅-Ser₆-Thr₇], con una modificación en Glu₅, probablemente metilado; el cual forma un anillo con cadenas de ácido graso β-NH₂ de longitud variable (C₁₄, C₁₅ y C₁₆).
- Los homólogos de bacilomicina D muestran diferencias en su actividad antifúngica contra esporas. Aquellos con el mismo peso molecular pueden presentar distinta actividad antifúngica. Estos hechos sugieren que el esqueleto principal del ácido graso se encuentra metilado en posición *iso* o *anteiso*, lo cual ocasiona las diferencias en la actividad antifúngica.
- Las concentraciones mínimas inhibitorias específicas (MIC₁₀₀) de bacilomicina D (en sus diferentes homólogos) para micelio son entre tres y doce veces menores que las necesarias para inhibir la germinación de esporas.
- En cultivos de *Colletotrichum gloeosporioides* 09, la adición de bacilomicina D a dosis sub-letales, ocasiona un efecto de promoción del crecimiento (con respecto a un control sin antibiótico) si el antibiótico entra en contacto con las esporas previo a su germinación. Este trabajo es el primer reporte sobre este tipo de efecto estimulante del crecimiento, para este tipo de antibióticos. Tal efecto no fue observado en los bioensayos cuando la adición del lipopéptido ocurre cuando las esporas ya han germinado y se ha formado micelio.
- Aunque la bacilomicina D (en sus distintos homólogos) inhibe la germinación de las esporas de *C. gloeosporioides*, ésta puede presentarse una vez que el lipopéptido es retirado del medio de cultivo hasta 58 h posteriores a su incubación inicial y aún cuando se hayan empleado concentraciones superiores a la MIC₁₀₀ encontrada en este trabajo. Estos experimentos sugieren que la bacilomicina D de *Bacillus* sp. 83 actúa como un agente fungistático.

VI. Perspectivas

- Confirmar las longitudes de cadena de ácido graso mediante RMN para los homólogos de bacilomicina D. Esto con la finalidad de corroborar si existe una correlación entre la longitud de cadena del ácido graso y su actividad antifúngica.
- Confirmar la metilación en Glu₅ y el origen de la misma en los homólogos de bacilomicina D aislados mediante estudios de RMN. Asimismo, evaluar si este cambio en su estructura le confiere ventajas en toxicidad o una mayor especificidad en su actividad antifúngica con respecto a la estructura no modificada.
- Estudiar la interacción (aditiva o sinérgica) entre los homólogos de bacilomicina D y surfactina en mezclas producidas por *Bacillus* sp. 83.
- Estudiar si *Bacillus* sp. 83 en interacción con *Colletotrichum gloeosporioides* es capaz de modular la síntesis de bacilomicina D.
- Realizar estudios de microscopía de alta resolución o electrónica para definir los cambios intracelulares causados por el lipopéptido en células de *Colletotrichum gloeosporioides* 09.
- Realizar estudios de microscopía de alta resolución o electrónica para definir las diferencias estructurales de la membrana y pared celular, entre esporas y micelio de *Colletotrichum gloeosporioides* 09 con la finalidad de esclarecer la razón por la cual, la MIC₁₀₀ de bacilomicina D para micelio es menor a la de esporas. Con el mismo objetivo, realizar un análisis de los lípidos y esteroides mediante GC-MS, para discernir diferencias en composición de membrana entre esporas y micelio de este hongo.
- Realizar estudios de fluorescencia y/o citometría de flujo en esporas de *Colletotrichum gloeosporioides* 09 tratadas con bacilomicina D a concentraciones iguales o mayores a la MIC determinada, con el fin de comprobar la acción fungistática del lipopéptido.
- Estudiar los procesos de unión e inserción en membrana de los lipopéptidos purificados.

VIII. REFERENCIAS

- Alvarez, F, Castro, M, Príncipe, A, Borioli, G, Fischer, S, Mori, G, and Jofré, E.** (2012). The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP₂18 and ARP₂3 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease. *Journal of Applied Microbiology*. 112(1): 159-174.
- Alvindia, D G, and Natsuaki, K T.** (2009). Biocontrol activities of *Bacillus amyloliquefaciens* DGA14 isolated from banana fruit surface against banana crown rot-causing pathogens. *Crop Protection*. 28(3): 236-242.
- Akai, S and Ishida, N.** (1967). An electron microscopic observation on the germination of conidia of *Colletotrichum lagenarium*. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*. 34(3): 337-345.
- Akins R A and Sobel J D.** (2009). Antifungal targets, mechanisms of action, and resistance in *Candida albicans*. In: Mayers, D L. (ed.). *Antimicrobial Drug Resistance*. Humana Press. pp: 347-407.
- Ambreen, A and Shahida, H.** (2010). Auxin producing *Bacillus* sp.: Auxin quantification and effect on the growth of *Solanum tuberosum*. *Pure and Applied Chemistry*. 82(1): 313-319.
- Aragón-Gómez, W. I.** (2012). Desarrollo de un marcador molecular específico para el agente de control biológico *Bacillus* sp. 83. *Tesis de maestría en Ciencias Bioquímicas*. Depto. de Ingeniería Celular y Biotatálisis. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos.
- Arima, K, Kakinuma, A and Tamura G.** (1968). Surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 31(3):488-494.
- Arguelles-Arias, A, Ongena, M, Halimi, B, Lara, Y, Brans, A, Joris, B, and Fickers, P.** (2009). *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microbial Cell Factories*. 8(63):1-12.
- Arrebola, E, Jacobs, R, and Korsten, L.** (2010). Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. *Journal of Applied Microbiology*. 108(2): 386-395.
- Asaka, O and Shoda, M.** (1996). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Applied and Environmental Microbiology*. 62(11): 4081-4085.
- Asakura, M, Yoshino, K, Hill, A M, Kubo, Y, Sakai, Y and Takano, Y.** (2012). Primary and secondary metabolism regulates lipolysis in appressoria of *Colletotrichum orbiculare*. *Fungal Genetics and Biology*. 49(11): 967-975.
- Banik, S and Dey, B K.** (1982). Available phosphate content of an alluvial soil is influenced by inoculation of some isolated phosphatesolubilizing microorganisms. *Plant and Soil*. 69(3): 353-364.
- Batrakov, S G, Rodionova, T A, Esipov, S E, Polyakov, N B, Sheichenko, V I, Shekhovtsova, N V, Lukin, S M, Panikov, N S and Nokolaev, Y A.** (2003). A novel lipopeptide, an inhibitor of bacterial adhesion, from the thermophilic and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* strain 603. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1634(3):107-115
- Baysal, O, Lai, D, Xu, H H, Siragusa, M, Calışkan, M, Carimi and Tör, M.** (2013). A proteomic approach provides new insights into the control of soil-borne plant pathogens by *Bacillus* species. *Plos One*. 8(1): 1-12.
- Béchet, M, Caradec, T, Hussein, W, Abderrahmani, A, Chollet, M, Leclère, V, Dubois, T, Lereclus, D, Pupin, M, and Jacques, P.** (2012). Structure, biosynthesis, and properties of kurstakins, nonribosomal lipopeptides from *Bacillus* spp. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 95(3): 593-600.
- Béchet, M, Castéra-Guy, J, Guez, J, Chihib, N, Coucheney, F, Coutte, F, Fickers, P, Leclere, V, Wathelet and Jacques, P.** (2013). Production of a novel mixture of mycosubtilins by mutants of *Bacillus subtilis*. *Bioresource Technology*. 145: 264-270.
- Besson, F and Michel, G.** (1987). Isolation and characterization of new iturins: iturin D and iturin E. *The Journal of Antibiotics*. 40(4): 437-442.

- Besson F, Peypoux, F and Michel, G.** (1978). Action of mycosubtilin and of bacillomycin L on *Micrococcus luteus* cells and protoplasts. *FEBS Letters*. 90(1): 36-40.
- Blom, J, Rueckert, C, Niu, B, Wang, Q, and Borriss, R.** (2012). The complete genome of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* CAU B946 contains a gene cluster for nonribosomal synthesis of iturin A. *Journal of Bacteriology*. 194(7): 1845-1846.
- Cannon, P F, Damm, U, Johnston, P R and Weir, B S.** (2012). *Colletotrichum* – current status and future directions. *Studies in Mycology*. 73(1): 181-213.
- Cao, Y, Xu, Z, Ling, N, Yuan, Y, Yang, X, Chen, L, Shen, B and Shen, Q.** (2012). Isolation and identification of lipopeptides produced by *B. subtilis* SQR 9 for suppressing *Fusarium* wilt of cucumber. *Scientia Horticulturae*. 135: 32-39.
- Cascino, J J, Harris, R F, Smith, C S, and Andrews, J H.** (1990). Spore yield and microcycle conidiation of *Colletotrichum gloeosporioides* in liquid culture. *Applied and Environmental Microbiology*. 56(8): 2303-2310.
- Caveglieri, L, Orlando, J, Rodríguez, M J, Chulze, S and Etcheverry, M.** (2005). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticilloides* in vitro and at the maize root level. *Research in Microbiology*. 156(5): 748-754.
- Centis, S, Guillas, I, Sejalon, N, Esquerre-Tugaye, M T, and Dumas, B.** 1997. Endopolygalacturonase genes from *Colletotrichum lindemuthianum*: Cloning of *CLPG2* and comparison of its expression to that of *CLPG1* during saprophytic and parasitic growth of the fungus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 10(6): 769-775.
- Chen, H, Wang, L, Su, C X, Gong, G H, Wang, P, and Yu, Z L.** (2008). Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. *Letters in Applied Microbiology*. 47(3): 180-186.
- Chen, H, Xiao, X, Wang, J, and Wu, L.** (2007). Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea*. *Biotechnology Letters*. 30(5): 919-923.
- Chen, L, Wang, N, Wang, X, Hu, J, and Wang, S.** (2010). Characterization of two anti-fungal lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* SH-B10. *Bioresource Technology*. 101(22): 8822-8827.
- Chen, X H, Koumoutsis, A, Scholz, R, and Borriss, R.** (2009). More than anticipated - production of antibiotics and other secondary metabolites by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 16: 14-24.
- Chen, X H, Koumoutsis, A, Scholz, R, Eisenreich, A, Schneider, K, Heinemeyer, I, Morgenstern, B, Voss, B, Hess, R W, Reva, O, Junge, H, Voigt, B, Jungblut, P R, Vater, J, Süssmuth, R, Liesegang, H, Strittmatter, A, Gottschalk, G and Borriss, R.** (2007). Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature Biotechnology*. 25(9): 1007-1014.
- Chen, X H, Koumoutsis, A, Scholz, R, Schneider, K, Vater, J, Süssmuth, R, Piel, J and Borriss, R.** (2009a). Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *Journal of Biotechnology*. 140(1): 27-37.
- Chen, X H, Scholz, R, Borriss, M, Junge, H, Mögel, G, Kunz, S, and Borriss, R.** (2009b). Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. *Journal of Biotechnology*. 140(2): 38-44.
- Chin-Diew L.** 2014. Generalized Weibull Distributions. *SpringerBriefs in Statistics*. Springer. pp: 1-75.
- Cho, S J, Lee, S K, Cha, B J, Kim, Y H, and Shin, K S.** (2003). Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin A from *Bacillus subtilis* strain KS03. *FEMS Microbiology Letters*. 223(1): 47-51.
- Correa, O S, Montecchia, M S, Berti, M F, Fernández Ferrari, M C, Pucheu, N L, Kerber, N L, and García, A F.** (2009). *Bacillus amyloliquefaciens* BNM122, a potential microbial biocontrol agent applied on soybean seeds, causes a minor impact on rhizosphere and soil microbial communities. *Applied Soil Ecology*. 41(2): 185-194.
- Correa, O S and Soria, M A.** (2010). Potential of *Bacilli* for biocontrol and its exploitation in sustainable agriculture. In: Maheshwari, D K. 2010. Plant Growth and Health Promoting Bacteria. *Microbiology Monographs*. 18: 197-209.

