



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis

“Estudio de la esporulación y la producción de bacilomicina D y ácido poli- γ -glutámico en *Bacillus velezensis* 83 mediante cultivos elicitados”

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

IBQ. Oscar Andres Rodriguez Ochoa

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Enrique Galindo Fentanes, IBt UNAM

COMITÉ TUTORAL:

Dr. José Adelfo Escalante Lozada, IBt UNAM

Dr. Ángel Arturo Guevara García, IBt UNAM

Cuernavaca, Morelos

Noviembre 2021



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.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Enrique Galindo Fentanes. Durante el periodo de ejecución de este trabajo, se contó con el apoyo económico del proyecto DGAPA IG200618 y de la beca de maestría CONACyT (No. de registro 884716).

DEDICATORIA

A mis padres, María del Carmen y Jesús Antonio

por su amor y apoyo incondicional.

A mi hermana, Sonia

por ser mi amiga y confidente.

A mi familia y mis amigos

por su cariño y compañía

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Enrique Galindo Fentanes**, por permitirme formar parte de su grupo de investigación, por su dirección y enseñanzas. Gracias por la confianza y la oportunidad de trabajar en este proyecto.

A la **Dra. Celia Flores Ocampo**, por sus valiosos consejos, su paciencia y su compañía durante mi trayecto. Sus aportaciones y apoyo moral fueron vitales para este proyecto, por eso, gracias.

A los miembros de mi comité tutorial:

Dr. José Adelfo Escalante Lozada

Dr. Ángel Arturo Guevara García

por sus efectivas observaciones y comentarios.

A la **Dra. Tania Castillo** y **Diego Ramos** por la capacitación del equipo RAMOS.

A los amigos y compañeros que llegaron en esta travesía, **Xaira, Cat, Connie, Nahyeli, Tomás, Holjes, Beto, Chris, Thelma, Karla, Andrés y César**.

A **Sergio** y **Agustín** por su apoyo en la fase experimental de este proyecto.

Al **equipo de la planta piloto** del IBt, por permitirme usar los aparatos que necesitaba.

Al grupo del Dr. Galindo, al laboratorio 10, muchas gracias, compañeros.

Índice General

Índice General	i
Índice de Figuras	iii
Índice de Tablas	iv
ABREVIATURAS	vi
RESUMEN.....	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Control biológico, una alternativa frente a fitopatógenos.....	3
2.2. <i>Bacillus velezensis</i> 83, agente de control biológico.....	4
2.3. Esporas de <i>B. velezensis</i> 83 como principio activo en <i>Fungifree AB</i> [®]	6
2.4. El ácido poli- γ -glutámico como metabolito de interés en el control biológico	8
2.5. Bacilomicina D como componente de interés en biofungicida.....	10
2.6. Elicitación, estrategia para la producción de metabolitos secundarios.....	13
2.7. <i>Bacillus</i> spp. en modelos de cultivos elicitados	16
3. HIPÓTESIS	21
4. OBJETIVOS.....	22
4.1. Objetivo general	22
4.2. Objetivos específicos.....	22
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	23
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
6.1. Materiales.....	25
6.1.1. Microorganismos.....	25
6.1.2. Medios de cultivo	25
6.2. Producción de micelio de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	27

6.3.	Desarrollo de los cultivos elicitados.....	28
6.3.1.	Activación de la bacteria <i>B. velezensis</i> 83 y desarrollo de inóculos.....	28
6.3.2.	Cultivos en matraces agitados.....	29
6.3.3.	Monitoreo de actividad respiratoria en línea.....	29
6.4.	Métodos analíticos.....	32
6.4.1.	Cinética de crecimiento vegetativo.....	32
6.4.2.	Porcentaje de esporulación y concentración de esporas.....	34
6.4.3.	Determinación de consumo de sustrato.....	36
6.4.4.	Determinación de producción de ácido acético, acetoina y butanodiol.....	38
6.4.5.	Determinación de γ -PGA.....	39
6.4.6.	Determinación de bacilomicina D.....	39
6.4.7.	Determinación de consumo de sulfato de amonio.....	40
6.4.8.	Análisis estadístico.....	41
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
7.1.	Caracterización del cultivo “control” y el cultivo con solución modelo de <i>Bacillus velezensis</i> 83.....	42
7.2.	Cultivos elicitados con micelio inactivo de <i>C. gloeosporioides</i>	46
7.3.	Cultivos elicitados con α -celulosa y arabinogalactano (polisacáridos componentes de pared celular vegetal).....	49
7.4.	Evaluación de cultivos con dos elicitores simultáneos (micelio inactivo y arabinogalactano).	53
7.5.	Comparación de los diferentes cultivos elicitados.....	56
8.	CONCLUSIÓN.....	59
9.	PERSPECTIVAS.....	60
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	61
11.	ANEXOS.....	70

Índice de Figuras

Figura 2-1. Etapas de esporulación.....	7
Figura 2-2. Ejemplos representativos de las familias lipopeptídicas de <i>Bacillus velezensis</i>	11
Figura 2-3. Esquema del <i>cross-talk</i> en un microambiente.....	15
Figura 5-1. Esquema de estrategia experimental desarrollada para la evaluación de elicitores	24
Figura 6-1 Equipo de sistema de monitoreo de actividad respiratoria (RAMOS).....	30
Figura 6-2 Matraz empleado en el equipo RAMOS	30
Figura 6-3 Esquema de ciclo de medición del equipo RAMOS	31
Figura 6-4 Cámara Neubauer.....	34
Figura 6-5 Tinción de <i>B. velezensis</i> 83.....	35
Figura 7-1. Caracterización cinética de <i>B. velezensis</i> 83 en cultivos control y con solución modelo de exudados sintéticos	43
Figura 7-2. Caracterización cinética de <i>B. velezensis</i> 83 en cultivos con micelio inactivo de <i>C. gloeosporioides</i>	47
Figura 7-3. Caracterización cinética de <i>B. velezensis</i> 83 en cultivos con polisacáridos....	52
Figura 7-4. Caracterización cinética de <i>B. velezensis</i> 83 en cultivos con dos elicitores simultáneos	54
Figura 7-5. Producción de metabolitos en cultivos de <i>B. velezensis</i> 83 con dos elicitores simultáneos	55
Figura 7-6. Evolución de concentración de esporas.....	57
Figura A-1. Curva de calibración de acetoina.....	70
Figura A-2. Curva de calibración de butanodiol.....	71

Figura A-3. Curva de calibración de glucosa	71
Figura A-4. Curva de calibración de fructosa.....	72
Figura A-5. Curva de calibración de ácido cítrico	72
Figura A-6. Curva de calibración de ácido láctico.....	73
Figura A-7. Curva de calibración de ácido succínico	73
Figura A-8. Curva de calibración para γ -PGA.....	74
Figura A-9. Curva de calibración para bacilomicina D	74
Figura A-10. Curva de calibración para sulfato de amonio	75
Figura A-11. Evolución del pH en los diferentes cultivos.	75
Figura A-12. Consumo de sulfato de amonio.	76
Figura A-13. Producción de acetoina y butanodiol.	76
Figura A-14. Producción de ácido acético.	77
Figura A-15. Velocidad de transferencia de CO ₂	77
Figura A-16. Coeficiente respiratorio.	78

Índice de Tablas

Tabla 2-1 Efecto de polisacáridos derivados de plantas como elicitores en la producción de surfactina (mg/L) en cultivos de <i>B. amyloliquefaciens</i>	18
Tabla 2-2 Efecto de co-cultivos de <i>Bacillus</i> con hongos patógenos sobre la producción de lipopéptidos	19
Tabla 6-1 Composición de agar YPG	25
Tabla 6-2 Composición del medio mineral utilizado en los cultivos de <i>B. velezensis</i> 83 ...	26
Tabla 6-3 Solución modelo del exudado sintético	27
Tabla 6-4 Tiempos de retención para cada sustrato	37
Tabla 7-1 Concentraciones máximas de esporas y productividad.....	57

Tabla A-1 ANOVA de un solo factor de velocidad de crecimiento	78
Tabla A-2 Agrupación de medias de velocidad de crecimiento por método de Tuckey.....	79
Tabla A-3 ANOVA de un solo factor de concentración máxima de bacilomicina.....	79
Tabla A-4 Agrupación de medias de concentración máxima de bacilomicina por método de Tuckey	79
Tabla A-5 ANOVA de un solo factor de VTO máxima	80
Tabla A-6 Agrupación de medias de VTO máxima por método de Tuckey	80
Tabla A-7 ANOVA de un solo factor de concentración máxima de esporas.....	80
Tabla A-8 ANOVA de un solo factor de productividad de esporas	81
Tabla A-9 ANOVA de un solo factor de concentración máxima de γ -PGA.....	81
Tabla A-10 Agrupación de medias de concentración máxima de γ -PGA por método de Tuckey	81
Tabla A-11 ANOVA de un solo factor de peso molecular de γ -PGA.....	82
Tabla A-12 Agrupación de medias de peso molecular de γ -PGA por método de Tuckey .	82
Tabla A-13 ANOVA de un solo factor de concentración de células.....	82
Tabla A-14 Agrupación de medias de concentración de células por método de Tuckey...	83

ABREVIATURAS

γ -PGA	Ácido poli- γ -glutámico
ACB	Agente de control biológico
cLP	Lipopéptido cíclico
G+C	Guanina y citosina
GL	Grados libertad
kDa	Kilodáltones
mM	Milimolar
NRPS	Péptido sintetasa no ribosomal
PDA	Agar papa dextrosa
PDB	Caldo papa dextrosa
PGPB	Bacteria promotora de crecimiento de plantas
PM	Peso molecular
VTO	Velocidad de transferencia de oxígeno
VTO _{max}	Velocidad de transferencia de oxígeno máxima
YPG	Medio levadura – peptona – glucosa

RESUMEN

Bacillus velezensis 83 es una bacteria que resulta de interés como agente de control biológico, por su capacidad de formar esporas termorresistentes, producir *biofilms* y sintetizar metabolitos secundarios con actividad biológica. Dentro de estos metabolitos destaca la bacilomicina D, un lipopéptido antifúngico miembro de la familia de las iturinas; que además de su actividad antifúngica, tiene un papel importante en la formación de *biofilms*. Por otra parte, el polímero ácido poli- γ -glutámico (γ -PGA) es un metabolito que contribuye en la robustez y complejidad estructural del *biofilm*. La producción de estos metabolitos se puede ver comprometida bajo condiciones de laboratorio. La elicitación de cultivos es una estrategia efectiva para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivos celulares.

El objetivo de este trabajo fue evaluar diferentes elicitores sobre la esporulación y la producción de bacilomicina D y γ -PGA en cultivos de *B. velezensis* 83 en matraces agitados. Estos elicitores consistieron en una solución modelo de exudados sintéticos (formulación de azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos en base a la composición de exudados de raíces de plantas), micelio inactivo de *Colletotrichum gloeosporioides* y polisacáridos de pared celular vegetal.

En una primera etapa se caracterizó cinética y respirométricamente a *B. velezensis* 83 sin elicitores (cultivo control), así como el uso de una solución modelo de exudados sintéticos. Posteriormente, por separado, se agregó micelio de *C. gloeosporioides* inactivo y polisacáridos de planta, como elicitores. Por último, se probaron dos elicitores simultáneamente (micelio y polisacárido), para evaluar una posible coexistencia de los efectos producidos por los mismos. El micelio no viable de *C. gloeosporioides* mostró un efecto elicitor sobre la velocidad de crecimiento de la bacteria (incrementándose 1.37 veces), y sobre la productividad del proceso de producción de esporas, que incrementó hasta 4 veces, mientras que la producción de γ -PGA se incrementó 1.25 veces en comparación con el cultivo control. Por su parte, la α -celulosa y el arabinogalactano (evaluados por separado), elicitaron la producción de bacilomicina D (3.3 y 3.8 veces en comparación con el control). La solución modelo de exudados no mostró tener un efecto

elicitador en ninguno de los parámetros de interés. El uso de dos elicitores en un mismo cultivo, no mostró producir de manera simultánea los efectos observados en los cultivos con un solo elicitador.

Los resultados de este trabajo muestran que *B. velezensis* 83 es capaz de responder a diferentes elicitores y dicha respuesta dependerá del elicitador en cuestión. Estos hallazgos abren la posibilidad de diseñar mejores procesos para la producción de esporas y metabolitos de interés.

1. INTRODUCCIÓN

En el control de enfermedades en cultivos agrícolas causadas por fitopatógenos, uno de los desafíos que enfrenta la biotecnología es encontrar alternativas que resulten inocuas para el ser humano y el medio ambiente. El uso de compuestos químicos, como solución tradicional a esta problemática, trae consigo efectos perjudiciales para el ambiente y la salud, por lo que surge la necesidad de buscar medidas alternativas de intervención, como el control biológico (Chávez-Díaz *et al.*, 2014).

Los agentes de control biológico (ACB) son microorganismos, sus productos o metabolitos secundarios, que antagonizan a una plaga o patógeno (Chávez-Díaz *et al.*, 2014; Serrano-Carreón y Galindo, 2007). La inhibición de fitopatógenos por la acción de estos ACB se lleva a cabo mediante tres mecanismos: antibiosis, resistencia sistémica inducida y competencia por nutrientes y espacio (Rabbee *et al.*, 2019).

La bacteria *Bacillus velezensis* 83 destaca como ACB, al ser capaz de sintetizar una variedad de metabolitos que no solo tienen actividad antagónica contra patógenos, sino que también le permite establecer relaciones positivas con las plantas (Balderas-Ruíz *et al.*, 2020). Tal es el caso de la bacilomicina D, un lipopéptido muy importante que, además de tener actividad antifúngica, juega un papel importante en la formación de *biofilm* (Xu *et al.*, 2013). El ácido poli- γ -glutámico, por su parte, es un metabolito que tiene un impacto positivo en la robustez y arquitectura del *biofilm*. La formación de *biofilm* es un requisito clave para la colonización de plantas, asegurando un control biológico efectivo (Yu *et al.*, 2016).

Además, *B. velezensis* 83 tiene la capacidad de formar endosporas, las cuales son resistentes a altas temperaturas, desecación, agentes químicos y radiación (López *et al.*, 2008). La capacidad de esporulación le da a esta bacteria una relevancia a nivel tecnológico, ya que le permite tolerar condiciones adversas (sequedad y altas

temperaturas) manteniendo su viabilidad, importante en la formulación de un producto seco (secado por aspersión) y con una larga vida de anaquel (Serrano-Carreón y Galindo, 2007).

En el grupo de investigación del Dr. Enrique Galindo, del Instituto de Biotecnología de la UNAM, se aisló la bacteria *Bacillus velezensis* 83. Ésta se ha vuelto un modelo de estudio porque produce lipopéptidos antifúngicos y esporas. Éstos son los ingredientes activos de un biofungicida que actualmente es comercializado en México con el nombre de *Fungifree AB*[®] (Galindo *et al.*, 2013; Galindo *et al.*, 2015). Es por esto por lo que resulta de interés que la formulación del producto final cuente con lipopéptidos que inhiban la proliferación de fitopatógenos, permitiendo así a las esporas germinar y producir metabolitos *de novo*.

Se ha reportado en la literatura el uso de elicitores como estrategia para el incremento de la producción de metabolitos secundarios de interés (Pettit, 2011). En cultivos de *Bacillus* spp. se ha utilizado esta estrategia, logrando incrementar la producción de lipopéptidos antagónicos de patógenos (Debois *et al.*, 2015; DeFilippi *et al.*, 2018; Zihahirwa Kulimushi *et al.*, 2017) y la expresión de genes involucrados en la esporulación y la síntesis de lipopéptidos (Fan *et al.*, 2012; Grandchamp *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2005).

Por lo tanto, en este proyecto se estudió el uso de diferentes elicitores (solución modelo, micelio inactivo y polisacáridos de pared celular vegetal) que permitieran incrementar la esporulación y la producción de bacilomicina D y γ -PGA en cultivos de *B. velezensis* 83 en matraces agitados.

2. ANTECEDENTES

2.1. Control biológico, una alternativa frente a fitopatógenos

En el manejo de productos hortofrutícolas, las pérdidas debido a plagas y enfermedades tienen un considerable impacto económico negativo en la agricultura (Lewis y Papavizas, 1991). Frente a esta problemática, una medida popular es el uso de agentes químicos sintéticos que inhiban los daños en plantas causados por agentes fitopatógenos (O'Brien, 2017). Sin embargo, existe una creciente preocupación por los efectos negativos que los agentes de control químico puedan tener en la salud de los consumidores y en el medio ambiente (O'Brien, 2017).

El control biológico es un enfoque alternativo y atractivo a métodos tradicionales utilizados en el control de plagas y enfermedades de plantas (O'Brien, 2017; Pal y McSpadden-Gardener, 2006; Serrano-Carreón y Galindo, 2007). En patología de plantas, se conoce como control biológico al uso de organismos antagonistas de plagas, así como sus metabolitos, para suprimir o reducir enfermedades en plantas (Pal y McSpadden-Gardener, 2006; Serrano-Carreón y Galindo, 2007). Dentro de este contexto, al organismo o metabolito capaz de inhibir o eliminar fitopatógenos se denomina agente de control biológico (ACB) (Pal y McSpadden-Gardener, 2006).