- Cristiano-Fajardo, S A.** (2012). Estrategias de cultivo en lote y lote alimentado para el crecimiento vegetativo y la producción de esporas de *Bacillus subtilis* 83. Depto. de Ingeniería Celular y Biotecnología. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos.
- Douville, Y, and Boland, J G.** (1992). A note on the antibiotic properties of *Bacillus subtilis* against *Colletotrichum trifolii*. *Phytoprotection*. 73(1): 31-36.
- Dunlap, C A, Schisler, D A, Price, N P and Vaughn, S F.** (2011). Cyclic lipopeptide profile of three *Bacillus subtilis* strains; antagonists of *Fusarium* head blight. *The Journal of Microbiology*. 49(4): 603-609.
- Emmert, E A, Klimowicz, A K, Thomas, M G and Handelsman, J.** (2004). Genetics of zwittermicin A production by *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(1): 104-113.
- Ettinger, W F, Thukral, S K, and Kolattukudy, P E.** (1987). Structure of cutinase gene, cDNA and the derived amino acid sequence from phytopathogenic fungi. *Biochemistry*. 26(24): 7883-7892.
- Fickers, P, Guez, J S, Damblon, C, Leclère, V, Béchet, M, Jacques, P, and Joris, B.** (2009). High-level biosynthesis of the anteiso-C(17) isoform of the antibiotic mycosubtilin in *Bacillus subtilis* and characterization of its candidacidal activity. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(13): 4636-4640.
- Galindo-Fentanes, E, Carrillo-Fasio, A, García-Estrada, R S, and Patiño-Vera, M.** (2005). Tecnología para el control biológico de la principal enfermedad del mango (antracnosis). *Claridades Agropecuarias*. 148: 50-59.
- Galindo E, Serrano-Carreón L, Gutiérrez C R, Allende R, Balderas K, Patiño M, Trejo M, Wong M A, Rayo E, Isauro D and Jurado C.** 2013. The challenges of introducing a new biofungicide to the market: A case study. *Electronic Journal of Biotechnology*. 16 (3): 1-23.
- Galindo E, Serano-Carreón L, Gutiérrez C R, Balderas-Ruiz K A, Muñoz-Celaya A L, Mezo-Villalobos M, Arroyo-Colín J.** 2015. Desarrollo histórico y los retos tecnológicos y legales para comercializar *Fungifree AB®*, el primer biofungicida 100% mexicano. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 18(1): 52-60.
- Gaofu, Q, Fayin, Z, Peng, D, Xiufen, Y, Dewen, Qiu, Ziniu, Y, Jingyuan, C and Xiuyun, Z.** (2010). Lipopeptide induce apoptosis in fungal cells by a mitochondria-dependent pathway. *Peptides*. 31(11): 1978-1986.
- Gong, Q, Zhang, C, Lu, F, Zhao, H, Bie, X, and Lu, Z.** (2014). Identification of bacillomycin D from *Bacillus subtilis* fmbJ and its inhibition effects against *Aspergillus flavus*. *Food Control*. 36(1): 8-14.
- Grau A, Gómez-Fernández J C, Peypoux F, and Ortiza, A.** (2001). Aggregational behavior of aqueous dispersions of the antifungal lipopeptide iturin A. *Peptides*. 22(1): 1-5.
- Gray, E J and Smith, D L.** (2005). Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*. 37(3): 395-412.
- Hamer, J E, Howard, R J, Chumley, F G and Valent, B.** (1987). A mechanism for surface attachment of spores of a plant pathogenic fungus. *Science*. 239(4837):288-290.
- Hasumi, K, Takizawa, K, Takahashi, F, Park J K and Endo, A.** (1995). Inhibition of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase by isohalobacillin, a complex a novel cyclic acylpeptides produced by *Bacillus* sp. A1238. *Journal of Antibiotics*. 48(12): 1419-1424.
- Hathout, Y, Ho, Y P, Ryzhov, V, Demirev, P and Fenselau, C.** (2000). Kurstakins: A new class of lipopeptides isolated from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Natural Products*. 63(11): 1492-1496.
- He, H, Shen, B, Korshalla, J and Carter, G T.** (2001). Circulocins, new antibacterial lipopeptides from *Bacillus circulans*, J2154. *Tetrahedron*. 57(7): 1189-1195.
- Hiradate, S, Yoshida, S, Sugie, H, Yada, H, and Fujii, Y.** (2002). Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2. *Phytochemistry*. 61(6): 693-698.

- Hosono, K, and H. Suzuki.** (1983). Acylpeptides, the inhibitors of cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase III. *Journal of Antibiotics*. 36(6): 679-683.
- Ishigami, Y, Osman, M, Nakahara, H, Sano, Y, Ishiguro, R and Matsumoto, M.** (1995). Significance of β -sheet formation for micellization and surface adsorption of surfactin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 4(6): 341-348.
- Ishikawa, F H, Souza, E A, Read, N D and Roca, M G.** (2010). Live-cell imaging of conidial fusion in the bean pathogen, *Colletotrichum lindemuthianum*. *Fungal Biology*. 114(1): 2-9.
- Islam, R, Jeong, Y T, Lee, Y S, and Song, C H.** (2012). Isolation and identification of antifungal compounds from *Bacillus subtilis* C9 inhibiting the growth of plant pathogenic fungi. *Mycobiology*. 40(1): 59-65.
- Jacques, P.** (2011). Surfactin and other lipopeptides from *Bacillus* spp. In: Soberón-Chavéz, G (ed). *Biosurfactans*. Springer. pp: 57-91.
- Jauregi, P, Coutte, F, Catiau, L, Lecouturier, D, Jacques P.** (2013). Micelle size characterization of lipopeptides produced by *B. subtilis* and their recovery by the two-step ultrafiltration process. *Separation and Purification Technology*. 104: 175-182.
- Jetiyanon, K.** (2007). Defensive-related enzyme response in plants treated with a mixture of *Bacillus* strains (IN937a and IN937b) against different pathogens. *Biological Control*. 42(2): 178-185.
- Kajimura, Y, Sugiyaman, M, and Kaneda, M.** (1995). Bacillopeptins, new cyclic lipopeptide antibiotics from *Bacillus subtilis* FR-2 taxonomy of the producing organism. *The Journal of the Antibiotics*. 48(10): 1095-1103.
- Kaneda, T.** (1966). Fatty acids in the genus *Bacillus*. I. *Iso*- and *Anteiso*-Fatty acids as characteristic constituents of lipids in 10 species. *Journal of Bacteriology*. 93(3): 894-903.
- Kaneda, T.** (1977). Fatty acids of the genus *Bacillus*: an example of branched-chain preference. *Bacteriological Reviews*. 41(2): 391-418.
- Kenny, M K, Galea, V J and Price, T V.** (2012). Germination and growth of *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from coffee in Papua New Guinea and their pathogenicity to coffee berries. *Australasian Plant Pathology*. 41(5): 519-528.
- Kim, P I, Bai, H, Bai, D, Chae, H, Chung, S, Kim, Y, Park, R and Chi, Y T.** (2004). Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. *Journal of Applied Microbiology*. 97(5): 942-949.
- Kim, P I, Ryu, J, Kim, Y H, and Chi, Y T.** (2010). Production of biosurfactant lipopeptides iturin A, fengycin, and surfactin a from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 20(1): 138-145.
- Koumoutsi, A, Chen, X, Henne, A, Hitzeroth, G, Franke, P, Vater, J and Liesegang, H.** (2004). Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *Journal of Bacteriology*. 186 (4): 1084-1096.
- Krass, F, I, Helmetag, V, Wittmann, M, Strieker, M, Marahiel, M A.** (2010). Functional dissection of surfactin synthetase initiation module reveals insights into the mechanism of lipoinitiation. *Chemistry and Biology*. 17(8): 872-880.
- Kugler, M, Loeffler, W, Rapp, C, Kern, A, and Jung, G.** (1990). Rhizoctin A, an antifungal phosphono-oligopeptide of *Bacillus subtilis* ATCC 6633: biological properties. *Archives of Microbiology*. 153 (3): 276-281.
- Kumar, A S, Lakshmanan, V, Caplan, J L, Powell, D, Czymmek, K J, Levia, D F, and Bais, H P.** (2012). Rhizobacteria *Bacillus subtilis* restricts foliar pathogen entry through stomata. *The Plant Journal*. 72(4): 694-706.
- Lee H, Churey, J J and Worobo, R W.** (2008). Purification and structural characterization of bacillomycin F produced by a bacterial honey isolate active against *Byssoschlamys fulva* H25. *Journal of Applied Microbiology*. 105(3): 663-673.
- Lee, S C, Kim, S H, Park, I H, Chung, S Y, and Choi, Y L.** (2007). Isolation and structural analysis of bamylocin A, novel lipopeptide from *Bacillus amyloliquefaciens* LP03 having antagonistic and crude oil-emulsifying activity. *Archives of Microbiology*. 188(4): 307-312.

- Leite B and Nicholson RL.** (1992). Mycosporine-alanine: A self-inhibitor of germination from the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Experimental Mycology*. 16(1): 76-86.
- Li, J and Jensen, S E.** (2008). Nonribosomal biosynthesis of fusaricidins by *Paenibacillus polymyxa* PKB1 involves direct activation of a D-Amino Acid. *Chemistry and Biology*. 15(2): 118-127.
- Liu, B, Qiao, H, Huang, L, Buchenauer, H, Han, Q, Kang, Z, and Gong, Y.** (2009a). Biological control of take-all in wheat by endophytic *Bacillus subtilis* E1R-j and potential mode of action. *Biological Control*. 49(3): 277-285.
- Liu, J, Zhou, T, He, D, Li, X, Wu, H, Liu, W, and Gao, X.** (2011). Functions of lipopeptides bacillomycin D and fengycin in antagonism of *Bacillus amyloliquefaciens* C06 towards *Monilinia fructicola*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 20(1): 43-52.
- Liu, W W, Mu, Wei, Zhu, B, Du, Y and Liu, F.** (2008). Antagonistic activities of volatiles from four strains of *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* spp. against soil-borne plant pathogens. *Agricultural Sciences in China*. 7(9): 1104-1114.
- Liu, X Y, Yang, S Z and Mu, B Z.** (2009b). Production and characterization of a C₁₅-surfactin-O-methyl ester by a lipopeptide producing strain *Bacillus subtilis* HSO121. *Process Biochemistry*. 44(10): 1144-1151.
- López D, Vlamakis H, and Kolter R.** (2009). Generation of multiple cell types in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Reviews*. 33(1): 152-163.
- Lugtenberg, B and Kamilova, F.** (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*. 63: 541-556.
- Ma, Z, Wang, N, Hu, J, and Wang, S.** (2012). Isolation and characterization of a new iturinic lipopeptide, mojavensin A produced by a marine-derived bacterium *Bacillus mojavensis* B0621A. *The Journal of Antibiotics*. 65(6): 317-322.
- Maget-Dana R, Heitz F, Ptak M, Peypoux F and Guinand M.** (1985). Bacterial lipopeptides induce ion-conducting pores in planar bilayers. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 129(3): 965-971.
- Maget-Dana, R. and Peypoux, F.** (1994). Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. *Toxicology*. 87(1-3): 151-174.
- Maget-Dana, R and Ptak, M.** (1990). Iturin lipopeptides: interactions of mycosubtilin with lipids in planar membranes and mixed monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1023(1): 34-40.
- Makovitzki, A, Avrahami, D and Shai, Y.** (2006). Ultrashort antibacterial and antifungal lipopeptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103(43): 15997-16002.
- Malfanova, N, Franzil, L, Lugtenberg, B, Chebotar, V, and Ongena, M.** (2012). Cyclic lipopeptide profile of the plant-beneficial endophytic bacterium *Bacillus subtilis* HC8. *Archives of Microbiology*. 194 (11): 893-899.
- Mercure, E W, Kunoh, H and Nicholson, R L.** (1995). Visualisation of materials released from adhered, ungerminated conidia of *Colletotrichum graminicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 46(2): 121-135. *Citado en:* Rawlings S L, O'Connell R J and Greena J R. (2007). The spore coat of the bean anthracnose fungus *Colletotrichum lindemuthianum* is required for adhesion, appressorium development and pathogenicity. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 70(6): 110-119.
- Mercure E W, Kunoh H and Nicholson R L.** (1994). Adhesion of *Colletotrichum graminicola* conidia to corn leaves: a requirement for disease development. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 45(6): 407-420.
- Mizumoto, S, Hirai, M, and Shoda, M.** (2007). Enhanced iturin A production by *Bacillus subtilis* and its effect on suppression of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 75(6): 1267-1274.
- Mochizuki, M, Yamamoto, S, and Aoki, Y.** (2012). Isolation and characterisation of *Bacillus amyloliquefaciens* S13-3 as a biological control agent for anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Biocontrol Science and Technology*. 22(6): 37-41.
- Moyne A L, Cleveland T E and Tuzun, S.** (2004). Molecular characterization and analysis of the operon encoding the antifungal lipopeptide bacillomycin D. *FEMS Microbiology Letters*. 234(1): 43-49.

- Nail-Nasir, M and Besson, F.** (2012a). Conformational analyses of bacillomycin D, a natural antimicrobial lipopeptide, alone or in interaction with lipid monolayers at the air-water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*. 387(1): 187-193.
- Nail-Nasir M, and Besson, F.** (2012b). Interactions of the antifungal mycosubtilin with ergosterol-containing interfacial monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1818(5): 1302-1308.
- Nazari M, Kurdi, M, and Heerklotz, H.** (2012). Classifying surfactants with respect to their effect on lipid membrane order. *Biophysical Journal*. 102(3): 498-506.
- Naruse, N, Tenmyo, O, Kobaru, S, Kamei, H, Miyaki, T, Konishi, M and Oki, T.** (1990). Pumilacidin, a complex of new antiviral antibiotics. Production, isolation, chemical properties, structure and biological activity. *Journal of Antibiotics*. 43(3):267-280
- Ongena, M, Jourdan, E, Adam, A, Paquot, M, Brans, A, Joris, B, and Thonart, P.** (2007). Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*. 9(4): 1084-1090.
- Ongena, M. and Jacques, P.** (2007). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*. 16(3): 3-5.
- Oliveira, S S, Seldin, L and Bastes, M C F.** (1993). Identification of structural nitrogen-fixation (*nif*) genes in *Bacillus polymyxa* and *Bacillus macerans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 9(3): 387-389.
- Osman, M S, Sivakumar, D and Korsten, L.** (2011). Effect of biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* and 1-methyl cyclopropene on the control of postharvest diseases and maintenance of fruit quality. *Crop Protection*. 30(2): 173-178.
- Pal Bais, H P, Fall, R, and Vivanco, J M.** (2004). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin. *Plant Physiology*. 134(1): 307-319.
- Pecci, Y, Rivardo, F, Martinotti, M G, and Allegrone, G.** (2010). LC/ESI-MS/MS characterisation of lipopeptide biosurfactants produced by the *Bacillus licheniformis* V9T14 strain. *Journal of Mass Spectrometry*. 45(7): 772-778.
- Perfect S E, Hughes H B, O'Connell R J, and Green J R.** (1999). *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. *Fungal Genetics and Biology*. 27(2-3): 186-198.
- Peypoux, F, Pommier, M T, Das, C B, Besson, F, Delcambe, L and Michel, G.** (1984). Structures of bacillomycin D and bacillomycin L peptidolipid antibiotics from *Bacillus subtilis*. *The Journal of Antibiotics*. 37(12): 1600-1604.
- Phae, C G and Shoda, M.** (1991). Investigation of optimal conditions for foam separation of iturin, an antifungal peptide produced by *Bacillus subtilis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 71(2): 118-121.
- Phae, C G, Shoda, M and Kubota, H.** (1990). Suppressive effect of *Bacillus subtilis* and its products on phytopathogenic microorganism. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 69(1): 1-7.
- Picard, C and Bosco, M.** (2008). Genotypic and phenotypic diversity in populations of plant-probiotic *Pseudomonas* spp. colonizing roots. *Naturwissenschaften* 95(1): 1-16.
- Podile, A and Kishore, G.** (2006). Plant growth-promoting rhizobacteria. In: Gnanamanickam, S S (ed.). *Plant-Associated Bacteria*. Springer. pp: 195-230.
- Raghavendra, J and McSpadden-Gardener, B B.** (2005). Identification and characterization of novel genetic markers associated with biological control activities in *Bacillus subtilis*. *Biological Control*. 96 (2): 145-154.
- Ramarathnam, R, Bo, S, Chen, Y, Fernando, W G D, Xuewen, G, and de Kievit, T.** (2007). Molecular and biochemical detection of fengycin and bacillomycin D-producing *Bacillus* spp., antagonistic to fungal pathogens of canola and wheat. *Canadian Journal of Microbiology*. 53(7): 901-911.
- Rawlings, S L, O'Connell, R J and Greena, J R.** (2007). The spore coat of the bean anthracnose fungus *Colletotrichum lindemuthianum* is required for adhesion, appressorium development and pathogenicity. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 70: 110-119.

- Reymond, P and Farmer, E E.** (1998). Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current Opinion in Plant Biology*. 1(5): 404-411.
- Roca, M G, Davide, L C, Mendes-Costa, M C and Wheals, A.** (2003). Conidial anastomosis tubes in *Colletotrichum*. *Fungal Genetics and Biology*. 40(2): 138-145.
- Roca, M G, Davide, L C, Davide, L M C, Mendes-Costa, M C, Schwan, R F and Wheals, A E.** (2004). Conidial anastomosis fusion between *Colletotrichum* species. *Mycological Research*. 108 (11): 1320-1326.
- Romero, D, de Vicente, A, Rakotoaly, R H, Dufour, S E, Veening, J, Arrebola, Cazorla, F M, Kuipers, O P, Paquot, M and Pérez-García, A.** (2007). The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*. 20(4): 430-440.
- Ron, E Z and Rosenberg, E.** (2001). Natural role of biosurfactans. *Environmental Microbiology*. 3(4): 229-236.
- Shankar-Singh, J, Chandra-Pandey, V and Singh, D P.** (2011). Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 140(3-4): 339-353.
- Stein, T.** (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*. 56(4): 845-857.
- Sela-Buurlage, M B, Epstein, L and Rodríguez, R J.** (1991). Adhesion of ungerminated *Colletotrichum musae* conidia. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 39(5): 345-352.
- Serrano-Carreón, L, Balderas-Ruíz, K A, Wong-Urrea, M A and Galindo-Fentanes, E.** (2010). Biofungicidas para el control de la antracnosis del mango: logrando frutos de alta calidad internacional para mercados exigentes. *Claridades Agropecuarias*. 208: 28-37.
- Serrano-Carreón, L and Galindo-Fentanes, E.** (2007). Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. *Ciencia*. Enero-Marzo (2007): 77-88.
- Slade, S J, Haris, R F, Smith, C S and Andrews, J H.** (1987). Microcycle conidiation and spore-carrying capacity of *Colletotrichum gloeosporioides* on solid media. *Applied and Environmental Microbiology*. 53(9): 2106-2110.
- Sleppcky, R A and Hemphill, H E.** (2006). The genus *Bacillus*-nonmedical. *Prokaryotes*. 4:530-562.
- Solis-Arcos, Y.** (2010). Identificación parcial de antibióticos ciclo-lipopéptidicos termorresistentes producidos por *Bacillus subtilis* 83 con actividad antifúngica contra *Fusarium spp.* Tesis de Licenciatura en Ingeniería Química. Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos.
- Stein, T.** (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*. 56(4): 845-857.
- Templeton, M D, Sharrock, K R, Bowen, J K, Crowhurst, R N, and Rikkerink, E H A.** (1994). The pectin lyase-encoding gene (*pnl*) family from *Glomerella cingulata*: Characterisation of *pnlA* and its expression in yeast. *Gene*. 142(1): 141-146.
- Tendulkar, S R, Saikumari, Y K, Patel, V, Raghotama, S, Munshi, T K, Balaram, P, and Chattoo, B B.** (2007). Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen *Magnaporthe grisea*. *Journal of Applied Microbiology*. 103(6): 2331-2339.
- Thasana, N, Prapagdee, B, Rangkadilok, N, Sallabhan, R, Aye, S L, Ruchirawat, S, and Loprasert, S.** (2010). *Bacillus subtilis* SSE4 produces subtilene A, a new lipopeptide antibiotic possessing an unusual C₁₅ unsaturated β-amino acid. *FEBS Letters*. 584(14): 3209-3214.
- Toymentseva, A A and Sharipova, M R.** (2012). Genetic mechanisms of Bacilli adaptation. *Microbiology*. 3: 257-270.
- Tsuge, K, Akiyama, T, and Shoda, M.** (2001). Cloning, sequencing, and characterization of the Iturin A operon. *Journal of Bacteriology*. 183(21): 6265-6273.