Las bacterias y los hongos suelen ser los microorganismos más usados como ACB (Cook, 1993). Estos microorganismos se suelen aislar a partir del suelo o plantas. Después se evalúa su capacidad para inhibir a fitopatógenos por medio de ensayos *in vitro* (Serrano-Carreón y Galindo, 2007). *Coniothyrium*, *Fusarium*, *Gliocladium* y *Trichoderma* están dentro de los géneros de hongos más utilizados en productos a base de ACB comercializados (O'Brien, 2017). En el caso de las bacterias, *Pseudomonas* y *Bacillus* son los géneros más utilizados para la formulación de dichos productos (O'Brien, 2017).

Si bien muchos microorganismos han tenido éxito como ACB en pruebas de laboratorio, la formulación de un producto estable y con un alto contenido de células viables suele ser la mayor limitante en el desarrollo de un producto comercial (Emmert y Handelsman, 1999; Serrano-Carreón y Galindo, 2007). El género *Bacillus* tiene la capacidad de formar endosporas termorresistentes, lo que facilita su procesamiento en etapas posteriores a la fermentación (secado por aspersión), permitiendo la formulación de un producto estable y de larga vida de anaquel (Emmert y Handelsman, 1999).

2.2. *Bacillus velezensis* 83, agente de control biológico

El género *Bacillus* está conformado por bacterias Gram positivas, de bajo contenido de G+C (35-44%), son aerobias o anaerobias facultativas, quimioorganótrofas y con forma bacilar durante su crecimiento vegetativo (Prescott *et al.*, 2004). Este género tiene una importancia biotecnológica gracias a su capacidad de sintetizar una amplia gama de diferentes moléculas como enzimas, químicos volátiles, biopolímeros, surfactantes y lipopéptidos antifúngicos (Lyngwi y Joshi, 2014). La aplicación de estos metabolitos en diferentes sectores como la medicina, el área farmacéutica, la industria, la agricultura, por mencionar algunas, hacen a las especies de *Bacillus* relevantes en el desarrollo de nuevas tecnologías de importancia económica (Lyngwi y Joshi, 2014).

Las especies del género *Bacillus* son capaces de producir una amplia gama de metabolitos con actividad biológica, que pueden otorgarles una ventaja frente a competidores presentes en su entorno (Prescott *et al.*, 2004). Dichos metabolitos confieren a *Bacillus* spp. su capacidad de ejercer un control biológico efectivo (Chowdhury *et al.*, 2015). El control biológico se puede llevar a cabo a través de diferentes modos de acción: antibiosis, inducción de resistencia sistémica y competencia por espacio y nutrientes (Chen *et al.*, 2009; Chowdhury *et al.*, 2015; Ongena y Jacques, 2007). La antibiosis consiste en la producción de enzimas líticas y metabolitos antagónicos de fitopatógenos (Chen *et al.*, 2009). Los ACB

son capaces de sintetizar compuestos volátiles y hormonas que inducen una resistencia sistémica en la planta huésped (Vallad y Goodman, 2004). Una vez activa la resistencia sistémica, la planta desencadena mecanismos de defensa como la expresión de enzimas contra el estrés oxidativo, lignificación del tejido y síntesis de fitoalexinas (Vallad y Goodman, 2004). En la competencia por espacio y nutrientes en el nicho ecológico, los ACB hacen uso de sideróforos y formación de *biofilm* (Chowdhury *et al.*, 2015). Dentro del *biofilm* formado por *Bacillus* spp. se encuentran diferentes subpoblaciones resultantes de una diferenciación celular (esporas, células productoras de *biofilm*, células competentes, etc.), así como componentes estructurales del *biofilm* (exopolisacáridos, proteínas y otros polímeros) (Chowdhury *et al.*, 2015; López y Kolter, 2010).

Bacillus velezensis destaca entre los diferentes integrantes de este género, no solo por ser capaz de producir metabolitos de amplio rango antagónico contra fitopatógenos, sino además al establecer asociaciones positivas con plantas (Adeniji *et al.*, 2019; Fan *et al.*, 2018; Jiang *et al.*, 2019; Palazzini *et al.*, 2016; Rabbee *et al.*, 2019). Un ejemplo de estas asociaciones positivas es la promoción del crecimiento de plantas a través de compuestos volátiles producidos por *Bacillus* spp. (Tahir *et al.*, 2017). Estas características hacen de *B. velezensis* una bacteria promotora de crecimiento de plantas (PGPB por sus siglas en inglés) y un agente de control biológico (Compant *et al.*, 2005).

La cepa *Bacillus velezensis* 83 fue aislada a partir del follaje de mango por investigadores del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Culiacán. Esta cepa fue inicialmente identificada como *B. subtilis* y, después de un análisis filogenómico, fue reclasificada como *B. velezensis* 83 (Balderas-Ruíz *et al.*, 2020). Se secuenció el genoma de *B. velezensis* 83 y se identificaron los genes involucrados en la síntesis de diferentes metabolitos secundarios fundamentales para el papel de control biológico, formación de *biofilm* y esporulación de la cepa (Balderas-Ruíz *et al.*, 2020).

Se ha comprobado la actividad de control biológico de *B. velezensis* 83 en diferentes cultivos de frutos (aguacate, mango, papaya, cítricos, entre otros) frente

a diferentes fitopatógenos (Galindo *et al.*, 2013; Galindo *et al.*, 2015). Por su impacto económico y agrícola, destaca la inhibición contra el fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*, causante de la antracnosis (Galindo *et al.*, 2013; Luna-Bulbarela *et al.*, 2018). *B. velezensis* 83 constituye el ingrediente activo de la formulación del biofungicida de aplicación foliar *Fungifree AB*[®], comercializado en México desde el 2012 (Galindo *et al.*, 2013).

2.3. Esporas de *B. velezensis* 83 como principio activo en *Fungifree AB*[®]

Las esporas de *Bacillus* son estructuras celulares latentes resistentes a altas temperaturas, a un amplio rango del pH, a la radiación y a diversos agentes químicos (Nicholson *et al.*, 2000). La formación de esporas es un proceso de diferenciación celular complejo y de alto costo energético (Hoch, 1993). Los eventos morfológicos que engloba la esporulación incluyen la síntesis de estructuras celulares (septum asimétrico, corteza, cubierta), así como cambios metabólicos en la preespora y lisis de la célula madre (Errington, 1993). En la figura 2-1 se muestra una representación gráfica de estas etapas. Una vez que la espora se encuentra en condiciones favorables, ésta es capaz de germinar y seguir con su ciclo vegetativo y producir metabolitos *de novo* (Setlow, 2003).

Siendo un proceso energéticamente demandante, el inicio de la esporulación es regulado cuidadosamente (Errington, 2003; Hoch, 1993). La expresión de genes involucrados en el inicio de la esporulación está regulada directa o indirectamente por Spo0A, una proteína de unión a ADN (Molle *et al.*, 2003). Este regulador es activado por una serie de histidina cinasas (KinA, KinB, KinC, KinD y KinE) a través de una cascada de fosforilación por medio de dos proteínas fosfotransferasas (Spo0F y Spo0B) (Jiang *et al.*, 2000).

En condiciones de laboratorio, la actividad enzimática de KinA y KinB abarca en su totalidad la activación de Spo0A (Trach y Hoch, 1993). La activación de estas cinasas está relacionada con una limitación nutricional, probablemente mediante

un mecanismo dependiente de la concentración interna de GTP (Tocheva *et al.*, 2016; Tojo *et al.*, 2013). Aun cuando la limitación nutricional es el factor más estudiado en la esporulación de *B. velezensis* 83, pueden existir otros factores que pueden influir en el proceso de esporulación (Soriano, 2016). Aunque poco se ha reportado sobre las cinasas KinC, KinD y KinE, se ha propuesto que KinC detecta la fuga de iones potasio, fenómeno que puede ser provocado por la surfactina, un surfactante producido por *Bacillus* spp. (López y Kolter, 2010). Mientras que a KinD se le ha atribuido la capacidad de activarse por estrés osmótico (López y Kolter, 2010).

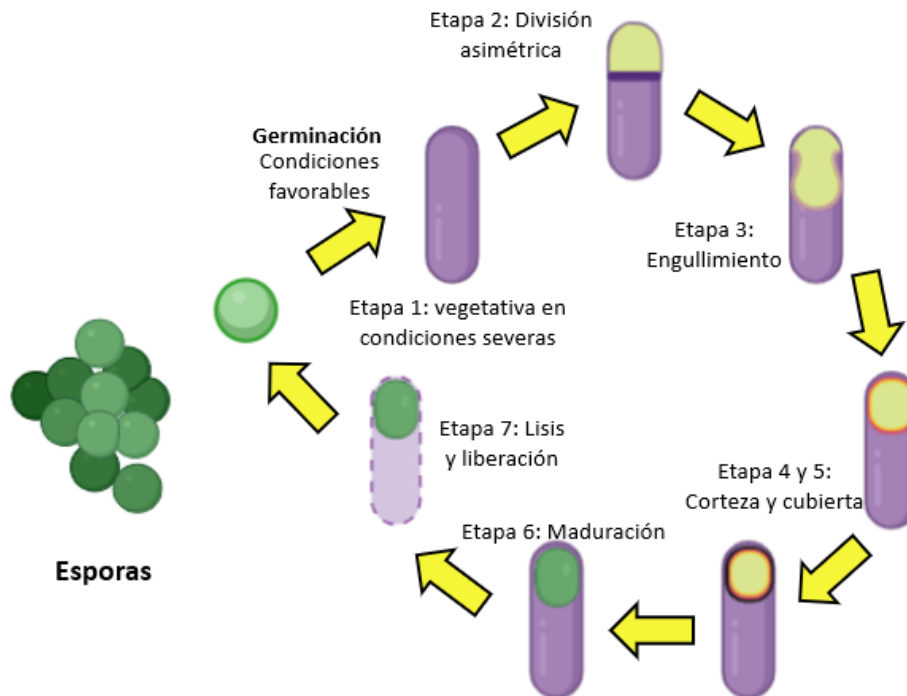


Figura 2-1. Etapas de esporulación. Adaptada de Errington, 2003.

En el medio ambiente, las cinasas sensoras de *Bacillus* responden a diversas señales que pueden desembocar en este proceso de diferenciación celular (López y Kolter, 2010). Además de las esporas, existen otros tipos de células

especializadas resultantes de la diferenciación celular (López y Kolter, 2010); así, pueden coexistir subpoblaciones de diferentes células especializadas dentro de un mismo nicho. Dentro de estas células especializadas están las células productoras de matriz extracelular (formación de biofilm), células mineras (secreción de enzimas líticas), las productoras de lipopéptidos, por mencionar algunas (Kaspar *et al.*, 2019; López *et al.*, 2008; Lyngwi y Joshi, 2014).

En el proceso de la producción de *Fungifree AB*[®] (*B. velezensis* 83), resulta de interés obtener altas concentraciones de bacterias en forma de esporas. Las operaciones unitarias subsiguientes a la fermentación, como el secado por aspersión, involucran altas temperaturas (Serrano-Carreón y Galindo, 2007) por lo que las células vegetativas se verían comprometidas. Las esporas de *B. velezensis* 83 en *Fungifree AB*[®] una vez que se aplican en el follaje de las plantas retoman su ciclo vegetativo y ejercen un control biológico en la planta huésped (Galindo *et al.*, 2013).

2.4. El ácido poli- γ -glutámico como metabolito de interés en el control biológico

El ácido poli- γ -glutámico o γ -PGA es un polímero aniónico, formado por unidades de ácido glutámico unidos por enlaces amida entre los grupos α -amino y γ -carboxilo de estos aminoácidos (Bajaj y Singhal, 2011). El γ -PGA biodegradable, comestible, soluble en agua e inocuo, producido por *Bacillus* spp. (Bajaj y Singhal, 2011). Por sus características, este polímero resulta de interés para su aplicación en las áreas de alimentos, medicina, cosméticos, fármacos y tratamiento de aguas residuales (Shih y Van, 2001). Además, se ha reportado que el γ -PGA es un regulador positivo de crecimiento de plantas e induce una mayor tolerancia a ciertos factores de estrés abióticos, como a bajas temperaturas y altas concentraciones de sal (Lei *et al.*, 2015; Lei *et al.*, 2016).

El ácido glutámico necesario para la síntesis del γ -PGA puede obtenerse de manera exógena (a través del medio de cultivo) o endógena (Hsueh *et al.*, 2017). La obtención endógena de ácido glutámico es a partir de la aminación del ácido α -cetoglutarico, el cual es un intermediario en el ciclo de Krebs (Hsueh *et al.*, 2017). La polimerización del γ -PGA la lleva a cabo un grupo de enzimas (polimerasas) en un proceso dependiente de ATP (Shih y Van, 2001). Estas polimerasas se encuentran codificadas en el operón *pgsBCA*, el cual está regulado por el sistema de detección de *quorum* ComX-ComP y el sistema de dos componentes DegS-DegU (Hsueh *et al.*, 2017). Una vez que la fuente de carbono se ha agotado, *Bacillus* es capaz de hidrolizar el γ -PGA por vía enzimática y usar el ácido glutámico como fuente de carbono (Shih y Van, 2001). Los genes involucrados en la síntesis e hidrólisis del γ -PGA fueron identificados en *Bacillus velezensis* 83 (Balderas-Ruíz *et al.*, 2020).

Además de su importancia industrial, el γ -PGA está involucrado en la formación de *biofilm* (Wang *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2016). La formación de *biofilm* es crucial para ejercer un control biológico efectivo, ya que es un prerrequisito para la colonización de las plantas (Beauregard *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2019a; Xu *et al.*, 2019b). Se ha descrito una relación positiva entre la producción de γ -PGA y la complejidad morfológica y robustez en las colonias del *biofilm* (Yu *et al.*, 2016). Aunque aún no se sabe con exactitud el papel del γ -PGA en la formación de *biofilm*, se especula que puede formar parte de la matriz del *biofilm* o facilitar el ensamble de otros componentes de la matriz (Yu *et al.*, 2016). La delección de uno o más genes involucrados en la síntesis del γ -PGA reduce el rendimiento de este polímero, así como la capacidad de *Bacillus* de colonizar raíces de la planta (Wang *et al.*, 2017). Asimismo, la reducción en la producción de γ -PGA está relacionada con un detrimento en la capacidad de *Bacillus* spp. de proteger plantas de fitopatógenos en ensayos *in vivo* (Wang *et al.*, 2017).

La producción de γ -PGA ocasionan cambios en la reología del medio de cultivo, debido tanto a su peso molecular como a la concentración de dicho metabolito en el caldo de fermentación (Richard y Margaritis, 2003). Dichos cambios pueden

tener un impacto en la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) en el medio de cultivo (Kim *et al.*, 2012). El metabolismo celular se puede ver influenciado por la VTO, tanto en el crecimiento celular como en la síntesis de algunos metabolitos, entre ellos el γ -PGA (Flores *et al.*, 2020). La medición en línea de la VTO es una herramienta muy útil no solo en la caracterización cinética del crecimiento bacteriano, sino además en el monitoreo de la producción de ciertos metabolitos como el γ -PGA (Regestein née Meissner *et al.*, 2017).

2.5. Bacilomicina D como componente de interés en biofungicida

El genoma de *Bacillus velezensis* codifica una gran cantidad de enzimas que utiliza para la síntesis de metabolitos, que le otorgan ventajas competitivas para establecerse en el entorno que se encuentre y ejercer un control biológico de fitopatógenos efectivo (Ongena y Jacques, 2007). Al menos un 8.2% del genoma de *B. velezensis* se destina a la síntesis de metabolitos útiles para el control biológico, en su mayoría lipopéptidos cíclicos (Balderas-Ruíz *et al.*, 2020).

Los lipopéptidos son moléculas anfifílicas que consisten en una o más cadenas lipídicas unidas a un grupo peptídico (Hamley, 2015). Los lipopéptidos cíclicos (cLP) sintetizados por *Bacillus* spp. están conformados por una subunidad peptídica (de 7 a 10 aminoácidos) cíclica unida a una molécula de ácido graso β -hidroxilado o β -aminado de longitud variable (12 a 18 carbonos) (Hamley, 2015; Ongena y Jacques, 2007).

Los cLPs son sintetizados a través de péptido sintetisas no ribosomales (NRPS por sus siglas en inglés) (Ongena y Jacques, 2007). Las NRPSs son complejos multienzimáticos que catalizan todos los pasos necesarios en la biosíntesis de lipopéptidos, incluyendo la selección y la condensación ordenada de los aminoácidos (Stein, 2005). Cada ciclo de elongación en NRPSs necesita de 3 dominios fundamentales: un dominio de adenilación, un dominio portador de peptidilo (o de tiolación) y un dominio de condensación (Stein, 2005).