- Vlamakis, H, Chai, Y, Beauregard, P, Losick, R and Kolter, R.** (2013). Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nature Reviews*. 11: 157-168.
- Vranakis I, Goniotakis I, Psaroulaki A, Sandalakis V, Tselentis Y, Gevaert K and Tsiotis G.** 2014. Proteome studies of bacterial antibiotic resistance mechanisms. *Journal of Proteomics*. 97: 88-99.
- Venegas-Brito, Margarita.** (2015). Evaluación de los factores de antagonismo de un fungicida comercial a base de *Bacillus* sp. 83 contra la antracnosis del mango. *Tesis de licenciatura en Ingeniería en Biotecnología*. Universidad Politécnica del Estado de Morelos. Jiutepec, Morelos.
- Volpon, L, Tsan, P, Majer, Z, Vass, E, Hollósi, M, Noguéra, V, Lancelin, J-M and Besson, F.** (2007). NMR structure determination of a synthetic analogue of bacillomycin Lc reveals the strategic role of L-Asn1 in the natural iturinic antibiotics. *Spectrochimica Acta*. 67(5): 1374-138.
- Walton, R B and Woodruff, HB.** (1949). A crystalline antifungal agent, mycosubtilin, isolated from subtilin broth. *The Journal Clinical Investigation*. 28: 924-926.
- Wattad, C, Kobiler, D, Dinoor, A, and Prusky, D.** (1997). Pectate lyase of *C. gloeosporioides* attacking avocado fruit: cDNA cloning and involvement in pathogenicity. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 50(3): 197-212.
- Weir, B S, Johnston, P R and Damm, U.** (2012). The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology*. 73(1): 115-180.
- Yakimov, M M, Timmis, K N, and Wray, V.** (1995). Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(5): 1706-1713.
- Yáñez-Mendizábal, V, Zeriuoh, H, Viñas, I, Torres, R, Usall, J, de Vicente, A, Pérez-García and Teixidó, N.** (2011). Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides. *European Journal of Plant Pathology*. 132(4): 609-619.
- Yang, S Z, Wei, D Z, and Mu, B Z.** (2006). Determination of the amino acid sequence in a cyclic lipopeptide using MS with DHT mechanism. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 68(1): 69-74.
- Yang, S Z, Wei, D Z, and Mu, B Z.** (2007). Determination of the structure of the fatty acid chain in a cyclic lipopeptide using GC-MS. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 70(3): 519-523.
- Yu, X, Ai, C, Xin, L, and Zhou, G.** (2011). The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology*. 47(2): 138-145.
- Yu, G, Sinclair, J, Hartman, G, and Bertagnolli, B L.** (2002). Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology and Biochemistry*. 34(7): 955-963.
- Zeriuoh, H, Romero, D, García-Gutiérrez, L, Cazorla, F M, de Vicente, A and Pérez-García, A.** (2011). The iturin-like lipopeptides are essential components in the biological control arsenal of *Bacillus subtilis* against bacterial diseases of cucurbits. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*. 24(12): 1540-1552.
- Zhao, P, Quan, C, Wang, Y, Wang, J, and Fan, S.** (2012). *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 as a potential biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae*. *Journal of Basic Microbiology*. 54(5): 448-456.
- Zhang, S, Wang, Y, Meng, L, Li, J., Zhao, X, Cao, X, Chen, X L, Wang, A-X and Li, J.** (2012). Isolation and characterization of antifungal lipopeptides produced by endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* TF28. *African Journal of Microbiology Research*. 6(8): 1747-1755.
- Zhao, X, Zhou, Z, Han, Y, Wang, Z, Fan, J and Xiao, H.** (2013). Isolation and identification of antifungal peptides from *Bacillus* BH072, a novel bacterium isolated from honey. *Microbiological Research*. 168(9): 598-606.
- Zhu, C, Yu, Z and Sun, M.** (2006). Restraining *Erwinia* virulence by expression of n-acyl homoserine lactonase gene *pro3A-aiiA* in *Bacillus thuringiensis* Subsp *leesis*. *Biotechnology and Bioengineering*. 95(3): 526-532.

IX. ANEXOS

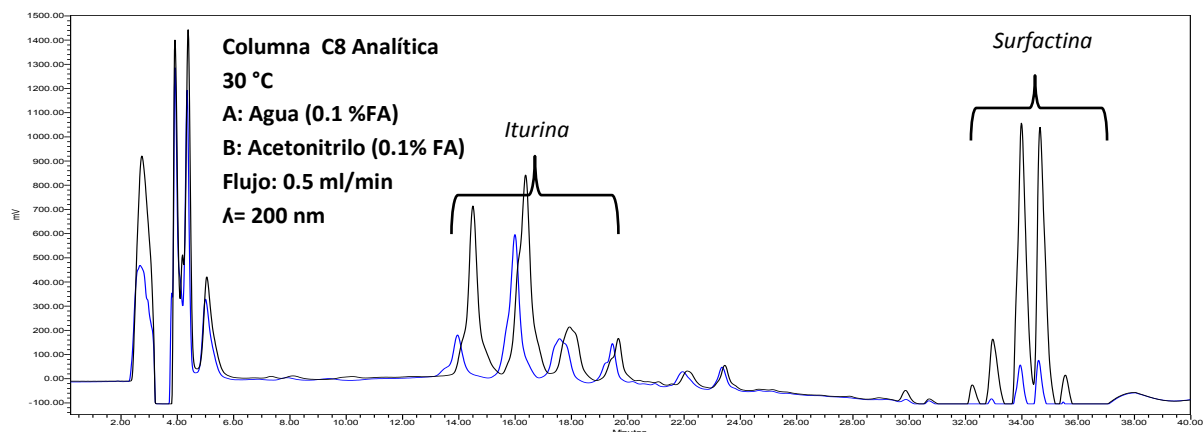


Figura A1. Detección cualitativa de iturina y surfactina mediante PR-HPLC, en caldos de cultivo de *Bacillus subtilis* 83. Línea negra (extracto metanólico+estándares) y línea azul (extracto metanólico). El gradiente de la fase móvil fue el mismo que el utilizado durante la RP-HPLC (Etapa 1).

Cuadro A1. Tabla de rendimientos de purificación de los homólogos de bacilomicina D.

Operación	Muestras obtenidas	μL^1	X_{REAL}^2	X_{EXP}^3	% inhibición		% REN ⁷
					X^5	σ^6	
Biorreacción	Sobrenadante	50	1	1	47.7	5.1	100
	Sobrenadante	80	1	1	52.3	8.2	100
Ultrafiltración	$x > 100$ kDa	80	8	1	42.5	8.0	89
	$100 > x > 10$ kDa	80	15	1	1.6	2.8	3
	$10 > x > 3$ kDa	80	20	1	1.6	2.8	3
	$x < 3$ kDa	80	1	1	1.5	5.1	3
Extracción	$x > 100$ kDa, pH=2, MeOH	80	6	1	39.9	10.2	84
Evaporación	A) $x > 100$ kDa, pH=2, MeOH, 65 °C	50	50	50	74.6	4.1	
	B) $x > 100$ kDa, pH=2, MeOH, 65 °C	50	50	1	23.2	*	49
RP-HPLC 1	$x > 100$ kDa, pH=2, MeOH, 65 °C, Fracción 1 (6-15 min)	50	562	50	0.0	0.0	0
	$x > 100$ kDa, pH=2, MeOH, 65 °C, Fracción 2 (15-23 min)	50	188	50	0.0	0.0	0
	$x > 100$ kDa, pH=2, MeOH, 65 °C, Fracción 3 (23-34 min)	50	375	50	81.0	2.6	53
	$x > 100$ kDa, pH=2, MeOH, 65 °C, Fracción 4 (34-40 min)	50	563	50	7.5	5.2	5
RP-HPLC 2	$x > 100$ kDa, pH=2, MeOH, 65 °C, Fracción 3 (15-23 min), Pico 5	50	300	50	65.3	7.5	43
	$x > 100$ kDa, pH=2, MeOH, 65 °C, Fracción 3 (15-23 min), Pico 7	50	300	50	26.5	13.1	17
	$x > 100$ kDa, pH=2, MeOH, 65 °C, Fracción 3 (15-23 min), Pico 8	50	300	50	43.3	0.7	28
	$x > 100$ kDa, pH=2, MeOH, 65 °C, Fracción 3 (15-23 min), Pico 9	50	300	50	51.2	0.5	33
	$x > 100$ kDa, pH=2, MeOH, 65 °C, Fracción 3 (15-23 min), Pico 14	50	300	50	55.0	2.0	36
	$x > 100$ kDa, pH=2, MeOH, 65 °C, Fracción 3 (15-23 min), Pico 15	50	300	50	56.0	0.0	36

1_/ Volumen de muestra empleado para el ensayo de inhibición.

2_/ Relación en v/v de la muestra obtenida durante la operación con respecto a la muestra original.

3_/ Relación en v/v de la muestra obtenida con respecto a la muestra original empleada durante el ensayo de inhibición.

5_/ Media aritmética de las tres réplicas de % de inhibición.

6_/ Desviación estándar de las réplicas.

7_/ % de rendimiento con respecto a la muestra original.

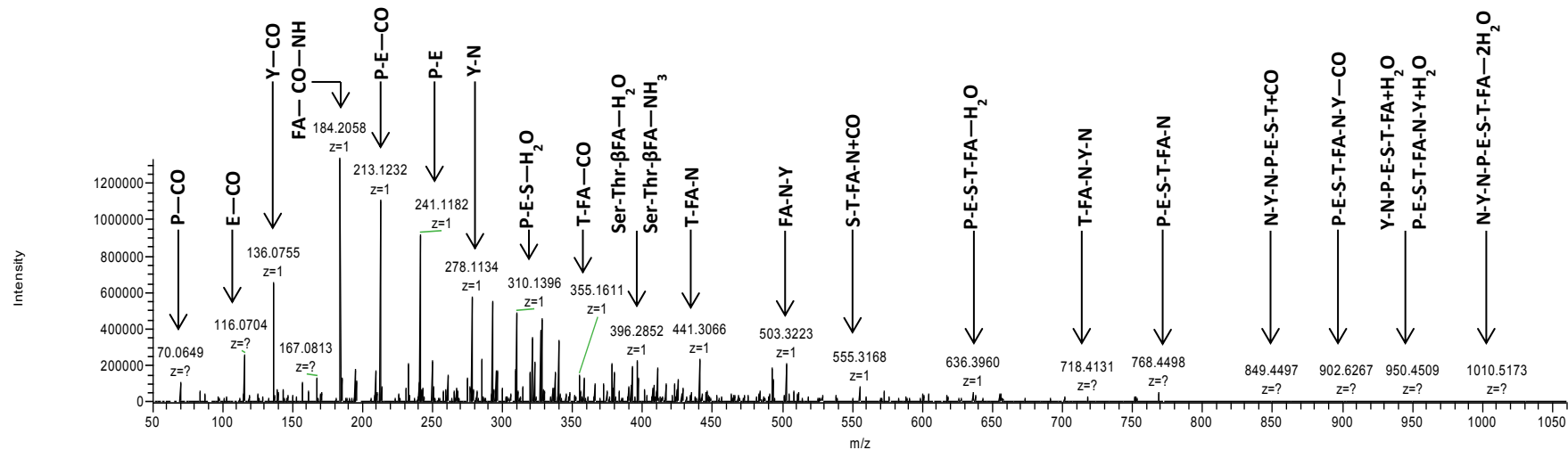


Figura A2. Espectro ESI-MS/MS a partir de un ión precursor m/z 1045, correspondiente a bacilomicina D C₁₄ (Pico 5).

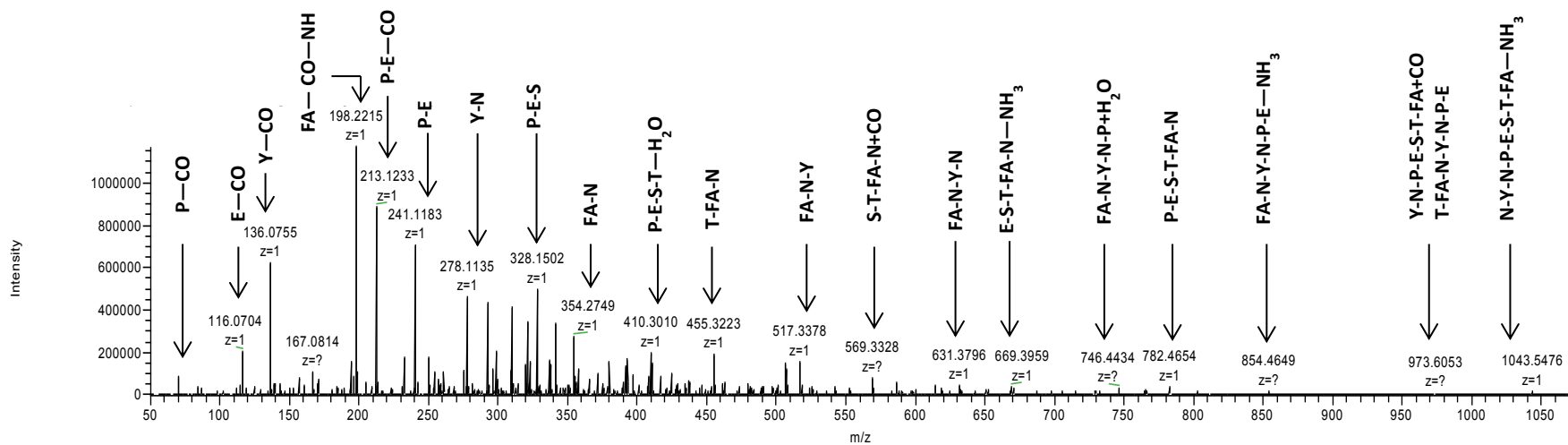


Figura A3. Espectro ESI-MS/MS a partir de un ión precursor m/z 1059, correspondiente a bacilomicina D C₁₅ (Pico 7).

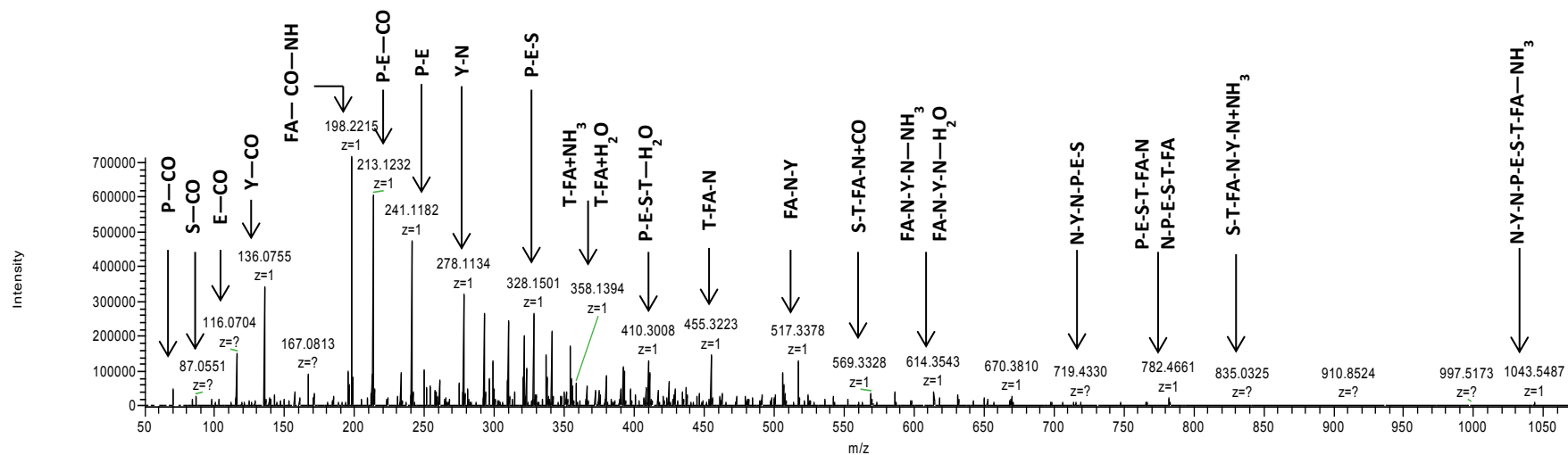


Figura A4. Espectro ESI-MS/MS a partir de un ión precursor m/z 1059, correspondiente a baclosporina D C₁₅ (Pico 8).

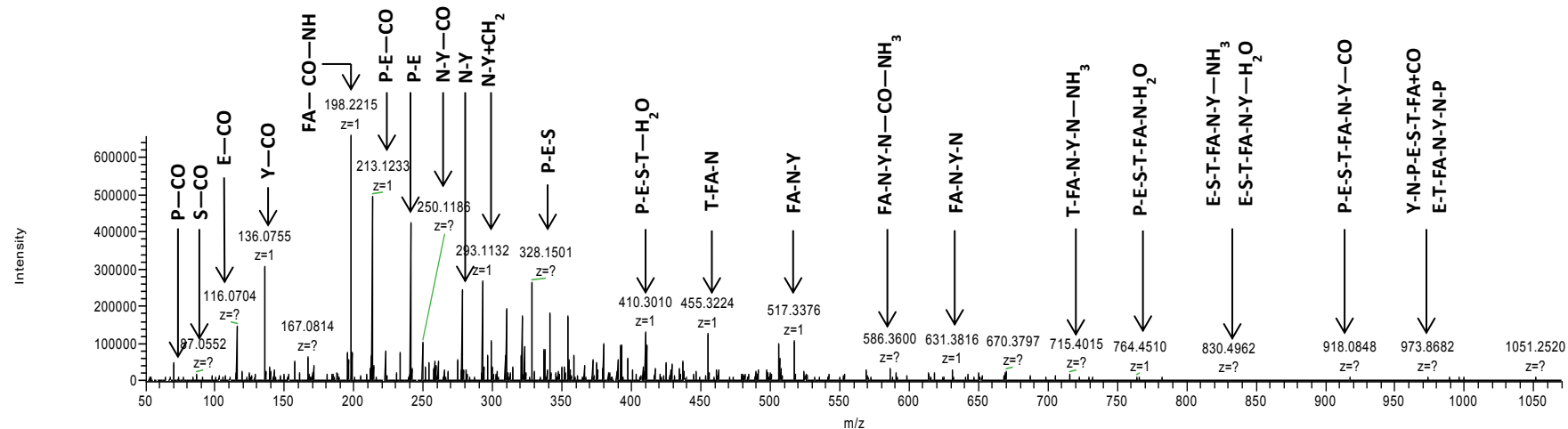


Figura A5. Espectro ESI-MS/MS a partir de un ión precursor m/z 1059, correspondiente a baclosporina D C₁₅ (Pico 9).