Los cLPs de *Bacillus velezensis* se clasifican en tres familias: iturinas, surfactinas y fengicinas (Raaijmakers *et al.*, 2010; Rabbee *et al.*, 2019), y en la figura 2-2 se presentan algunos ejemplos de estas familias. Las surfactinas son heptapéptidos unidos a un ácido graso β -hidroxilado con actividad surfactante, antiviral y antimicrobiana (Ongena y Jacques, 2007). Las fengicinas son decapéptidos unidos a un ácido graso β -hidroxilado con actividad antifúngica (Rabbee *et al.*, 2019). La estructura general de las iturinas consiste en un heptapéptido cíclico con una conformación quiral conservada de LDDLLDL, unido a un ácido graso β -aminado de 14 a 17 carbonos (Suneeta *et al.*, 2018). Las iturinas tienen una actividad antagónica que afecta principalmente a hongos y levaduras (Suneeta *et al.*, 2018). Los cLPs muestran una heterogeneidad debido a variaciones en la longitud y ramificación de las cadenas de los ácidos grasos, así como sustituciones en los aminoácidos de la subunidad peptídica (Stein, 2005).

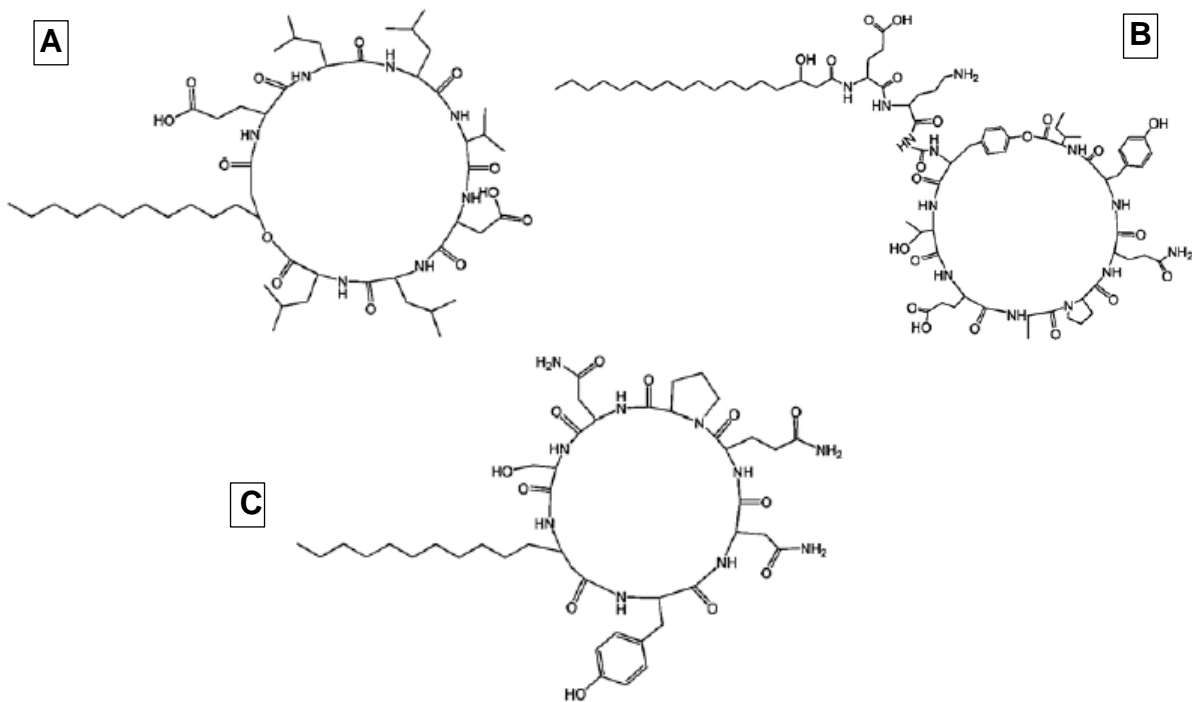


Figura 2-2. Ejemplos representativos de las familias lipopeptídicas de *Bacillus velezensis*:

A) Surfactina B) Fengicina C) Iturina

Dentro de las iturinas, la bacilomicina D se ha identificado como uno de los compuestos antifúngicos más eficientes en ensayos *in vitro* (Fan *et al.*, 2018; Gu *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2013). La subunidad peptídica de la bacilomicina D tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: L-Asn D-Tyr D-Ans L-Pro L-Glu D-Ser L-Thr (Wan *et al.*, 2021). La concentración mínima inhibitoria oscila entre 23 y 28 μM , dependiendo de la especie, así como de la longitud y ramificaciones del ácido graso (Gu *et al.*, 2017; Luna, 2015; Luna-Bulbarela *et al.*, 2018). Aunque no se ha descrito el mecanismo molecular de su actividad biológica, a través de microscopía electrónica y de fluorescencia, se han observado cambios morfológicos en las membranas plasmáticas y paredes fúngicas de hifas y conidios de algunas especies de hongos (Gu *et al.*, 2017; Luna-Bulbarela *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2013). Este cambio está asociado a una perturbación osmótica causada por la formación de poros conductores de iones (Ongena y Jacques, 2007). La formación de estos poros se asocia a la afinidad que presenta la bacilomicina D por los esteroides, los cuales están presentes en las membranas fúngicas (Nasir y Besson, 2012).

La síntesis de bacilomicina D es a través de NRPS, cuya expresión está regulada por un sistema de dos componentes y un sistema de detección de *quorum* (Miras y Dubnau, 2016; Ongena y Jacques, 2007). Por esta razón la síntesis de este antifúngico toma lugar durante la fase estacionaria temprana de *Bacillus*, una vez que se alcanza la densidad celular más alta (Harwood *et al.*, 2018). La feromona ComX es un decapeptido (Ala-Asp-Pro-Ile-Thr-Arg-Gln-Trp-Gly-Asp) con una modificación hidrofóbica en el triptófano (Okada *et al.*, 2005). es sintetizada y difundida al medio de cultivo durante la fase exponencial y al acumularse es detectada por la histidina cinasa ComP, el cual transfiere la señal al factor transcripcional ComA (Raaijmakers *et al.*, 2010). Una vez fosforilado ComA, se inicia la expresión del regulador DegQ, éste junto con la cinasa citosólica DegS continúan con la cascada de señalización hasta activar al regulador transcripcional

DegU, el cual activa la expresión de estos complejos enzimáticos (Miras y Dubnau, 2016; Raaijmakers *et al.*, 2010).

En la formulación del biofungicida *Fungifree AB*[®] (constituido por esporas de *B. velezensis* 83), resulta de interés que el producto de la fermentación cuente con una alta concentración de bacilomicina D. Este lipopéptido al tener actividad antifúngica, es capaz de inhibir el crecimiento de competidores, permitiendo a la bacteria germinar en el medio ambiente y retomar la síntesis de metabolitos *de novo* (Harwood *et al.*, 2018; Setlow, 2003).

2.6. Elicitación, estrategia para la producción de metabolitos secundarios

El análisis del genoma de *B. velezensis* 83 ha mostrado que esta bacteria tiene los genes necesarios para la síntesis de metabolitos secundarios involucrados en la inhibición de una variedad de microorganismos (Balderas-Ruíz *et al.*, 2020). No obstante, la síntesis de estos metabolitos puede verse atenuada, incluso silenciada, bajo condiciones de laboratorio como se ha visto en muchas otras especies (Baral *et al.*, 2018; Bertrand *et al.*, 2014). Dicho esto, existen dos enfoques principales como respuesta a esta problemática: en un enfoque se hace uso de herramientas moleculares y el otro enfoque depende de los parámetros de cultivo (Baral *et al.*, 2018; Bertrand *et al.*, 2014; Dang *et al.*, 2019).

El enfoque dependiente de herramientas moleculares agrupa estrategias enfocadas en la edición del genoma del microorganismo de interés (Baral *et al.*, 2018). Si bien estas estrategias permiten seleccionar vías de síntesis deseadas, los rendimientos obtenidos usualmente son bajos y las modificaciones en el genoma puede interferir con otros procesos metabólicos en la cepa transformada (Baral *et al.*, 2018). Aunado a esto, *B. velezensis* 83 se ha mostrado como un microorganismo recalcitrante para transformarse (Soriano, 2016) por lo que este enfoque puede ser inconveniente.

El enfoque dependiente de los parámetros de cultivo comprende técnicas orientadas a modificar la actividad de reguladores globales a través de la modificación de las condiciones de cultivo (Baral *et al.*, 2018; Bertrand *et al.*, 2014; Pettit, 2011). En comparación con las técnicas del enfoque dependiente de herramientas moleculares, las metodologías empleadas en este enfoque dan un mayor rendimiento, son sencillas y fáciles de escalar (Baral *et al.*, 2018). De estas técnicas, los cultivos elicitados (o simplemente elicitación) es una de las más atractivas para incrementar la producción de metabolitos secundarios, por su efectividad, tanto en elicitación de plantas, hongos y cultivos celulares (Pettit, 2011; Radman *et al.*, 2003).

De acuerdo con Keen (1975), “elicitor” es una sustancia que, al ser introducida a un sistema celular, inicia o incrementa la biosíntesis de un metabolito específico. Los elicitors pueden ser bióticos (biomoléculas y compuestos derivados de seres vivos) o abióticos (metales, iones), los cuales funcionan como señales para receptores presentes en el sistema celular de interés (Radman *et al.*, 2003).

La elicitación biótica o biológica se basa en el intercambio de señales moleculares entre las especies que se encuentran en un nicho ecológico dado, como una forma de *cross-talk* o comunicación (Becker *et al.*, 1997), como se muestra en la figura 2-3. En esta comunicación química participan tanto moléculas de bajo peso molecular (resultante del metabolismo de plantas, hongos y bacterias) como de alto peso molecular, las cuales suelen ser componentes estructurales de paredes celulares y membranas (Becker *et al.*, 1997; Hassan *et al.*, 2019).

A través de la disponibilidad de nutrientes, las plantas son capaces de ejercer control sobre las poblaciones de los microorganismos que la colonizan (Baudoin *et al.*, 2003). Se ha observado que también lo pueden hacer mediante el intercambio de señales entre la planta y los miembros del microbioma (Smith *et al.*, 2017). Las plantas transfieren entre un 20 y un 40% del carbono fijado fotosintéticamente a las raíces (Ortiz-Casto *et al.*, 2009). Mediante el proceso de exudación de nutrientes a través de sus raíces, las plantas crean un microambiente enriquecido en la raíz y sus alrededores (rizósfera) (Canarini *et al.*, 2019). Los exudados de

raíz se componen, principalmente, por metabolitos primarios (azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos) que resultan del metabolismo de la planta (Canarini *et al.*, 2019; Ortiz-Castro *et al.*, 2009). La composición de estos exudados varía con respecto a la especie de la planta, la edad y las condiciones bióticas y abióticas donde se desarrolla (Smith *et al.*, 2017). Esta inversión de carbono permite que la planta se beneficie del establecimiento de relaciones simbióticas con ciertos microorganismos (Ortiz-Castro *et al.*, 2009).

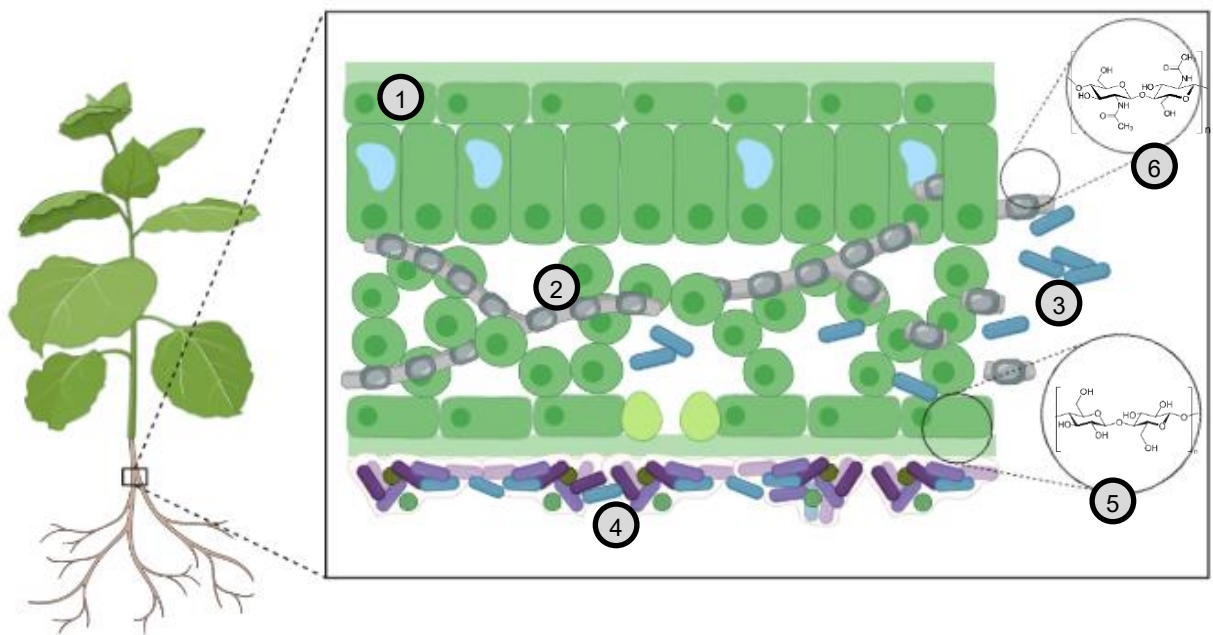


Figura 2-3. Esquema del *cross-talk* en un microambiente. En la ampliación del tejido vegetal (1) se muestra la interacción entre la planta con un hongo fitopatógeno (2) y bacterias benéficas (3) formando un *biofilm* (4). Las moléculas resultantes del metabolismo de las especies participantes en un ecosistema, así como moléculas estructurales (ejemplo: 5 – celulosa, 6 – quitina), sirven como señales químicas en una constante comunicación inter-especie.

De los microorganismos que son utilizados como agentes de control biológico, destacan las PGPB, por su capacidad de formar relaciones mutualistas con éstas (Bais *et al.*, 2004; Yi *et al.*, 2017). Los componentes presentes en los exudados

como señales químicas o como nutrientes son utilizados por las PGPB (Bais *et al.*, 2004). Las PGPB responden a estos componentes a través de fitohormonas y compuestos volátiles que, de manera directa o indirecta, elicitan la inmunidad de la planta y regulan el crecimiento y la morfogénesis de esta (Ortiz-Castro *et al.*, 2009).

Bacillus spp. son un claro ejemplo de PGPB, pues dentro de la vasta variedad de metabolitos secundarios que produce, se ha observado un efecto positivo en plantas por parte de éstos (Bais *et al.*, 2004; Fan *et al.*, 2018; Kaspar *et al.*, 2019; Ongena y Jacques, 2007; Xu *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2016). De igual manera, se ha observado cómo compuestos derivados de plantas tienen un efecto positivo en la síntesis de cLPs de *Bacillus* spp. (Debois *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2012).

Para recrear condiciones químicas y ecológicas se suele hacer uso de co-cultivos, fermentaciones mixtas o de preparados de composición compleja (a partir de biomasa), así como de compuestos cuya estructura es conocida (Baral *et al.*, 2018; Bertrand *et al.*, 2014; Marero *et al.*, 1997; Marmann *et al.*, 2014; Pettit, 2011; Scherlach y Hertweck, 2009; Tan *et al.*, 2019). Aunque la mayoría de los estudios que reportan el uso de elicitación biológica, para incrementar la producción de un metabolito de interés, lo hacen en plantas y hongos filamentosos, esta metodología se ha utilizado también en cultivos bacterianos, y más concretamente con cepas de *Bacillus* (Debois *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2014; Karupiah *et al.*, 2019; Nihorimbere *et al.*, 2012; Yi *et al.*, 2017).

2.7. *Bacillus* spp. en modelos de cultivos elicitados

En ensayos transcriptómicos se ha demostrado el efecto de los exudados de raíz en el incremento de la expresión de genes involucrados en el metabolismo de carbono y nitrógeno, formación de *biofilm* y síntesis de lipopéptidos en *Bacillus* spp. (Fan *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2019). Fan *et al.* (2012) utilizaron exudados de raíz de maíz como elicitores en cultivos de *B. amyloliquefaciens* FZB42. En este estudio observaron un incremento en la expresión de los genes que codifican para

las NRPS que sintetizan surfactina y fengicina (Fan *et al.*, 2012). Asimismo, se ha reportado que se pueden utilizar “exudados sintéticos” formulados en laboratorio y obtener un efecto positivo en la producción de cLPs (Nihorimbere *et al.*, 2012). Nihorimbere *et al.* (2012) utilizaron una formulación artificial de exudados de tomate en cultivos de *B. amyloliquefaciens* SQR9. En este estudio observaron un incremento de hasta 3 veces en el rendimiento de iturinas, surfactina y fengicina (Nihorimbere *et al.*, 2012).

Además de los exudados, recientemente se ha reportado que los componentes estructurales de plantas (celulosa, hemicelulosa, etc.) también tienen un papel importante en el intercambio de señales con microorganismos (Hassan *et al.*, 2019). Beauregard *et al.* (2013) demostraron el efecto elicitor de diferentes polisacáridos de pared celular vegetal en la formación de *biofilm* en *B. subtilis*. Debois *et al.* (2015) por su parte, lograron incrementar hasta más de 5 veces la producción de surfactina, usando diferentes polisacáridos en cultivos de *B. amyloliquefaciens* (tabla 2-1).

Los compuestos derivados de plantas han demostrado ser agentes importantes en la elicitación de varios procesos metabólicos en *Bacillus* spp. Muchos de estos efectos se ven reflejados en características que hacen más efectiva la capacidad de ejercer un control biológico por parte de *Bacillus* spp. (como la producción de lipopéptidos antagónicos de fitopatógenos y formación de *biofilm*). Aunque el papel principal de los cLPs es inhibir la actividad y proliferación de bacterias y hongos patógenos, también se les ha atribuido un papel importante en la inducción de resistencia sistémica en plantas, así como en la colonización de estas (Bais *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2013).

En el ecosistema que comprende la rizósfera de la planta, no solo se encuentran microorganismos, como los PGPB, con los cuales establecen una relación mutualista. En estos microambientes existen fitopatógenos compitiendo por espacio y nutrientes con las PGPB, dañando a la planta huésped en el proceso (Cao *et al.*, 2018; Cawoy *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014; Meyer y Stahl, 2003; Shentu *et al.*, 2013). Así como existen las interacciones planta – PGPB y planta –

fitopatógono, también existe un intercambio de moléculas entre las PGPB y los fitopatógenos, donde las PGPB hacen uso de metabolitos secundarios al detectar la presencia de fitopatógenos (Becker *et al.*, 1997; Cawoy *et al.*, 2014). Se ha propuesto que las PGPB son capaces de detectar compuestos sintetizados por los fitopatógenos, y éstos responden a los fitopatógenos con metabolitos antagónicos, ejerciendo un control biológico en el microambiente (Becker *et al.*, 1997; Zihahirwa Kulimushi *et al.*, 2017).

Tabla 2-1 Efecto de polisacáridos derivados de plantas como elicitores en la producción de surfactina (mg/L) en cultivos de *B. amyloliquefaciens* (Debois *et al.*, 2015)

Cepa (<i>B. amyloliquefaciens</i>)	Elicitor	Veces que se incrementó la concentración de surfactina
S499	Arabinogalactano	3.6
	Xilano	4.4
	Pectina	3.5
FZB42	Arabinogalactano	5.6
	Xilano	4.8
	Pectina	3.5
QST713	Arabinogalactano	5.5
	Xilano	4.5
	Pectina	3.0

Para el incremento de la producción de lipopéptidos antibióticos y antifúngicos de *Bacillus* spp., se han utilizado co-cultivos en medios sólido y líquido como método de elicitación (Cawoy *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014; Zihahirwa Kulimushi *et al.*, 2017). Como resultado de estos estudios, se ha observado que las respuestas son específicas para cada cepa de *Bacillus*, así como para cada elicitador utilizado (como se muestra en la tabla 2-2). Los fitopatógenos que se han visto antagonizados por

Bacillus spp. en ensayos de inhibición, muestran una respuesta en la producción de cLPs (Li *et al.*, 2014; Zihahirwa Kulimushi *et al.*, 2017). En este sentido, *Bacillus* sintetiza los metabolitos necesarios para inhibir la acción del patógeno en cuestión, al detectar su presencia (Andrić *et al.*, 2020).

Tabla 2-2 Efecto de co-cultivos de *Bacillus* con hongos patógenos sobre la producción de lipopéptidos. El número después de la flecha indica las veces que se incrementó la respuesta; los resultados de Li *et al.*, se calcularon en base a picos de área cromatográfica (mAU/s). Los resultados de DeFilippi *et al.*, y Zihahirwa Kulimushi *et al.*, se calcularon en base a concentración (mg/mL).

Cepa	Elicitor	Respuesta	Referencia
<i>B. subtilis</i> B9-5	<i>F. sambucinum</i>	↑3.0 fengicina ↑3.5 surfactina	DeFilippi <i>et al.</i> , 2018
	<i>R. stolonifer</i>	↑3.0 fengicina	
	<i>V. dahliae</i>	↑3.0 fengicina	
<i>B. amyloliquefaciens</i> SQR9	<i>V. dahliae</i> Kleb	↑2.0 bacilomicina D ↑2.7 fengicina	Li <i>et al.</i> , 2014
	<i>S.sclerotiorum</i>	↑2.1 bacilomicina D ↑2.5 surfactina	
	<i>F. oxysporum</i>	↑2.0 bacilomicina D ↑1.1 fengicina	
	<i>R. solani</i>	↑2.1 surfactina	
	<i>F. solani</i>	↑1.6 surfactina	
	<i>P. parasítica</i>	↑1.2 bacilomicina D ↑1.7 fengicina ↑1.2 surfactina	
<i>B. amyloliquefaciens</i> S499	<i>R. variabilis</i>	↑3.5 fengicina	Zihahirwa Kulimushi <i>et al.</i> , 2017
<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>R. variabilis</i>	↑2.7 fengicina	

Por otra parte, debido a la capacidad de diferenciación celular de *Bacillus*, otros procesos como la formación de *biofilm* y la esporulación se pueden ver alterados al entrar en contacto con ciertas especies (Andrić *et al.*, 2020). Los co-cultivos de *B. subtilis* y *E. coli* dieron como resultado un aumento en la expresión de genes involucrados en la esporulación de *Bacillus* (Grandchamp *et al.*, 2017).

Además de co-cultivos, la adición de biomoléculas provenientes de un fitopatógeno pueden generar una respuesta en cultivos sumergidos de *Bacillus* spp. (Grandchamp *et al.*, 2017; Ramírez-Vigil *et al.*, 2020). La adición de micelio inactivo de *C. gloeosporioides* a cultivos de *B. subtilis* provocaron un incremento de metabolitos secundarios antifúngicos (Ramírez-Vigil *et al.*, 2020). En otro estudio observaron que la adición del sideróforo enterobactina, a cultivos de *B. subtilis*, funciona como una señal capaz de incrementar la velocidad del proceso de formación de esporas hasta 7.5 veces con respecto al control (Grandchamp *et al.*, 2017).

Todos los trabajos anteriormente mencionados demuestran la capacidad de *Bacillus* de responder a diferentes estímulos bióticos que pueden estar presentes en su ambiente natural, de tal forma que logre adaptarse y sobresalir en dicho ambiente. Esta característica puede ser atractiva a nivel industrial, para la producción de diferentes metabolitos, por lo que es necesario realizar estudios de las respuestas que pueda presentar una cepa a diferentes elicitores. *B. velezensis* 83 es una cepa de interés de estudio bajo este enfoque, pues se ha demostrado su capacidad de síntesis de metabolitos secundarios bioactivos, formar endosporas termorresistentes y forma parte de un biofungicida cuya efectividad ha sido comprobada en campo (Balderas-Ruíz *et al.*, 2020; Galindo *et al.*, 2013; Galindo *et al.*, 2015).

3. HIPÓTESIS

En cultivos de *Bacillus velezensis* 83, el uso de una solución modelo (como exudados sintéticos de raíz), polisacáridos (componentes de pared celular vegetal) o micelio no viable de *C. gloeosporioides* como elicitores, incrementan la esporulación y la producción de γ -PGA y de bacilomicina D.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Estudiar en cultivos de *Bacillus velezensis* 83, el efecto de diferentes elicitores (simulación de exudados, micelio no viable de *C. gloeosporioides* y polisacáridos) sobre la esporulación y la producción de γ -PGA y bacilomicina D en matraces agitados.

4.2. Objetivos específicos

- Evaluar una solución modelo de exudados sintéticos como elicitador en la esporulación y producción de γ -PGA y bacilomicina D en *B. velezensis* 83.
- Evaluar micelio no viable de *Colletotrichum gloeosporioides* como elicitador en la esporulación y producción de γ -PGA y bacilomicina D en *B. velezensis* 83.
- Evaluar, de forma independiente, polisacáridos que constituyen la pared celular vegetal (α -celulosa y arabinogalactano), como elicitores en la esporulación y en la producción de γ -PGA y bacilomicina D en *B. velezensis* 83.
- Evaluar el efecto de dos elicitores simultáneos en la esporulación y producción de γ -PGA y bacilomicina D en *B. velezensis* 83.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En la figura 5-1 se muestra un esquema general de la estrategia seguida para el desarrollo de la fase experimental. Al tratar con diferentes elicitores, la fase experimental se desarrolló a nivel matraz. En una primera etapa se caracterizó la cinética y respirometría de *B. velezensis* 83 en una condición testigo o control, así como el uso de una solución modelo de exudados sintéticos de raíz, como fuente de carbono. Posteriormente, se evaluó el efecto de la presencia de micelio no viable de hongo patógeno. Además, se evaluó la presencia de polisacáridos de la pared celular vegetal (α -celulosa o arabinogalactano). Todos los ensayos fueron evaluados en términos de crecimiento vegetativo, producción de esporas, producción de bacilomicina D y producción de γ -PGA. Por último, se seleccionaron y evaluaron 2 elicitores simultáneamente.

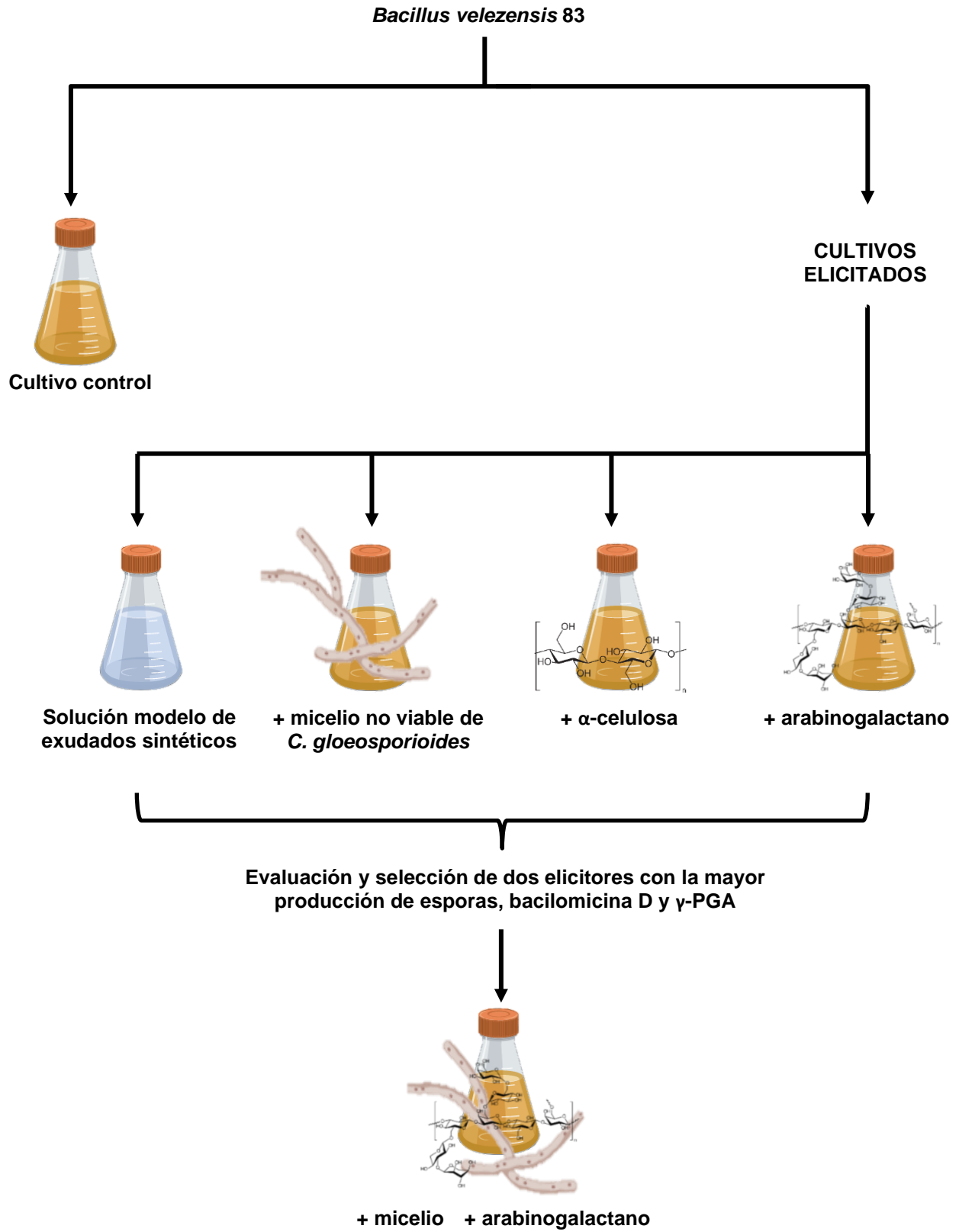


Figura 5-1. Esquema de estrategia experimental desarrollada para la evaluación de elicitores

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Materiales

6.1.1. Microorganismos

El agente de control biológico utilizado fue *Bacillus velezensis* 83, proporcionado por la empresa Agro&Biotecnia S. de R. L. de C.V. La cepa se preservó en un vial con glicerol al 80% y una temperatura de -20°C.

El fitopatógeno fúngico utilizado en los experimentos de elicitación fue *Colletotrichum gloeosporioides* 06, el cual fue aislado de la filósfera de mango en el Centro de Investigación de Alimentación y Desarrollo (CIAD) campus Culiacán, Sinaloa.

6.1.2. Medios de cultivo

La activación de la cepa se llevó a cabo en un medio sólido constituido por extracto de levadura, peptona, glucosa en agar (YPG, por sus siglas en inglés) (pH = 7.2 ± 0.2), cuya composición se muestra en la tabla 6-1.

Tabla 6-1 Composición de agar YPG

Compuesto	Concentración (g/L)
Extracto de levadura	10
Peptona	10
Glucosa	10
Agar	15

La producción de células necesarias para realizar los experimentos planteados se llevó a cabo en el medio líquido YPG (pH = 7.2 ± 0.2) cuya composición se muestra en la tabla 6-1, omitiendo la adición de agar.

La caracterización cinética de la cepa se llevó a cabo en un medio químicamente definido, en base al medio mineral reportado por Cristiano-Fajardo *et al* (2019), cuya composición se muestra en la tabla 6-2. Esta composición se utilizó para todas las pruebas realizadas. Se utilizó glucosa como fuente de carbono para el control y para los cultivos con polisacáridos y micelio de hongo. Para la solución modelo de exudados sintéticos, la fuente de carbono consistió en una formulación de acuerdo con las proporciones de los compuestos en exudados de raíz de maíz (Baudoin *et al.*, 2003). La composición de la solución modelo proporcionó la misma cantidad c-mol a la bacteria que los cultivos control, con micelio y con polisacáridos (0.5 c-mol). En la tabla 6-3 se muestran los componentes utilizados para la formulación de esta solución modelo, la suma total de los componentes es de 15 g/L.

Tabla 6-2 Composición del medio mineral utilizado en los cultivos de *B. velezensis* 83

Compuesto	Concentración (g/L)
Fuente de carbono*	15
(NH₄)₂SO₄	4
KH₂PO₄	6.4
K₂HPO₄	5.32
MgSO₄•7H₂O	0.4
FeSO₄•7H₂O	0.08
CaCl₂	0.1
MnCl₂•4H₂O	0.019

Para evitar la formación de compuestos por reacción de Maillard durante la esterilización, se prepararon tres *stocks* por separado. En un primer *stock* solo se diluyó glucosa en agua destilada. En otro *stock* el sulfato de amonio con los fosfatos y se ajustó el pH a 7.7 ± 0.1 con hojuelas de NaOH. En un último *stock* se

incluyeron las sales minerales restantes. La mezcla de los *stocks* y distribución del medio mineral a los matraces se realizó en campana de flujo laminar.

Tabla 6-3 Solución modelo del exudado sintético.

Compuesto	Concentración (g/L)
Glucosa	2.897
Fructosa	2.897
Sacarosa	2.757
Ácido cítrico	1.545
Ácido láctico	1.448
Ácido succínico	1.899
Alanina	0.716
Serina	0.845

6.2. Producción de micelio de *Colletotrichum gloeosporioides*

La producción de micelio de *C. gloeosporioides* se realizó en matraces Erlenmeyer de 2 L con un 1 L de caldo papa dextrosa Difco™ (pH = 5.6 ± 0.2) (PDB) de acuerdo con el siguiente procedimiento:

De la cepa preservada en caja Petri en medio agar papa dextrosa (PDA), se sembró a *C. gloeosporioides* en medio fresco de PDA Difco™ (pH = 5.6 ± 0.2) y se incubó a 29°C por 8 días. Posteriormente, en condiciones estériles, se agregaron 10 mL de PDB a cada caja y con un asa de platino se raspó la superficie del agar con el micelio. Se recuperó la suspensión medio-micelio con una jeringa estéril y se inoculó en un matraz Erlenmeyer de 2 L con 1 L de PDB. Se utilizó una caja Petri por cada matraz inoculado. Los matraces se incubaron a 29°C por 6 días con una agitación de 100 rpm.

La biomasa se recuperó por filtración al vacío utilizando papel filtro Whatman no. 1 bajo condiciones no estériles. El micelio se resuspendió y lavó dos veces en agua

destilada, después de cada lavado se filtró utilizando el método ya descrito. El micelio lavado se colocó en un horno a $80^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ por 48 h para deshidratarlo.