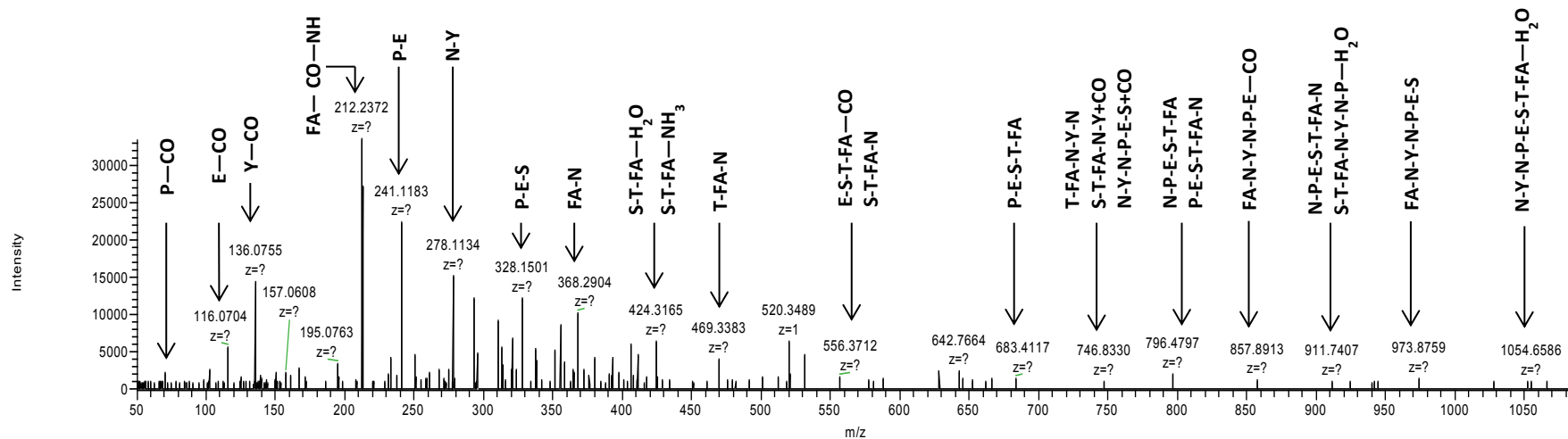


Figura A6. Espectro ESI-MS/MS a partir de un ión precursor m/z 1073, correspondiente a baclofen D C₁₆ (Pico 14).

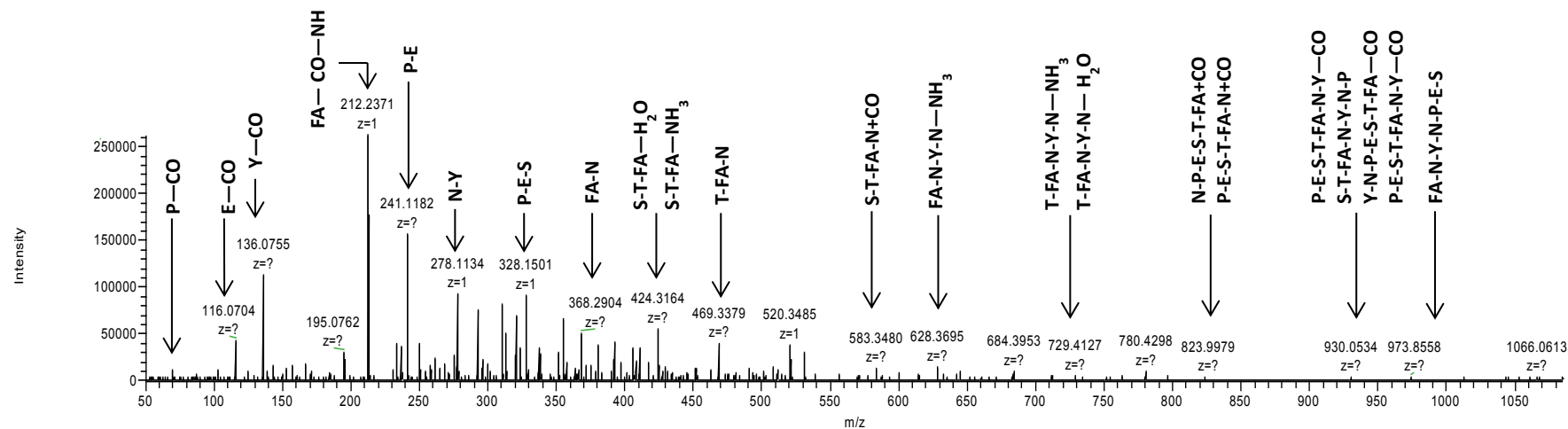


Figura A7. Espectro ESI-MS/MS a partir de un ión precursor m/z 1073, correspondiente a baclofen D C₁₆ (Pico 15).

Cuadro A2. Secuencias peptídicas, quiralidad y pesos moleculares para ciclolipopéptidos reportados.

Familia	Secuencia ^{1/}	Quiralidad ^{2/}	WM _{PEP} ^{3/}	WP _{PEP COMPLETO} ^{4/}						
				C _{11β-A}	C _{12β-A}	C _{13β-A}	C _{14β-A}	C _{15β-A}	C _{16β-A}	C _{17β-A}
Iturinas										
Bacilomicina D	NYN PEST	L-D-D-L-L-D-L	823.80	988.8	1002.8	1016.8	1030.8	1044.8	1058.8	1072.8
Bacilomicina F	NYN QPNT	L-D-D-L-L-D-L	849.80	1014.8	1028.8	1042.8	1056.8	1070.8	1084.8	1098.8
Bacilomicina L	DYNSQST	L-D-D-L-L-D-L	813.70	978.7	992.7	1006.7	1020.7	1034.7	1048.7	1062.7
Bacilomicina LC	NYN SEST	L-D-D-L-L-D-L	813.70	978.7	992.7	1006.7	1020.7	1034.7	1048.7	1062.7
Iturina A	NYN QPNS	L-D-D-L-L-D-L	835.80	1000.8	1014.8	1028.8	1042.8	1056.8	1070.8	1084.8
Iturina A _L	NYN QPNS	L-D-D-L-L-D-L	835.80	1000.8	1014.8	1028.8	1042.8	1056.8	1070.8	1084.8
Iturina C	NYN QPNS	L-D-D-L-L-D-L	835.80	1000.8	1014.8	1028.8	1042.8	1056.8	1070.8	1084.8
Iturina D	DYDEPDS	L-D-D-L-L-D-L	839.70	957.8	971.8	985.8	999.8	1013.8	1027.8	1041.8
Micosubtilina	NYN QPSA	L-D-D-L-L-D-L	792.80	1004.7	1018.7	1032.7	1046.7	1060.7	1074.7	1088.7
Fengicinas										
Fengicina A	E(Orn)YTE APQYI	L-D-D- D -L-D-L-L-L-L	1145.72	1392.72	1406.72	1420.72	1434.72	1448.72	1462.72	1476.72
Fengicina B	E(Orn)YTE VPQYI	L-D-D- D -L-D-L-L-L-L	1173.78	1420.78	1434.78	1448.78	1462.78	1476.78	1490.78	1504.78
Plipastatina A	E(Orn)YTE APQYI	L-D-D- L -L-D-L-L-D-L	1145.72	1392.72	1406.72	1420.72	1434.72	1448.72	1462.72	1476.72
Plipastatina B	E(Orn)YTE VPQYI	L-D-D- L -L-D-L-L-D-L	1173.78	1420.78	1434.78	1448.78	1462.78	1476.78	1490.78	1504.78

1_/ Secuencia de la parte peptídica del ciclolipopéptido, indicándose en rojo los residuos variables entre los miembros de la familia.

2_/ Quiralidad de la parte peptídica del ciclolipopéptido, indicándose en rojo aquellos que son variables.

3_/ Peso molecular de la parte peptídica.

4_/ Peso molecular total del ciclolipopéptido (parte peptídica + cadena de ácido graso β-aminado).

*El peso molecular para cada lipopéptido se obtuvo a partir de las secuencias reportadas por Ongena y Jacques (2007)

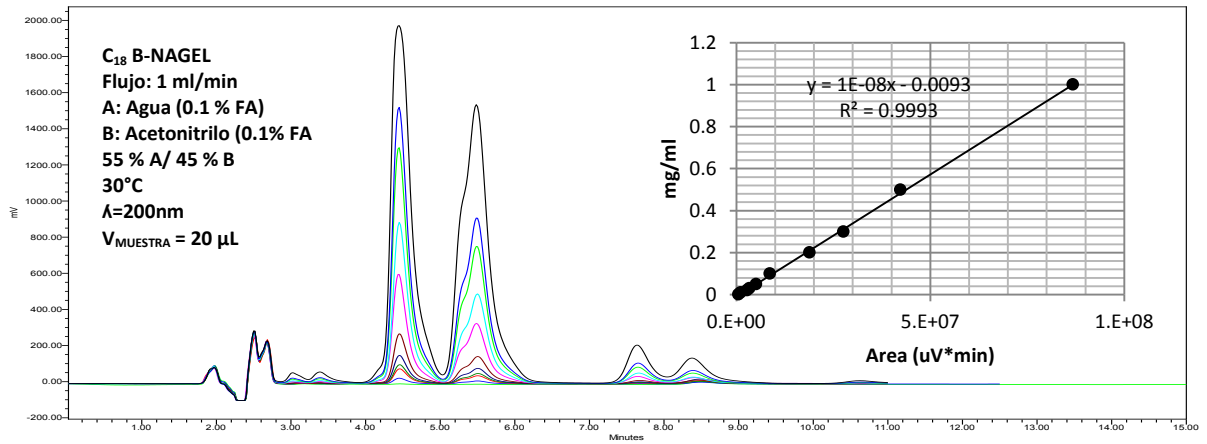


Figura A8. Curva de calibración para la cuantificación de iturinas. El cromatograma muestra la mezcla de iturinas de *B. subtilis* de SIGMA.