Para la obtención de un polvo homogéneo, el hongo fue molido en un mortero de porcelana y se agregó nitrógeno líquido para facilitar el proceso. El producto de la molienda se tamizó en un tamiz #80 de acero inoxidable. El polvo obtenido fue almacenado en un tubo cónico nuevo a temperatura ambiente y envuelto con Parafilm.

Para la evaluación del micelio como elicitor de los cultivos en matraces agitados, se utilizó una concentración de 2 g/L de elicitor en el medio mineral. Se agregó por separado, 0.1 g de polvo de micelio suspendido en 5 mL de agua destilada para cada matraz. Una vez esterilizados los matraces con micelio suspendido en agua, se aforaron los matraces a 50 mL con el medio mineral descrito en la sección 6.1.2, y en condiciones estériles.

6.3. Desarrollo de los cultivos elicitados

6.3.1. Activación de la bacteria *B. velezensis* 83 y desarrollo de inóculos

Para la activación de la cepa, se tomaron dos asadas de la cepa preservada (vial con glicerol mantenido a -18°C) y se estirió una caja de Petri con agar YPG, la caja se incubó a 29°C por 12 horas. De la caja con agar se tomaron dos asadas y se inoculó un tubo con 5 mL de medio líquido YPG. El tubo se incubó a 29°C y una agitación de 200 rpm por 12 horas. Por último, el contenido del tubo se transfirió a un matraz de 250 mL con 45 mL de medio YPG, teniendo un volumen final de 50 mL, y se incubó a 29°C y 200 rpm por 12 horas.

Una vez transcurridas las 12 h, se hizo un conteo celular por microscopía óptica y empleando una cámara Neubauer, determinando la concentración de células en el medio YPG. Posteriormente, se calculó el volumen necesario del inóculo para obtener una concentración inicial de 1×10^8 células/mL en los matraces para el desarrollo de los procesos y su análisis cinético y respirométrico.

6.3.2. Cultivos en matraces agitados

La caracterización cinética de *B. velezensis* 83 se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen de llenado de 50 mL, utilizando medio mineral (tabla 6-2) y glucosa como fuente de carbono. El inóculo se tomó del cultivo en medio líquido YPG, el cual se centrifugó y se descartó el sobrenadante. El paquete celular fue resuspendido con solución salina estéril (0.9% p/v NaCl en agua destilada). Este proceso de “lavado” (centrifugado – descarte de sobrenadante – resuspensión) se repitió 2 veces para asegurar que en los cultivos no fueran moléculas formadas en el pre-inóculo. Los matraces se mantuvieron en agitación y temperatura constantes de 200 rpm y 29°C, durante 72 horas. Las muestras se tomaron cada 4 horas para las primeras 24 horas y cada 6 para las 48 horas restantes. Se realizaron triplicados para cada cultivo.

Para la caracterización cinética de los cultivos se cuantificó el consumo de sustrato, producción de metabolitos (acetoína, butanodiol, bacilomicina, γ -PGA) así como el crecimiento vegetativo de la cepa y la concentración de esporas.

6.3.3. Monitoreo de actividad respiratoria en línea

Además de la caracterización cinética, se caracterizó la respirometría de *B. velezensis* 83 en línea y de manera simultánea al monitoreo de la caracterización cinética. Para el análisis respirométrico se empleó el sistema de monitoreo de actividad respiratoria (RAMOS, por sus siglas en inglés). Los componentes del equipo RAMOS (HiTec Zang), así como de los matraces del sistema, se muestran en las figuras 6-1 y 6-2, respectivamente. Para mantener las mismas condiciones operacionales de aquellas en los matraces fuera de línea: se utilizaron matraces de 250 mL con un volumen de llenado de 50 mL e incubados a 29°C, 200 rpm durante 72 horas.

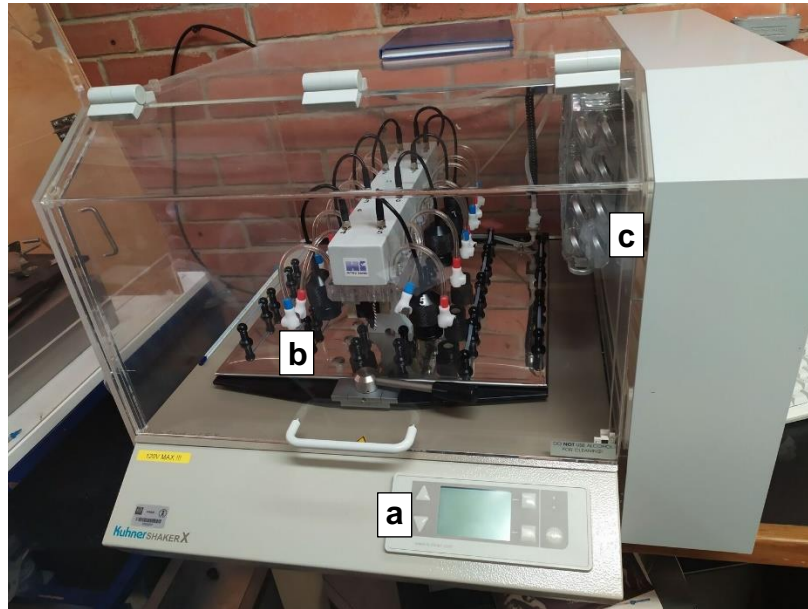


Figura 6-1 Equipo de sistema de monitoreo de actividad respiratoria (RAMOS). Consta principalmente de (a) panel de control de parámetros de incubadora, (b) plataforma de agitación y (c) controlador de temperatura.

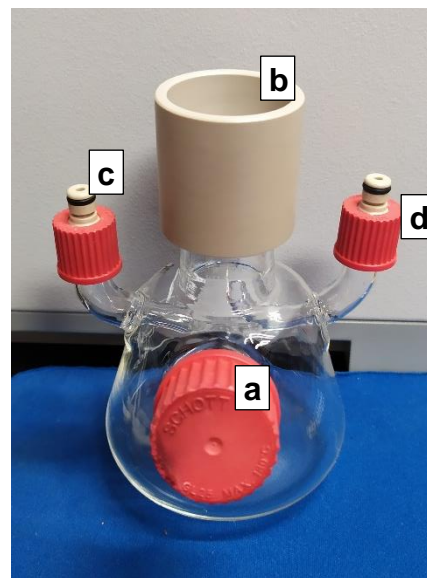


Figura 6-2 Matraz empleado en el equipo RAMOS. Los componentes de los matraces son (a) puerto de inoculación, (b) sensor de gases y (c y d) válvulas de entrada y salida de aire, respectivamente.

Los matraces están diseñados de tal modo que sus dimensiones son equiparables a las de un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Estos se colocan en la plataforma de agitación (figura 6-1) dentro de la incubadora.

El equipo RAMOS mide la actividad respiratoria constantemente por ciclos durante toda la fermentación. Un ciclo consiste en una fase de aireación y una fase de medición (figura 6-3). En la fase de aireación, las válvulas de entrada y salida se abren y fluye un gas con una composición conocida (con un 20.95 % de oxígeno) a través del matraz. Para evitar contaminar los matraces, se colocan filtros estériles en la entrada y salida del matraz. Durante la fase de medición, las válvulas se cierran. Los microorganismos consumen parte del oxígeno y producen CO₂, el sensor de gases detecta la diferencia de presión parcial de oxígeno y CO₂ y esta señal es procesada por la computadora (Anderlei y Büchs, 2001). Después de la fase de medición, las válvulas se vuelven a abrir para permitir el flujo de gas nuevamente.

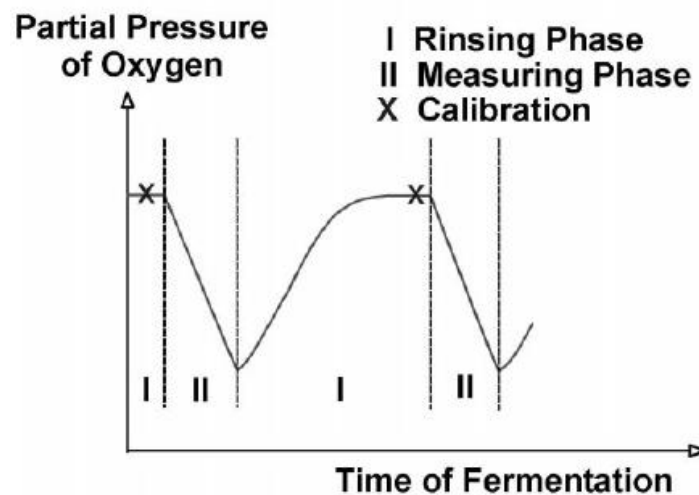


Figura 6-3 Esquema de ciclo de medición del equipo RAMOS. Tomado de Anderlei y Büchs (2001).

La velocidad de transferencia de oxígeno (OTR por sus siglas en inglés) y la velocidad de transferencia de CO₂ (CTR por sus siglas en inglés) son calculadas por el *software* de HiTec Zang a partir del cambio de la presión parcial de dichos gases. Los modelos matemáticos utilizados por el *software* son los siguientes:

$$OTR = \frac{\Delta P_{O_2}}{\Delta t} * \frac{V_g}{R * T * V_L} = \frac{n_{O_2}}{V_L * t} [=] \frac{mol}{L * h} \quad \text{Ec. 1}$$

$$CTR = \frac{\Delta P_{CO_2}}{\Delta t} * \frac{V_g}{R * T * V_L} = \frac{n_{CO_2}}{V_L * t} [=] \frac{mol}{L * h} \quad \text{Ec. 2}$$

Donde ΔP es la diferencia de la presión parcial (en bar), Δt es el tiempo de medición (en h), V_g es el volumen del gas (en L), V_L es el volumen de llenado con el medio líquido (en L), T es la temperatura en la que opera la incubadora (en °K), R es la constante universal de gases (en bar*L/mol*°K) y n el número de moles.

6.4. Métodos analíticos

6.4.1. Cinética de crecimiento vegetativo

Para determinar el número total de células se realizó un conteo de éstas en cámara de Neubauer, de acuerdo con el método reportado por Morales (2007). La región de conteo consiste en dos áreas formadas por 4 canales longitudinales y uno transversal. Dentro de cada área hay una cuadrícula de 3x3 mm, en la cual el cuadro central está subdividido en 25 cuadros de 0.2x0.2 mm (Área = 0.04 mm²), es en estos últimos donde se lleva a cabo la cuenta de las células. La profundidad de la cámara Neubauer es de 0.1 mm, teniendo un volumen final de conteo de 4x10⁻³ mm³ o 4x10⁻⁶ mL. En la figura 6-4A se muestra una imagen de la cámara y en la 6-4B un esquema de la cuadrícula presente en el área de conteo.

En cada medición se colocaron 20 µL de muestra en el centro de la cuadrícula y se observó en un microscopio óptico Optiphot-2 Nikon con el objetivo de 40X.

Dependiendo de qué tan concentrada estuviera la muestra, se realizaban las diluciones pertinentes. Dicho factor de dilución se incorporó en la ecuación final para determinar la concentración de células por mililitro (Ec. 3).

$$Cuenta\ total\ \left(\frac{células}{mL}\right) = \frac{Promedio\ de\ células}{4 \times 10^6 mL} \cdot Factor\ de\ dilución$$

Ec. 3

Se contaron 4 cuadros diferentes dentro del cuadro central de conteo y se promediaron estos 4 valores. Este promedio se tomó para la determinación de concentración de bacterias.

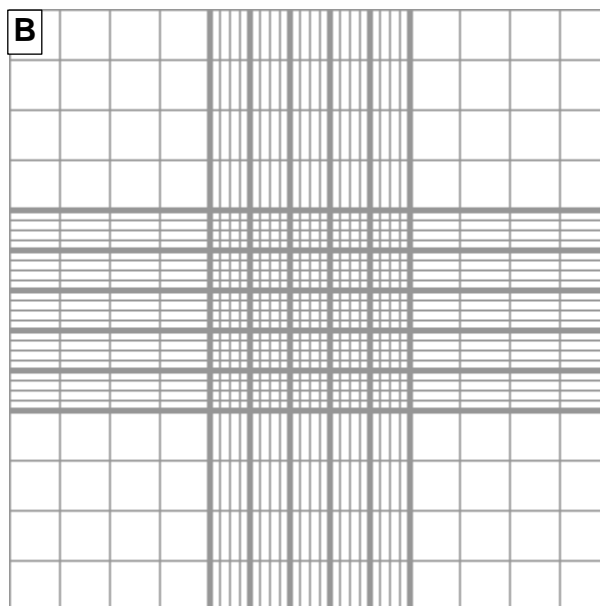


Figura 6-4 Cámara de Neubauer. A) Imagen de la cámara utilizada. B) Esquema del área de conteo, el cuadro central presenta la cuadrícula donde se realiza el conteo de células

6.4.2. Porcentaje de esporulación y concentración de esporas

Para la determinación de porcentaje de esporulación se tomaron muestras cada 6 horas, a partir de las 24 horas de cultivo. La muestra fue centrifugada (12,000 rpm x 5 min a 4°C) y el sobrenadante fue desechado. El paquete celular fue resuspendido en solución salina estéril (0.9 % NaCl y 0.05 % Tween 40), esto con la finalidad de lavar las células. Los lavados se repitieron dos veces más.

La identificación de las esporas se llevó a cabo por medio de tinción diferencial, de acuerdo con la metodología reportada por Soriano (2013). De la alícuota con células lavadas, se tomaron 40 µL y se colocaron en un portaobjetos. En un recipiente de metal se puso a hervir agua, una vez en ebullición se colocó una malla de metal y sobre esta se colocó el portaobjetos con la muestra. Se agregó verde de malaquita al 5% (solución acuosa filtrada con membrana de 0.45 µm) sobre la muestra en el portaobjetos, cuidando que la solución no se secase o hirviera, esto durante 10 minutos. El vapor de agua permitió permeabilizar las esporas, las cuales son estructuras más compactas en comparación con su forma vegetativa. Después de estos 10 minutos, se dejó enfriar por 2 minutos y se lavó con abundante agua destilada y se secó con aire. Las células vegetativas al ser permeables perdieron el color verde después del lavado, a diferencia de las esporas. Una vez seca la muestra, se le añadió fucsina fenicada diluida al 0.1% como colorante de contraste, la cual fue absorbida solo por las células vegetativas, permitiendo de esta forma distinguirlas de las esporas. Se dejó reposar por 5 minutos, se enjuagó con agua destilada y se secó con aire.

La muestra teñida se observó en un microscopio óptico Optiphot-2 Nikon, con el objetivo 100X y aceite de inmersión. Se tomaron alrededor de 15 fotos por muestra con el programa Image Pro Plus 4.1 Media Cybernetics, de tal modo que

fuese posible contar mil objetos. El cálculo del porcentaje de esporulación se obtuvo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{esporas} = \frac{\text{esporas}}{\text{esporas} + \text{celulas vegetativas}} * 100$$

Ec. 4

En la figura 6-5 se observa el resultado de una muestra después del proceso de tinción. Las esporas quedan teñidas de color verde, mientras que las células vegetativas de color fucsia.

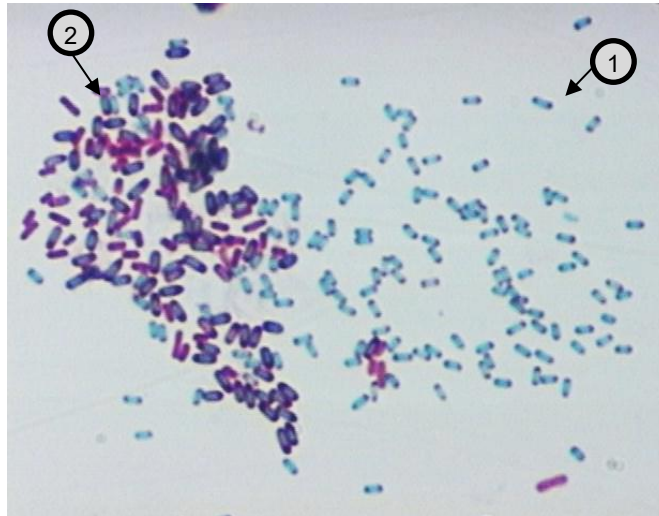


Figura 6-5 Tinción de *B. velezensis* 83. Las esporas (1), por la naturaleza resistente de sus cubiertas son capaces de retener el verde de malaquita. Las células vegetativas (2), al carecer de esta cubierta pierden el color verde y adoptan el color magenta que aporta la fucsina.

La concentración de esporas en el caldo se calculó con el porcentaje de esporulación obtenido con la ecuación previa, multiplicando dicho valor por el valor de la concentración obtenido en la cuenta total de células a la misma hora. La ecuación final queda de la siguiente forma:

Ec. 5

$$\text{Conc. de esporas} \left(\frac{\text{spo}}{\text{mL}} \right) = \% \text{esporas} * \text{Cuenta total}$$

6.4.3. Determinación de consumo de sustrato

Se tomaron alícuotas cada 4 horas las primeras 24 horas y cada 6 horas durante las 48 horas restantes del experimento. Las muestras fueron centrifugadas (12,000 rpm x 5 min a 4°C). El paquete celular fue descartado y el sobrenadante fue acidificado con 13 µL de HCl 3N por cada mL de muestra (para eliminar lipopéptidos). La muestra fue nuevamente centrifugada a 10,000 rpm por 5 minutos, recuperando el sobrenadante y descartando el precipitado.