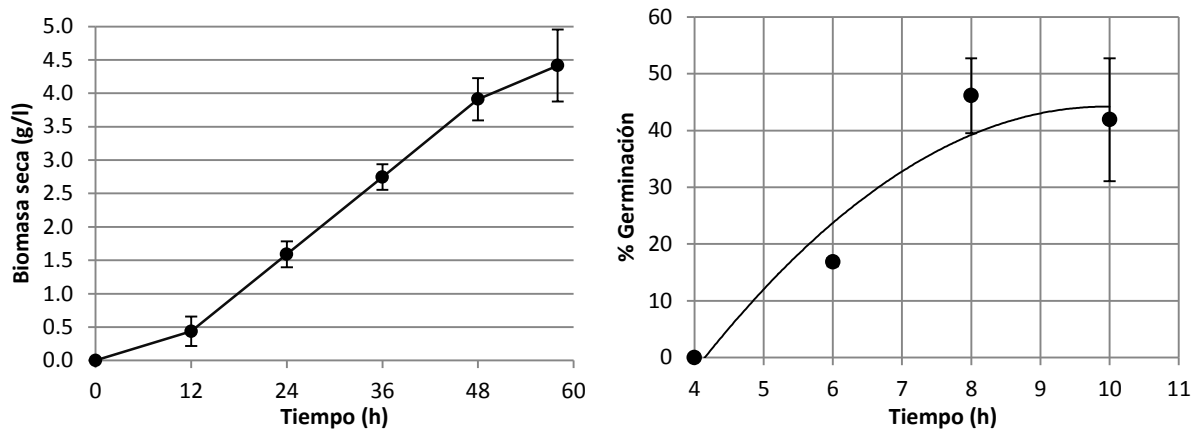


Figura A9. Cinética de crecimiento y germinación de *Colletotrichum gloeosporioides* 09 en matraces agitados. 29 °C, 120 rpm, $V_t = 10$ ml, caldo de papa y dextrosa (PDB) y 2×10^5 esporas/ml a t_0 .

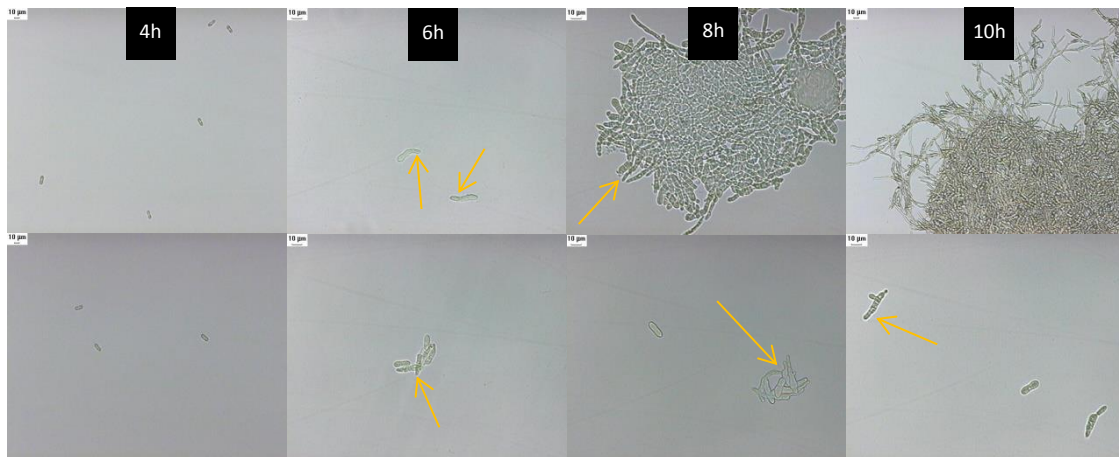


Figura A10. Agregación de esporas durante la germinación de *Colletotrichum gloeosporioides* 09 en medio líquido PDB. 29 °C, 120 rpm, $V_t = 10$ ml, caldo de papa y dextrosa (PDB) y 2×10^5 esporas/ml a t_0 . Flechas amarillas indican ejemplos de esporas germinadas.

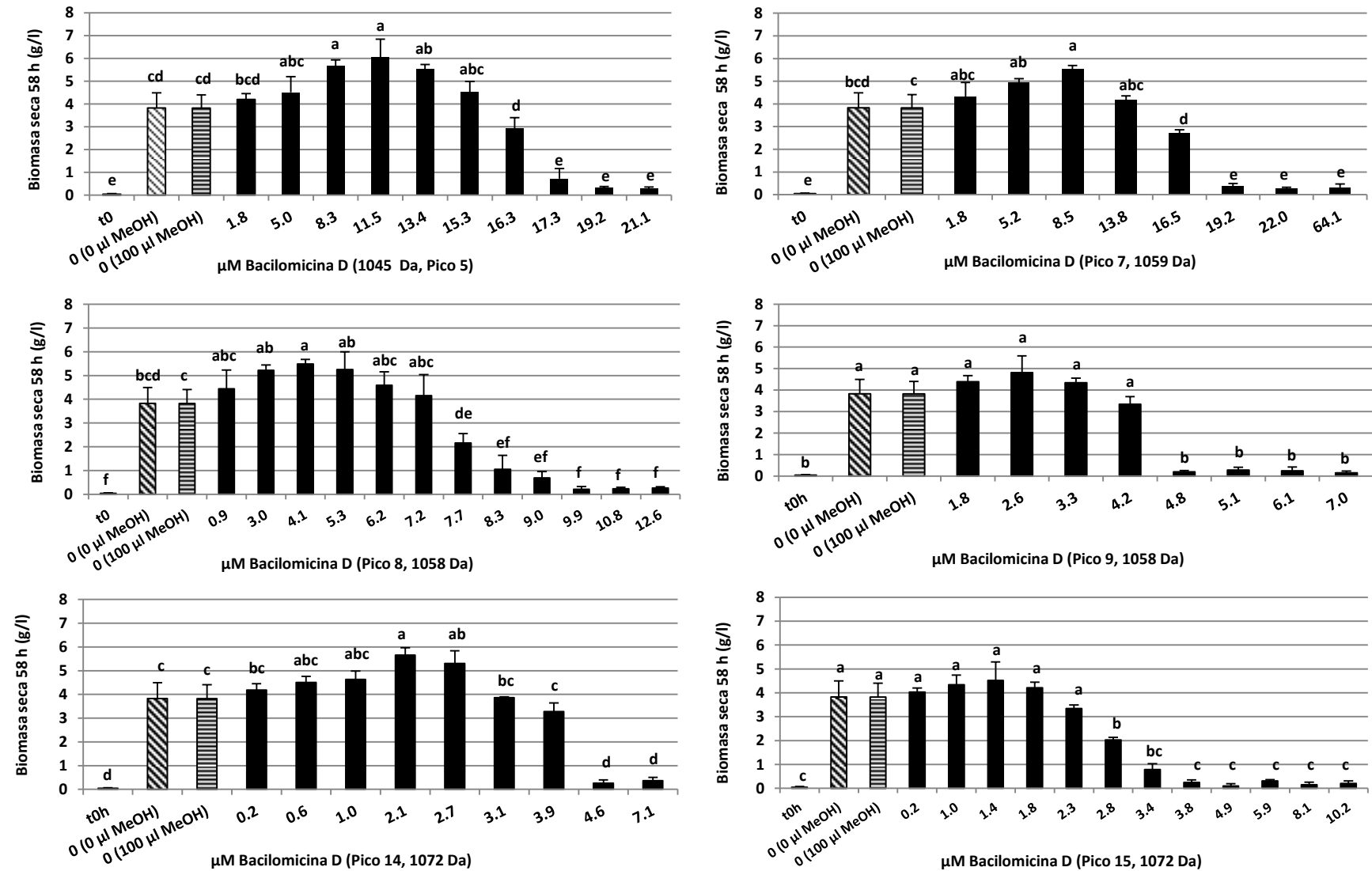


Figura A11. Ensayo de actividad antifúngica para los homólogos de bacilomicina D, a partir de un inóculo de esporas. t_0 corresponde al peso seco de esporas al inicio del experimento, "0 (0 μl MeOH)" y "0 (100 μl MeOH)" corresponden a un control absoluto y un control negativo. Los distintos tratamientos fueron diluidos en 100 μl de MeOH. Literales distintas entre tratamientos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) de acuerdo a prueba HSD de Tukey.

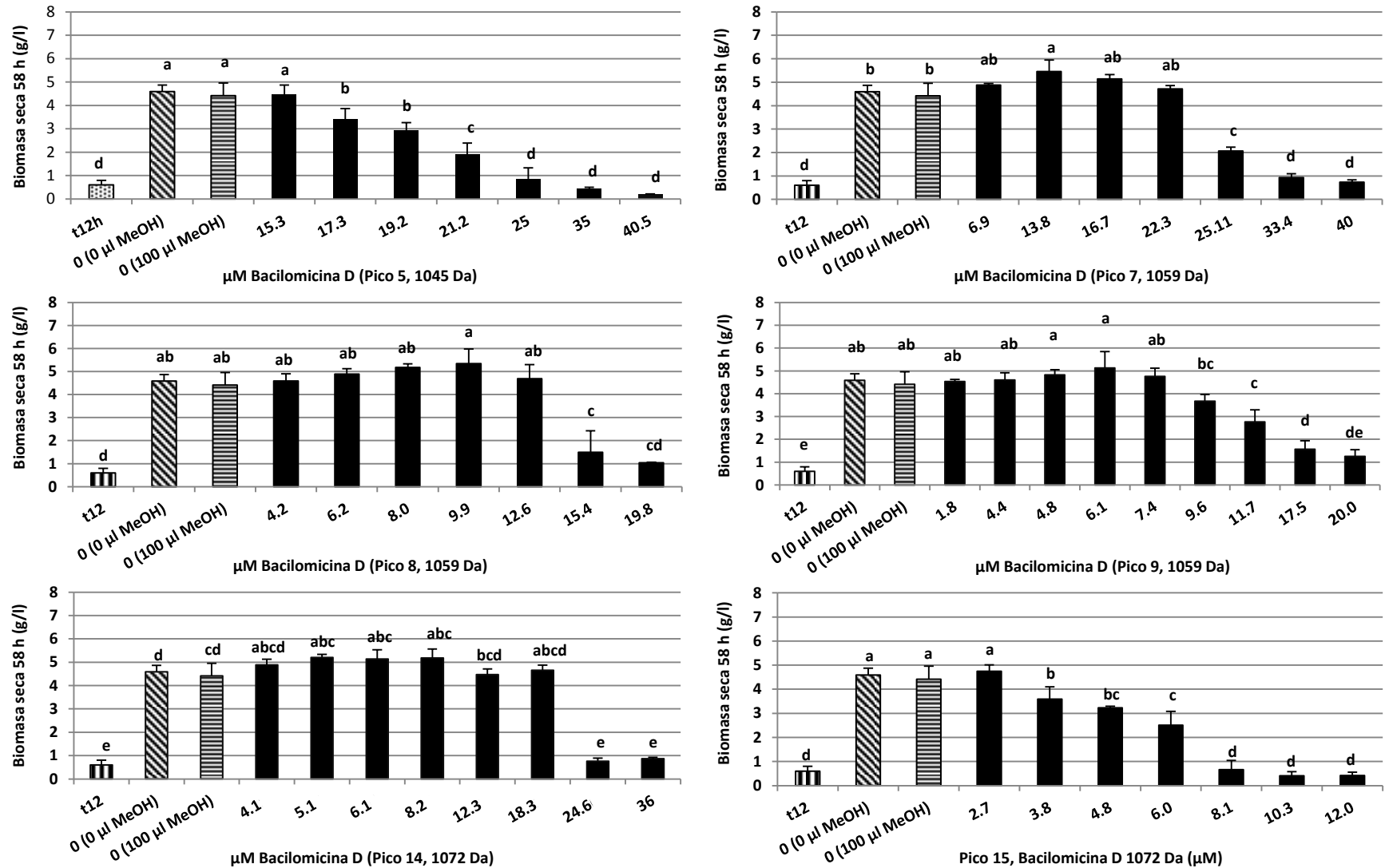


Figura A12. Ensayo de actividad antifúngica para los homólogos de bacilomicina, a partir de un inóculo de micelio. t₁₂ corresponde al peso seco del micelio al momento de la adición de los distintos homólogos, "0 (0 μl MeOH)" y "0 (100 μl MeOH)" corresponden a un control absoluto y un control negativo. Los distintos tratamientos fueron diluidos en 100 μl de MeOH. Literales distintas entre tratamientos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) de acuerdo a prueba HSD de Tukey.

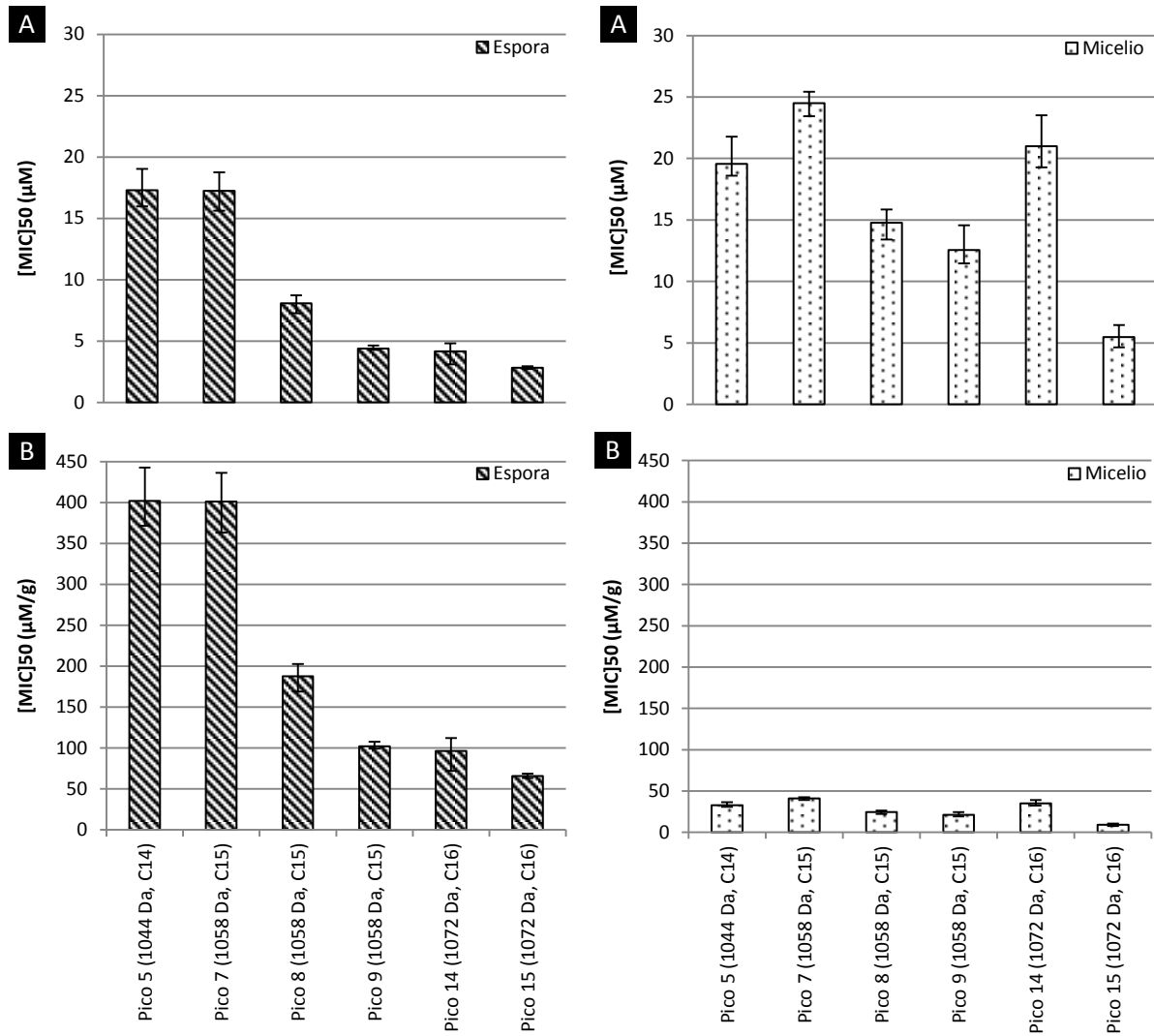


Figura 13A. Concentración inhibitoria 50 para distintos homólogos de bacilomicina D C₁₄₋₁₆ de *Bacillus* sp. 83 para inhibir el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* 09. A. IC₅₀ volumétricas, B. IC₅₀ específica.

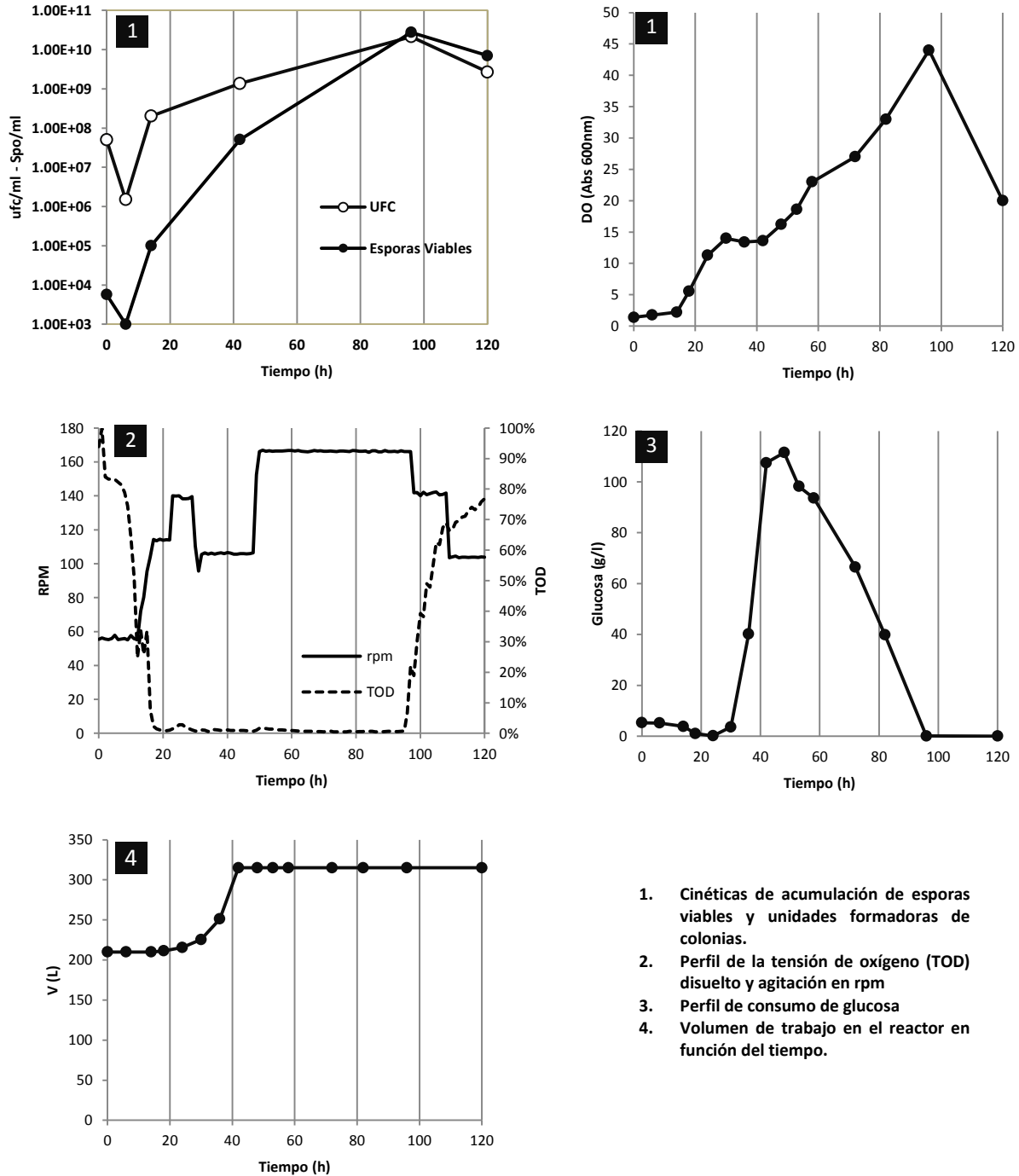


Figura A14. Fermentación de *Bacillus* sp. 83 para la producción de esporas y metabolitos secundarios en medio mineral. A partir de 10 l de *Bacillus* sp.83 propagado en medio YPG, en un reactor agitado ($V_{\max}= 14$ L) a 230 rpm y 30 °C, se inoculó un reactor tanque tipo agitado de 500 l de capacidad máxima; el cual contenía 230 l de medio mineral a 30 °C. Los periodos de tiempo 0-6 h, 6-35 h y 35-120 h corresponden a etapas lote, alimentado exponencialmente (con una solución de glucosa a 500 g/l) y lote, respectivamente. El pH se mantuvo a 6.5 mediante un control con NaOH al 50% p/v. **Datos proporcionados por Cristiano-Fajardo (2012).**