El sobrenadante se analizó por cromatografía líquida (HPLC), utilizando una columna Aminex® HPX-87H (7.8x300 mm) de la marca BIO-RAD y H₂SO₄ 5 mM como fase móvil y un flujo de 0.6 mL/min a 50°C. Para el análisis se inyectaron 20 µL de muestra.

Para la identificación de las moléculas, se utilizó un detector de arreglo de fotodiodos (Waters 2996) y un detector de índice de refracción (Waters 2414). En el caso de arreglo de fotodiodos, se extrajo el cromatograma a una longitud de onda de 210 nm.

El consumo de glucosa se cuantificó en el cromatograma de índice de refracción (IR). Se realizó una curva de calibración utilizando estándar de glucosa (Sigma Aldrich). El área integrada bajo la curva se utilizaba en la siguiente ecuación para calcular la concentración en g/L:

$$\text{Glucosa} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = \frac{\text{Área}}{238401.6}$$

Ec. 6

Para el resto de los sustratos (en el caso de la solución modelo del exudado sintético), se analizaron estándares por separado de cada uno de los compuestos

y así, se determinaron los tiempos de retención de cada uno de ellos, los cuales se muestran en la tabla 6-4, así como los respectivos detectores utilizados. Solo la sacarosa y los aminoácidos (alanina y serina) no se lograron cuantificar por este método.

Las ecuaciones utilizadas para determinar la concentración en g/L de cada uno de los sustratos utilizados en la solución modelo fueron:

$$\text{Fructosa } \left(\frac{g}{L}\right) = \frac{\text{Área}}{268035} \quad \text{Ec. 7}$$

$$\text{Ácido cítrico } \left(\frac{g}{L}\right) = \frac{\text{Área}}{2459169} \quad \text{Ec. 8}$$

$$\text{Ácido succínico } \left(\frac{g}{L}\right) = \frac{\text{Área}}{1296741} \quad \text{Ec. 9}$$

$$\text{Ácido láctico } \left(\frac{g}{L}\right) = \frac{\text{Área}}{3437016} \quad \text{Ec. 10}$$

Tabla 6-4 Tiempos de retención para cada sustrato

Compuesto	Tiempo de retención (min)	
	Detector	
	IR (Waters 2414)	Diodos $\lambda=210$ nm (W2996)
<i>Glucosa</i>	8.85	
<i>Fructosa</i>	9.58	
<i>Ácido cítrico</i>		7.5
<i>Ácido succínico</i>		12.04
<i>Ácido láctico</i>		11.98

6.4.4. Determinación de producción de ácido acético, acetoína y butanodiol

La concentración de ácido acético, acetoína y de butanodiol se determinó en HPLC, y utilizando la misma columna (Aminex® HPX-87H) y el mismo método descrito para el caso de la determinación de consumo de sustrato. Se utilizaron los detectores de arreglo de diodos (Waters 2996), analizando las muestras en un intervalo de 200 a 220 nm de longitud de onda, y el índice de refracción (Waters 2414). Para la cuantificación del butanodiol se tomó lectura del cromatograma obtenido de índice de refracción. Para el ácido acético y la acetoína se tomó lectura del cromatograma de arreglo de diodos a una longitud de onda de 210 nm.

Utilizando estándares a diferentes concentraciones, se estableció una curva de calibración, de la cual es posible calcular las concentraciones de estos metabolitos en g/L.

Obteniendo lectura del área bajo la curva a los 14.7 min del cromatograma para calcular el ácido acético:

$$\text{Ácido acético} \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{\text{Área}}{1222471} \quad \text{Ec. 11}$$

La ecuación para la determinación de concentración de acetoína (17.2 min de tiempo de retención) es la siguiente:

$$\text{Acetoína} \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{\text{Área}}{837925} \quad \text{Ec. 12}$$

Por último, para la determinación de la concentración de butanodiol fue necesario hacer un ajuste al valor del área bajo la curva obtenida a los 18.5 min de retención, de acuerdo con lo descrito por Medina Valdez (2019). En el

cromatograma del índice de refracción, la acetoina se detectó al mismo tiempo de retención que el butanodiol, por lo que las señales se superponen. El ajuste consistió en una resta del área correspondiente para la concentración de acetoina, la cual fue previamente calculada del cromatograma de arreglo de diodos con la ecuación 12. La ecuación final fue la siguiente:

$$\text{Butanodiol} \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{\text{Área}_{IR} - (177517 \times \text{Concentración}_{\text{Acetoina}})}{216975}$$

6.4.5. Determinación de γ -PGA

La concentración de γ -PGA, en el caldo libre de células, se determinó por cromatografía de permeación de gel, usando una columna ultrahidrogel 500 (7.8x300 mm) marca Waters y una columna lineal con una precolumna acopladas al equipo de HPLC. Se inyectaron 100 μ L de muestra a través de la columna a una temperatura de 38°C. Como fase móvil se utilizó una solución de nitrato de sodio 0.1 M, a una velocidad de 0.8 mL/min. Se realizó una curva de calibración utilizando un estándar de γ -PGA (marca Sigma Aldrich), la curva se muestra en el anexo figura A-8. El área integrada y cuantificada obtenida del cromatograma resultante (índice de refracción Waters 2414) se utilizó en la siguiente ecuación, de modo que el resultado se exprese en g/L

$$\text{PGA} \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{\text{Área}}{648166}$$

Ec. 14

6.4.6. Determinación de bacilomicina D

La bacilomicina D producida por *B. velezensis* 83 y excretada en el sobrenadante fue determinada por HPLC. Se utilizó una columna Zorbax C8 (4.6x250 mm), de la marca Agilent. Las fases móviles consistieron en agua miliQ con TFA (ácido

trifluoracético) al 0.1 % y acetonitrilo con TFA al 0.1 %. Ambas fases fueron incorporadas por separado por diferentes líneas. Se inyectaron 50 µL de muestra por la columna con una velocidad de flujo de 0.5 mL/min y utilizando un programa de gradientes. El programa de gradientes consistió en una proporción inicial de fase móvil de 63:37 agua miliQ:acetonitrilo los primeros 12.5 minutos de corrida. Del minuto 13.5 al 26 la proporción de la fase móvil cambió a 20:80 y del minuto 27 al 35 regresó a 63:37. El tiempo entre cada cambio de proporción en la fase móvil fue de un minuto, y el tiempo de corrida total fue de 35 minutos a una temperatura de 30°C. Las muestras fueron analizadas con un detector de arreglo de diodos (Waters 2996) en un intervalo de longitud de onda de 200 a 210 nm. Se cuantificó el área bajo la curva de los cromatogramas a una longitud de onda de 205 nm. El valor del área se utilizó en la ecuación siguiente para obtener la concentración de bacilomicina D en mg/L:

Ec. 15

$$\text{Bacilomicina D} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{\text{Área}}{158745}$$

6.4.7. Determinación de consumo de sulfato de amonio

Se cuantificó el sulfato de amonio residual por el método colorimétrico de indofenol de acuerdo con lo reportado por Kaplan (1969). En esta técnica el amonio reacciona con hipoclorito de sodio para formar cloramina. Después, la cloramina reacciona con fenol en medio alcalino para formar p-hidroxifeniliminobenzoquinona (indofenol). Este cromógeno se mide por absorbancia a una longitud de onda de 635 nm.

El método consistió en agregar 1 mL de solución A (fenol 106 mM y nitroferrocianuro de sodio 0.17 mM en agua desionizada) a un tubo de microcentrífuga junto con 25 µL de la muestra. Después de homogenizar con agitador vórtex, se agregó 1 mL de solución B (hidróxido de sodio 0.125 N e hipoclorito de sodio 11 mM en agua desionizada) y se agitó nuevamente. La

reacción tomó 30 minutos y después de este tiempo se midió la absorbancia en el espectrofotómetro Genesys 10s UV-VIS (Thermo Fisher Scientific).

Los valores de absorbancia se utilizaron en la ecuación 16, donde ABS es la absorbancia, 0.5491 es el valor de la pendiente de la curva de la calibración y 0.132 el PM del sulfato de amonio en g/mmol.

$$\text{Sulfato de amonio } \left(\frac{g}{L}\right) = \frac{ABS}{0.5491} \times 0.132$$

Ec. 16

6.4.8. Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico de los parámetros cinéticos y la producción máxima de esporas y metabolitos (bacilomicina D, γ -PGA) utilizando el *software* Minitab® 18.1. A estas variables respuesta se les aplicó un análisis ANOVA de un factor y una comparación de medias de Tuckey, con una confianza del 95% ($\alpha = 0.05$).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Caracterización del cultivo “control” y el cultivo con solución modelo de *Bacillus velezensis* 83

En la primera etapa se realizó el cultivo de *Bacillus velezensis* 83 sin elicitores, denominado “cultivo control”, para caracterizar la cinética de éste (crecimiento vegetativo, esporulación, consumo de sustrato, producción de metabolitos, respirometría). Asimismo, se estudió el uso de una solución modelo de exudados sintéticos (compuesto por glucosa, fructosa, sacarosa, ácido cítrico, ácido láctico, ácido succínico, alanina y serina).

En la cinética del cultivo control, se observó que durante las primeras 12 horas *B. velezensis* 83 presentó la fase exponencial, con una velocidad de crecimiento de $0.32 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$ (figura 7-1A). Durante la fase estacionaria (de las 12 a 24 horas de cultivo), se alcanzó la concentración de células máxima de $6.32 \times 10^9 \pm 0.45 \times 10^9$ cel/mL. La glucosa se consumió por completo a las 20 horas de cultivo (figura 7-1B), y una vez agotada la fuente de carbono, las primeras esporas se formaron entre las 24 y 30 horas de cultivo (figura 7-1A). La evolución de la VTO no mostró que el cultivo control estuviera limitado por oxígeno, y se alcanzó una VTO máxima de $5.55 \pm 0.07 \text{ mmol O}_2/\text{L} \cdot \text{h}$ alrededor de las 8 horas de cultivo (figura 7-1C). Durante la fase estacionaria (entre 12 y 24 horas de cultivo) se formó un pico secundario, lo que indicó el consumo de otra fuente de carbono como los metabolitos de sobreflujo de carbono, acetoína y butanodiol, cuya concentración disminuyó entre las 12 y las 24 horas de cultivo (anexo figura A-12). La síntesis de bacilomicina D se presentó durante la fase estacionaria, con una concentración máxima de $15 \pm 0.05 \text{ mg/L}$ (figura 7-1D).

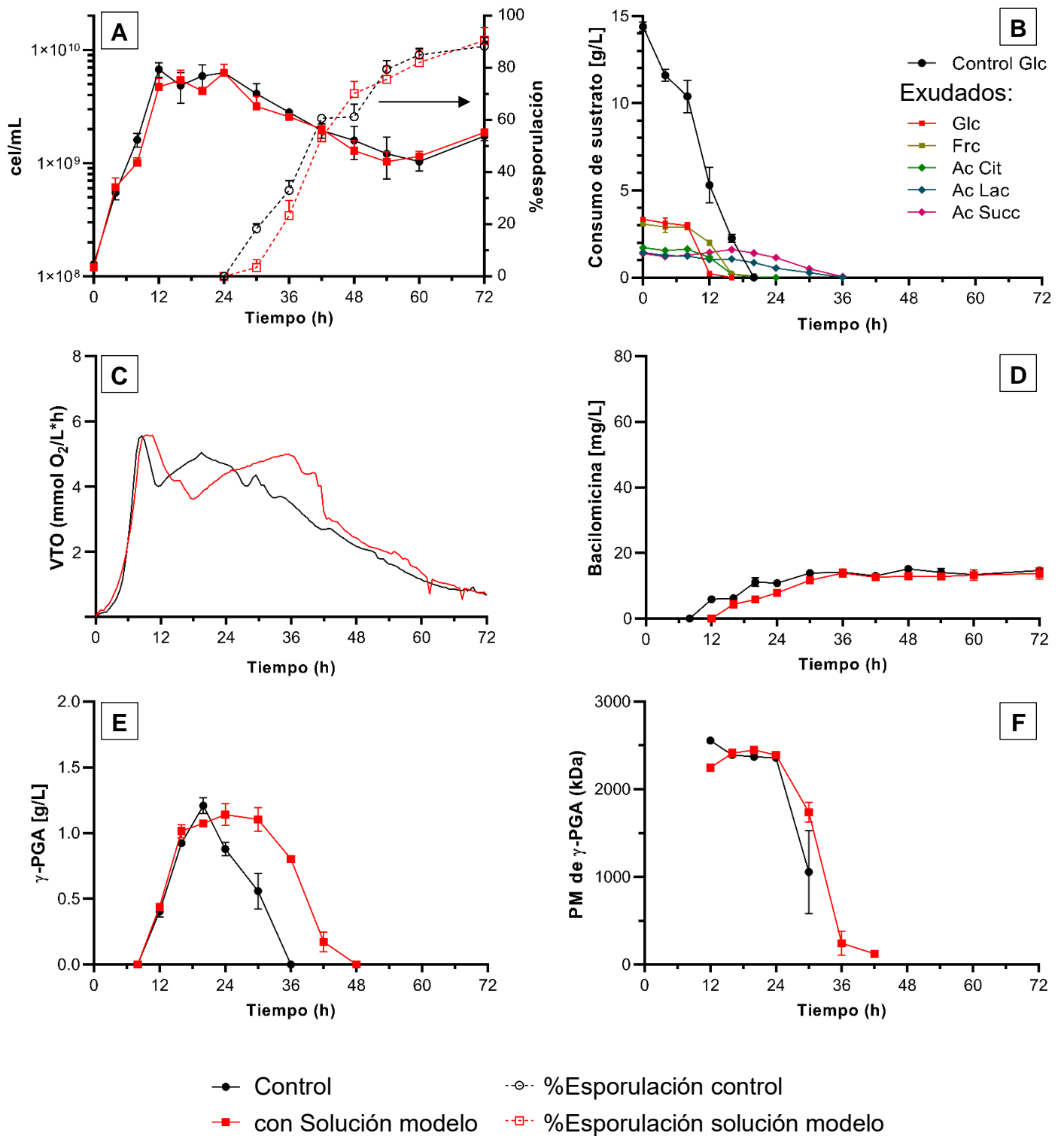


Figura 7-1. Caracterización cinética de *B. velezensis* 83 en cultivos control y con solución modelo de exudados sintéticos. A) Crecimiento vegetativo y porcentaje de esporulación. B) Consumo de sustrato. C) Velocidad de transferencia de oxígeno. D) Producción de bacilomicina D. E) Producción de γ -PGA. F) Peso molecular de γ -PGA.

La producción de γ -PGA también ocurrió durante la fase estacionaria, con una concentración máxima de 1.2 ± 0.06 g/L a las 20 horas de cultivo, para después ser consumido (figura 7-1E). El γ -PGA puede ser utilizado como un metabolito de reserva, y es degradado por enzimas depolimerasas al no haber otra fuente de carbono disponible (Hsueh *et al.*, 2017). El genoma de *B. velezensis* 83 cuenta con los genes que codifican para la glutamil hidrolasa involucrada en la depolimerización del γ -PGA (Balderas-Ruiz *et al.*, 2020). El peso molecular máximo del polímero fue de 2556 ± 33.6 kDa, observándose una depolimerización y una disminución importante del peso molecular a partir de las 24 horas de cultivo (figura 7-1F).

En el cultivo con la solución modelo, el crecimiento vegetativo de *B. velezensis* 83 mostró un perfil similar al observado en el cultivo control (figura 7-1A). La velocidad de crecimiento fue 0.29 ± 0.02 h⁻¹ y la concentración celular máxima alcanzada fue de $6.3 \times 10^9 \pm 1.18 \times 10^9$ cel/mL. Tanto la velocidad de crecimiento como la producción máxima de células no presentó una diferencia significativa en comparación con el cultivo control (anexo tablas A-2 y A-14). Las primeras esporas en el cultivo con la solución modelo se observaron alrededor de 6 horas después respecto del cultivo control, y posteriormente a este tiempo de cultivo los perfiles fueron similares. Considerando el déficit nutrimental como un detonante en la esporulación (Siebring *et al.*, 2014), la presencia de compuestos orgánicos de bajo peso molecular, como el ácido láctico y el ácido succínico (componentes de la solución modelo) hasta las 30 horas de cultivo, probablemente provocaron el retraso de la esporulación de *B. velezensis*.

Los azúcares empleados en la solución modelo (glucosa y fructosa) se agotaron entre las 12 y 18 horas de cultivo, mientras que los ácidos orgánicos (cítrico, láctico y succínico) se agotaron por completo hasta las casi 36 horas de cultivo (figura 7-1B). El perfil de velocidad de transferencia de oxígeno mostró un desarrollo diaúxico con valores de $VTO_{\text{máx}}$ de 5.58 y 5 mmol O₂/L*h para el primer y el segundo pico, respectivamente (figura 7-1C). Los picos de la diaúxia

concuerdan con los tiempos en los que se agotaron los azúcares (primer pico) y ácidos orgánicos (segundo pico).

La síntesis de bacilomicina D no cambió significativamente (anexo tabla A-4) con respecto al control, alcanzando una concentración máxima de 13.9 ± 1.3 mg/L (figura 7-1D). Además, la producción máxima de γ -PGA en el cultivo con la solución modelo fue similar a la obtenida en el cultivo control (anexo tablas A-10 y A-12), tanto en concentración (1.14 ± 0.08 g/L) como en peso molecular máximo (2449 ± 6.7 kDa) (figuras 7-1E y F). Sin embargo, en contraste con el cultivo control, el consumo de γ -PGA mostró una meseta de las 16 a las 30 horas de cultivo. Si bien los azúcares de la solución modelo se agotaron por completo para las 18 horas, los ácidos orgánicos se agotaron entre las 30 y 36 horas. La meseta formada en la gráfica del γ -PGA podría ser el resultado de un efecto de represión catabólica. Al haber ácidos orgánicos presentes en el caldo de fermentación, la expresión de las enzimas necesarias para la degradación del γ -PGA pudo verse inhibida (Grundy *et al.*, 1994; Stülke y Hillen, 2000).

Los resultados experimentales del cultivo de *B. velezensis* 83, utilizando una solución modelo de exudados sintéticos, no mostraron que esta formulación tuviera un efecto elicitor en la producción de esporas ni en la síntesis de bacilomicina D o de γ -PGA, ni en el crecimiento de la bacteria. Estos resultados contrastan con lo reportado por Baudoin *et al.* (2003). Sin embargo, en el cultivo con la solución modelo, la síntesis de ácido acético se vio favorecida en comparación con el cultivo control (anexo figura A-14). Asimismo, la presencia de ácido láctico y succínico entre las 24 y 30 horas sugiere una represión catabólica de en el inicio de consumo del γ -PGA y la producción de acetoina y butanodiol (anexo figura A-13). Además, en el cultivo con la solución modelo, el consumo de sulfato de amonio fue menor en comparación con el control (anexo figura A-12), lo que causaría una menor concentración de iones sulfato en el medio y evitaría una disminución del pH en comparación con el control (anexo figura A-11). Los compuestos presentes en exudados de raíces pueden servir como señales

químicas o como fuente de nutrientes (Ortiz-Castro *et al.*, 2009). La formulación utilizada en este trabajo no mostró

7.2. Cultivos elicitados con micelio inactivo de *C. gloeosporioides*

Para la segunda etapa del proyecto, se caracterizó cinéticamente a *B. velezensis* 83 bajo las mismas condiciones operacionales y nutricionales que el control, pero añadiendo 2 g/L de micelio inactivo de *C. gloeosporioides*, un hongo fitopatógeno antagonizado por *B. velezensis* 83 (Galindo *et al.*, 2013). En la figura 7-2 se comparan los resultados obtenidos con el cultivo control descrito en la sección anterior.

En el cultivo elicitado con micelio inactivo de *C. gloeosporioides*, *B. velezensis* 83 mostró un incremento significativo (anexo tabla A-2) en la velocidad de crecimiento ($0.44 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$) en comparación con el control (figura 7-2A). La fase exponencial, a diferencia del control, se presentó durante las primeras 8 horas de cultivo. La fase estacionaria del cultivo elicitado se presentó desde las 8 y hasta las 20 horas, alcanzando una concentración celular máxima de $7.58 \times 10^9 \pm 3.7 \times 10^9 \text{ cel/mL}$. A diferencia de la velocidad de crecimiento, en el cultivo con micelio la concentración máxima de células no fue significativamente diferente a la del cultivo control (anexo tabla A-14). A las 24 horas de cultivo, cuando aún no hay esporas en el control, el cultivo elicitado con micelio presentó un 58% de esporulación, alcanzando un 85% de esporulación a las 42 h (18h antes que en el cultivo control) (figura 7-2A). Si bien no se cuantificó la esporulación antes de las 24 horas de cultivo, la evolución del porcentaje de esporulación indica que este proceso inició incluso cuando todavía hay glucosa en el caldo de fermentación, la cual se agotó hasta las 20 horas de cultivo (figura 7-2B).

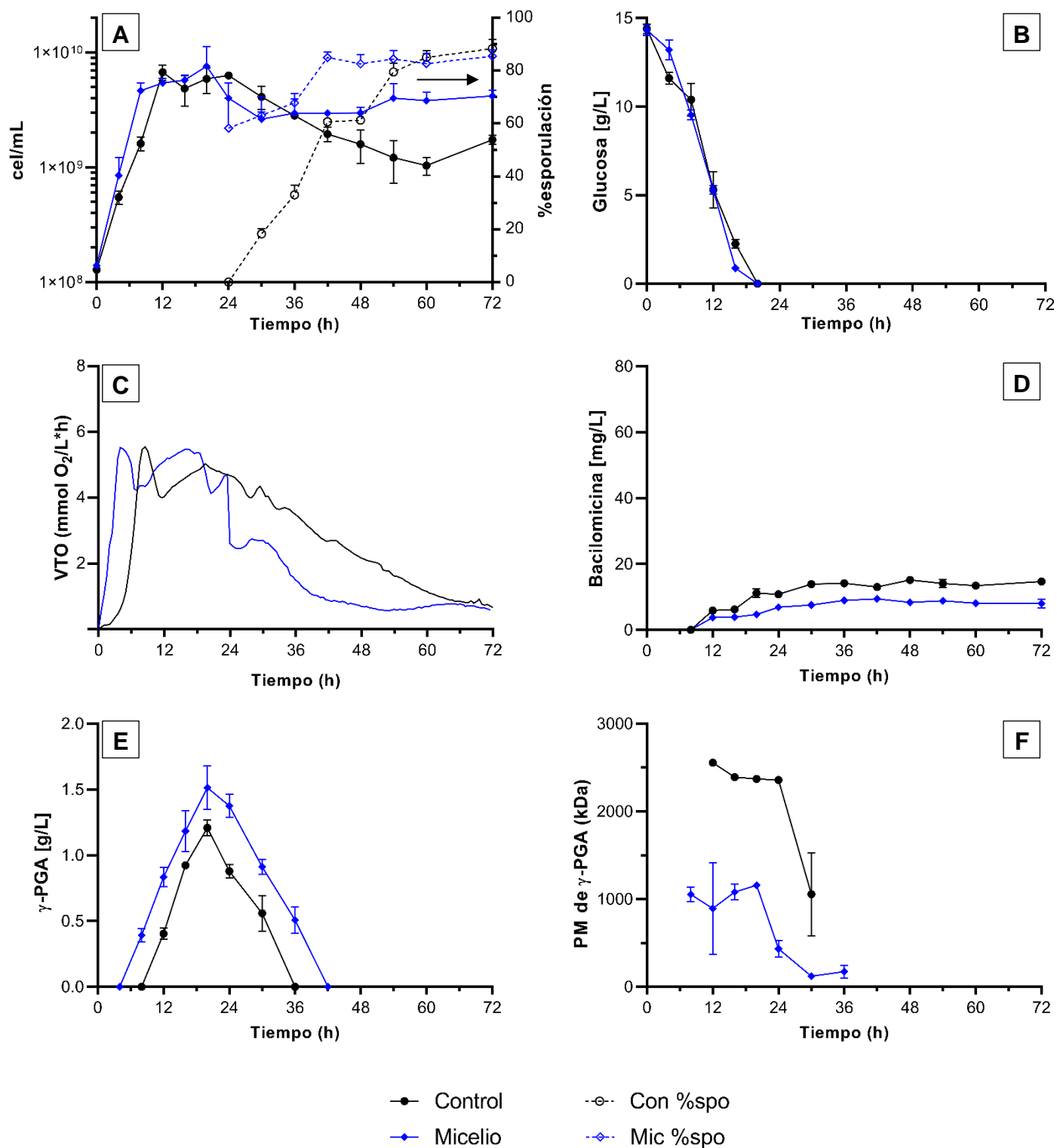


Figura 7-2. Caracterización cinética de *B. velezensis* 83 en cultivos con micelio inactivo de *C. gloeosporioides*. A) Crecimiento vegetativo y porcentaje de esporulación. B) Consumo de sustrato. C) Velocidad de transferencia de oxígeno. D) Producción de bacilomicina D. E) Producción de γ -PGA. F) Peso molecular de γ -PGA.

La velocidad de transferencia de oxígeno máxima fue de 5.53 ± 0.13 mmol O₂/L*h. Si bien no hay diferencia significativa con la VTO_{máx} del control (anexo tabla A-6), este valor se alcanzó en menor tiempo en comparación con el control (figura 7-2C), lo cual puede asociarse al incremento en la velocidad de crecimiento de la bacteria. Al igual que en el cultivo control, en la evolución de la VTO se formaron picos que coincidían con las fases del crecimiento celular. El primer pico de la VTO (asociado con la fase exponencial) se formó en las primeras 8 horas. El segundo pico se formó entre las 8 y las 20 horas (figura 7-2E). Por último, el decremento repentino de la VTO a partir de las 24 horas de cultivo posiblemente sea consecuencia del proceso de esporulación de las bacterias.

La producción de bacilomicina D disminuyó en el cultivo adicionado con micelio de *C. gloeosporioides*, alcanzando una concentración máxima de 9.4 ± 0.47 mg/L, la cual es 67.6% menor a la del cultivo control (figura 7-2D). Por otra parte, la producción de γ -PGA se incrementó significativamente en comparación con el control (20% más) (anexo tabla A-10), alcanzando una concentración de 1.5 ± 0.17 g/L. Además, la síntesis de este polímero inició 4 horas antes que en el cultivo control (figura 7-1E), lo que sugiere una elicitación en la producción de γ -PGA. Sin embargo, el peso molecular máximo de γ -PGA fue de 1157 ± 12.2 kDa, menos de la mitad del peso molecular del polímero obtenido en el control (figura 7-1F). Dentro del grupo de genes involucrados en la síntesis y degradación del γ -PGA se encuentra el gen *pgdS*, la cual codifica para la γ -D,L-glutamil hidrolasa (Hsueh *et al.*, 2017). El gen *pgdS* fue identificado en el genoma de *B. velezensis* 83 (Balderas-Ruíz *et al.*, 2020). Dicho esto, el efecto que tiene el micelio en el incremento de la síntesis de γ -PGA pudiera estar afectando la vía de degradación del γ -PGA, provocando la formación de cadenas poliméricas más cortas.

Se ha reportado en la literatura que *Bacillus* spp. es capaz de incrementar la producción de lipopéptidos al entrar en contacto con diferentes patógenos (DeFilippi *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2014). La concentración y el tipo de lipopéptido se ve afectado dependiendo del patógeno utilizado en los cultivos (DeFilippi *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2014). Aunque, esto no ocurrió en cultivos de *B. velezensis* 83

adicionados con micelio inactivo de *C. gloeosporioides*, se observó un incremento en la velocidad de crecimiento en comparación con el cultivo control. Además, los procesos de esporulación y síntesis de γ -PGA iniciaron antes que en el cultivo control. Si bien el inicio anticipado de estos procesos puede ir de la mano con el incremento de la velocidad de crecimiento, también se obtuvieron mayores concentraciones de esporas (figura 7-6) γ -PGA que en el cultivo control.

En un ambiente cuyas condiciones son favorables para que *Bacillus* spp. crezca y se multiplique, la esporulación es un último recurso para asegurar la supervivencia de estas bacterias (Hoch, 1993). No obstante, se ha demostrado que, al estar expuesto a patógenos, se puede inducir una esporulación temprana en *Bacillus* spp., así como la producción de un mayor número de esporas (Grandchamp *et al.*, 2017; Molina-Santiago *et al.*, 2019; Müller *et al.*, 2014). Lee *et al.* (2005) demostraron que *Bacillus lentimorbus* WJ5, en presencia de *C. gloeosporioides*, aumenta la expresión de genes involucrados en la competencia por nutrientes y en el inicio de la esporulación. Sin embargo, no se ha descrito los mecanismos de señalización involucrados o las moléculas que participan en esta inducción. La evolución del porcentaje de esporulación en el cultivo adicionado con micelio muestra que este proceso inicia incluso cuando todavía hay glucosa en el medio de cultivo. Siendo la inanición uno de los detonantes más importantes en la esporulación (Siebring *et al.*, 2014), es claro que el micelio inactivo tiene un papel importante en el inicio anticipado de la esporulación.

7.3. Cultivos elicitados con α -celulosa y arabinogalactano (polisacáridos componentes de pared celular vegetal)

En la tercera etapa experimental se caracterizó cinéticamente a *B. velezensis* 83 en presencia de polisacáridos. Se evaluaron dos polisacáridos de manera independiente, α -celulosa y arabinogalactano, utilizando una concentración de 2 g/L para cada cultivo.

Al igual que en el control, la fase exponencial se presentó durante las primeras 12 horas de cultivo (figura 7-3A). Para el cultivo elicitado con α -celulosa, la velocidad de crecimiento disminuyó en comparación con el control (anexo tabla A-2), con un valor de $0.28 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$. Mientras que la concentración celular máxima no fue significativamente diferente (anexo tabla A-14), con un valor de $7.48 \times 10^9 \pm 0.15 \times 10^9 \text{ cel/mL}$. El perfil de porcentaje de esporulación mostró no haber una anticipación o retraso en el inicio de la esporulación respecto al cultivo control (figura 7-3A). La glucosa se consumió por completo a las 20 horas, al igual que en el cultivo control (figura 7-3B). El perfil de velocidad de transferencia de oxígeno fue similar al control y no se observaron diferencias significativas en la $VTO_{\text{máx}}$ del cultivo con α -celulosa ($5.64 \pm 0.06 \text{ mmol O}_2/\text{L} \cdot \text{h}$) (figura 7-3C; anexo tabla A-6). La producción de bacilomicina D en el cultivo con α -celulosa se vio incrementada hasta casi cuatro veces respecto al cultivo control (figura 7-3D; anexo tabla A-4). La concentración máxima de bacilomicina D fue de $57.3 \pm 8.2 \text{ mg/L}$. No hubo diferencias significativas en la producción máxima de γ -PGA en el cultivo con α -celulosa ($1.1 \pm 0.05 \text{ g/L}$) (figura 7-3E; anexo tabla A-10). El peso molecular máximo del polímero presentó una disminución significativa respecto al control ($1946 \pm 22.3 \text{ kDa}$) (figura 7-3F; anexo tabla A-12).

En el cultivo con arabinogalactano la velocidad de crecimiento fue de $0.29 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$ y se alcanzó una concentración celular máxima de $6.42 \times 10^9 \pm 0.44 \times 10^9 \text{ cel/mL}$. Ninguno fue significativamente diferente respecto al cultivo control (anexo tablas A-2 y A-14). Al igual que en el cultivo con α -celulosa, el perfil de porcentaje de esporulación no mostró diferencia respecto del control y la glucosa se agotó por completo a las 20 horas de cultivo. La $VTO_{\text{máx}}$ de $5.69 \pm 0.04 \text{ mmol O}_2/\text{L} \cdot \text{h}$, no mostró ser significativamente diferente al control (anexo tabla A-6). La concentración máxima de bacilomicina D en los cultivos con arabinogalactano fue de $49.8 \pm 4.2 \text{ mg/L}$, significativamente mayor al cultivo control (anexo tabla A-4). La producción de PGA en el cultivo con arabinogalactano fue de $1.4 \pm 0.04 \text{ g/L}$ (figura 7-3E). El peso molecular máximo de γ -PGA fue de $2137 \pm 35.9 \text{ kDa}$. Al igual que el cultivo con α -celulosa, la concentración de γ -PGA no fue

significativamente diferente en comparación con el cultivo control, pero el peso molecular máximo fue significativamente menor.

De las diferentes respuestas de interés para este estudio, solo la producción de bacilomicina D se incrementó en presencia tanto de α -celulosa, como de arabinogalactano. En la literatura se ha descrito el efecto de polisacáridos en el incremento de la producción de la surfactina por parte de *Bacillus* spp. (Debois *et al.*, 2015). En este estudio propusieron que el patrón molecular de un polisacárido de pared celular funciona como detonante en el incremento de la síntesis de los cLPs. Murphy *et al.*, (2007) por su parte, evaluaron diferentes oligosacáridos como elicitores en la producción de bacitracina A en *Bacillus licheniformis* NCIMB 8874. A partir de los resultados de ese estudio, propusieron que el mecanismo por el cual se incrementa la producción de metabolitos secundarios es a través de una interacción elicitor-receptor celular, la cual desemboca en una cascada de señalización dentro de la célula. La capacidad de detectar a polisacáridos presentes en plantas está conservada en las cepas de *Bacillus* que son PGPB (Beauregard *et al.*, 2013). Aunque se desconoce el mecanismo por el cual se elicitaba esta respuesta, se ha observado que este fenómeno no sucede con los monómeros de los polisacáridos, solo con su forma polimérica (Beauregard *et al.*, 2013; Debois *et al.*, 2015).

B. velezensis 83 cuenta en su genoma con genes que codifican para enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos y en la degradación de compuestos de pared celular vegetal (Balderas-Ruíz *et al.*, 2020). Si bien los polisacáridos pueden ser fuente de carbono, no se observó un incremento significativo en la producción de γ -PGA ni de metabolitos de sobreflujo de carbono (acetoina, butanodiol y ácido acético) (anexo figuras A-13 y A-14). La VTO por su parte, es un reflejo del crecimiento celular y el metabolismo central de la bacteria (Regestein née Meissner *et al.*, 2017). Dicho esto, la evolución de la VTO de los cultivos con polisacáridos muestra un comportamiento metabólico similar al cultivo control (figura 7-3C).

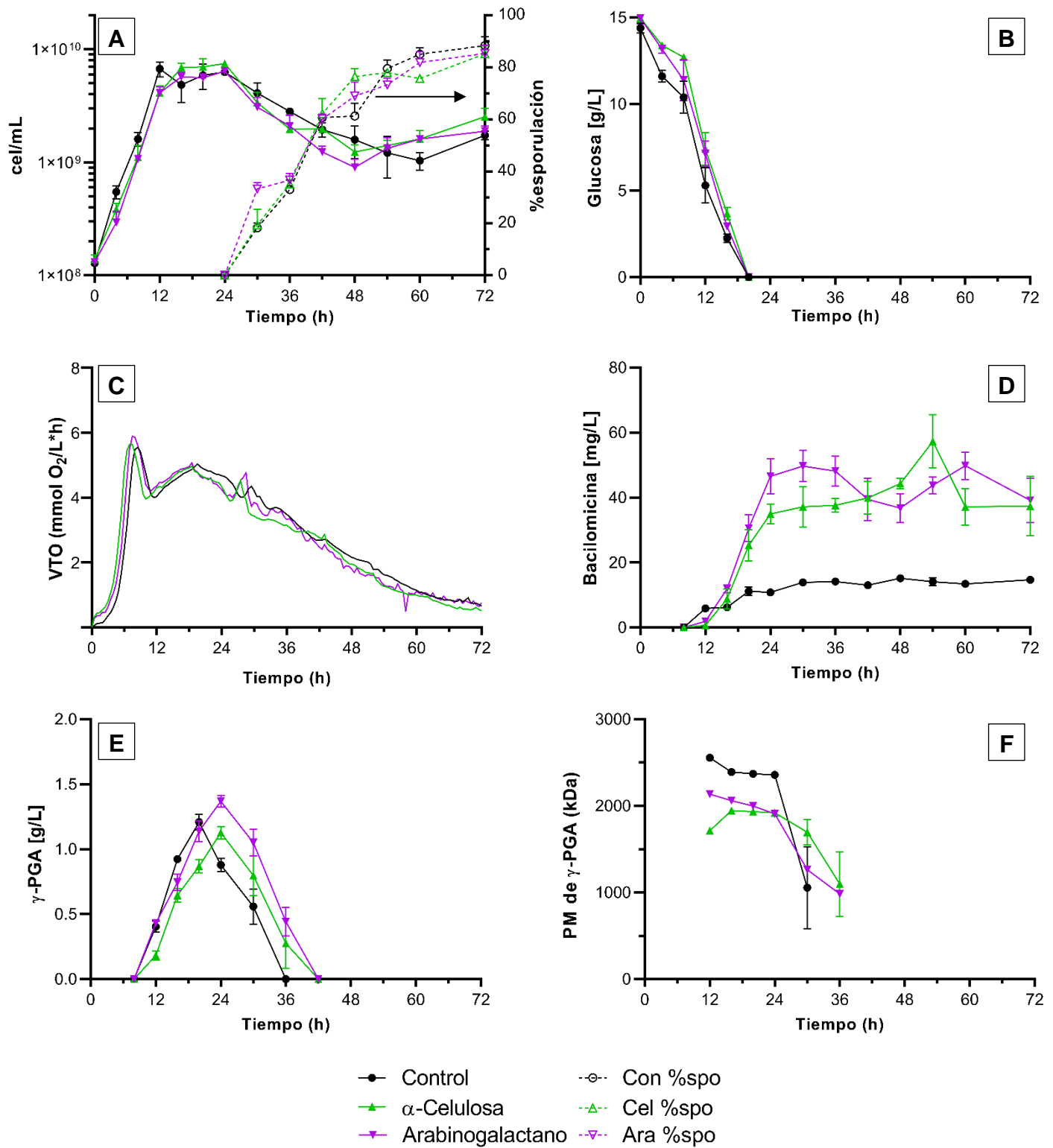


Figura 7-3. Caracterización cinética de *B. velezensis* 83 en cultivos con polisacáridos (α -celulosa y arabinogalactano). A) Crecimiento vegetativo y porcentaje de esporulación. B) Consumo de sustrato. C) Velocidad de transferencia de oxígeno. D) Producción de bacilomicina. E) Producción de γ -PGA. F) Peso molecular de γ -PGA.

7.4. Evaluación de cultivos con dos elicitores simultáneos (micelio inactivo y arabinogalactano).

Para evaluar una posible coexistencia de los efectos observados en las etapas anteriores, se analizó el efecto conjunto de micelio inactivo de *C. gloeosporioides* y del arabinogalactano, utilizando las mismas concentraciones de cada elicitor (2 g/L de cada uno). En la figura 7-4 se presentan los resultados del cultivo de *B. velezensis* 83 con dos elicitores simultáneos y se comparan con los resultados obtenidos en los cultivos con micelio inactivo y con arabinogalactano evaluados de forma independiente.

La fase exponencial se presentó durante las primeras 12 horas de cultivo, a diferencia del cultivo con micelio inactivo que duró solo 8 horas (figura 7-4A). La velocidad de crecimiento microbiano fue de $0.42 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$, similar a la velocidad de crecimiento del cultivo con micelio y significativamente mayor que del cultivo control (anexo tabla A-2). En la concentración celular máxima no hubo diferencia significativa con el control ($9.1 \times 10^9 \pm 2.55 \times 10^9 \text{ cel/mL}$). Al igual que los demás cultivos, la glucosa se consumió por completo a las 20 horas de cultivo (figura 7-4C). Sin embargo, las primeras esporas se observaron alrededor de las 16 horas (figura 7-4B), aun cuando en el medio de cultivo había fuente de carbono (glucosa) (marcado con línea roja en el gráfico). El perfil de velocidad de transferencia de oxígeno fue similar al perfil del cultivo elicitado solo con micelio (figura 7-4D). La $V_{TO_{\text{máx}}}$ de $5.36 \pm 0.02 \text{ mmol O}_2/\text{L} \cdot \text{h}$ no es significativamente diferente a la de los demás cultivos (anexo tabla A-6).

Aunque la síntesis de bacilomicina D fue el doble de la obtenida en el cultivo elicitado solo con micelio, con una concentración máxima de $19.7 \pm 2.0 \text{ mg/L}$, sigue siendo significativamente menor a la obtenida en el cultivo con solo arabinogalactano (figura 7-5A; anexo tabla A-4). La síntesis de γ -PGA fue similar a la obtenida en el cultivo con micelio, con una concentración máxima de $1.6 \pm 0.04 \text{ g/L}$ (figura 7-5B; anexo tabla A-10). El peso molecular máximo de γ -PGA fue de $2491 \pm 218.2 \text{ kDa}$, siendo significativamente mayor al obtenido en el cultivo con micelio (figura 7-5C; anexo tabla A-12).

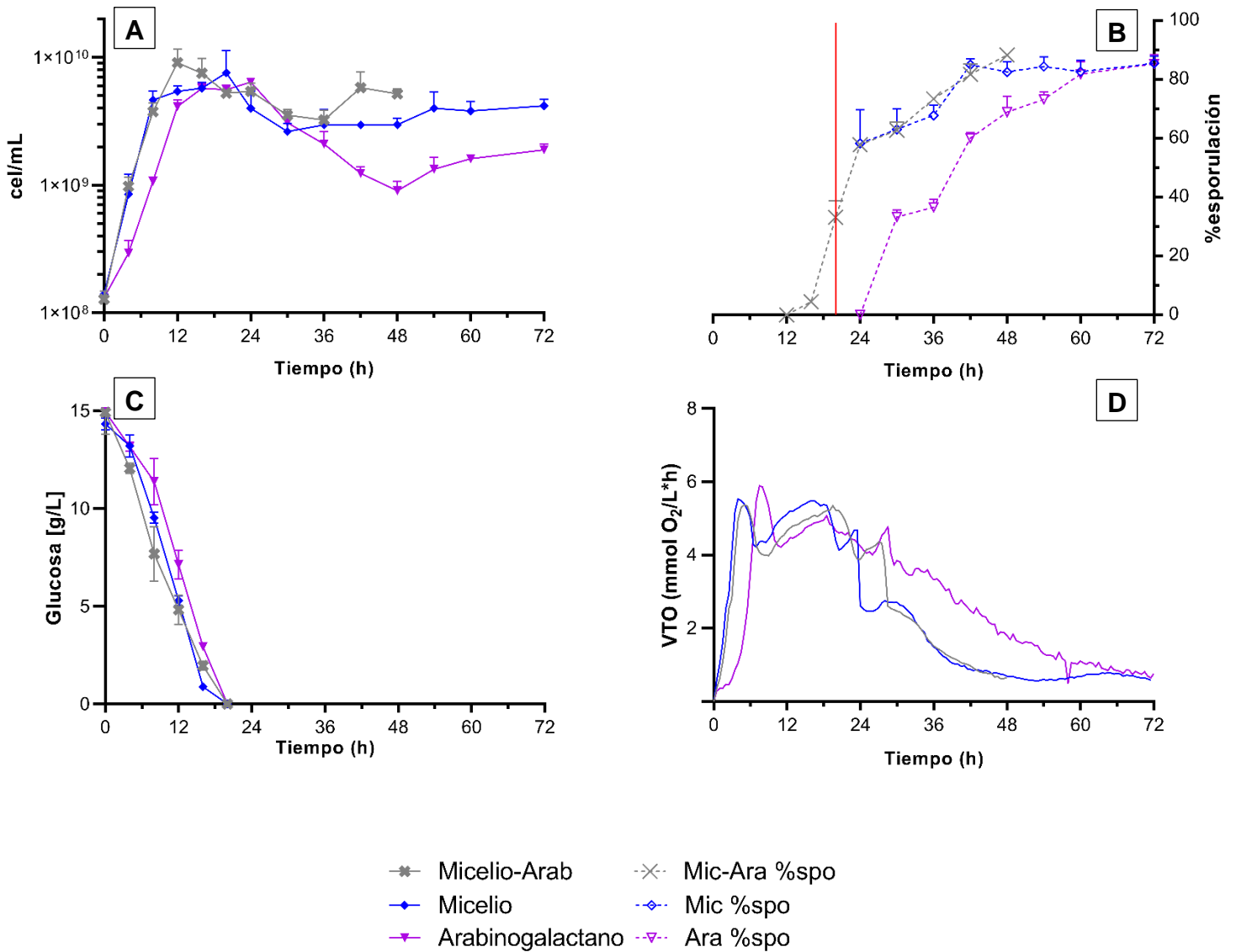


Figura 7-4. Caracterización cinética de *B. velezensis* 83 en cultivos con dos elicitores simultáneos. A) Crecimiento vegetativo. B) Porcentaje de esporulación. C) Consumo de glucosa. D) Velocidad de transferencia de oxígeno. La línea roja marca el agotamiento de glucosa en el medio.

Bacillus spp. tienen la capacidad de detectar señales ambientales y, mediante un proceso de diferenciación celular, tomar diferentes subpoblaciones: células mineras (productoras de enzimas líticas y antibióticos), células motiles, células competentes (capaces de incorporar ADN exógeno), productoras de surfactina,

formadoras de *biofilm*, caníbales (productoras de péptidos capaces de lisar otras células) y esporas (López *et al.*, 2008). Esta capacidad de multicelularidad le da la ventaja a *Bacillus* spp. de desempeñar diversas funciones simultáneamente y subsistir (Shank y Kolter, 2011).

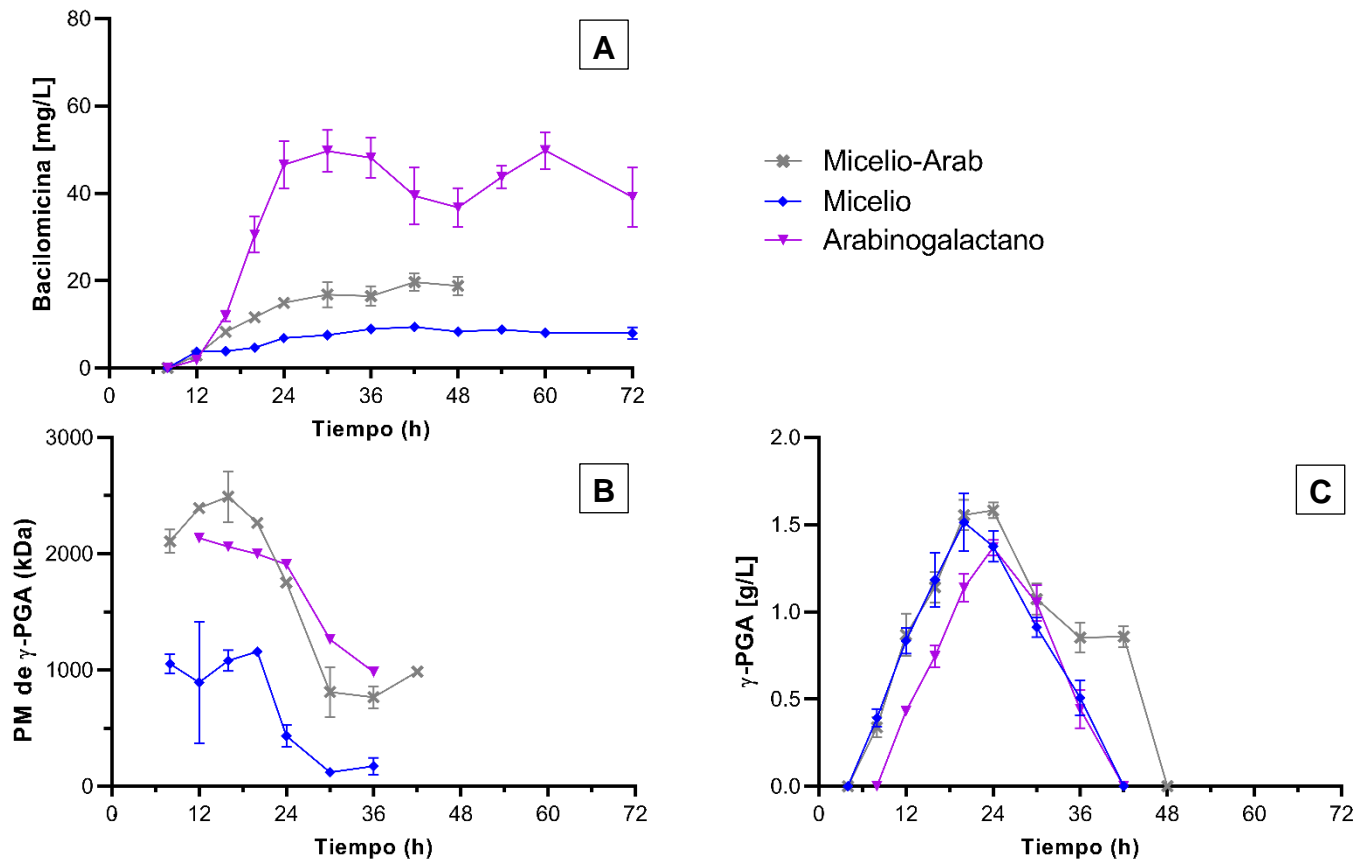


Figura 7-5. Producción de metabolitos en cultivos de *B. velezensis* 83 con dos elicitores simultáneos. A) Bacilomicina D. B) γ -PGA. C) Peso molecular de γ -PGA.

En las etapas experimentales anteriores se observó el efecto que tiene el micelio inactivo de *C. gloeosporioides* en favorecer la diferenciación hacia la formación de esporas. Además, se observó el efecto de los polisacáridos en la producción de bacilomicina D. En consideración a lo anterior, se evaluó la posibilidad de obtener

efectos coexistentes en un mismo cultivo al utilizar ambos elicitores simultáneamente. Sin embargo, se puede observar la predominancia de las respuestas observadas en cultivos de *B. velezensis* 83 con micelio inactivo (velocidad de crecimiento, esporulación y producción de γ -PGA). No obstante, el peso molecular del γ -PGA es mayor al obtenido en el cultivo con micelio inactivo (anexo tabla A-12). Esto sugiere que el efecto del micelio es mayor que, o interfiere con, el efecto que pueda tener el arabinogalactano en *B. velezensis* 83. Aunado a esto, la producción de bacilomicina (aunque no es significativamente mayor que la obtenida en el cultivo control) fue el doble a la obtenida en el cultivo con micelio inactivo. Por ello, otro posible escenario es que en el cultivo con micelio y arabinogalactano haya subpoblaciones, una predominante originada por el efecto del micelio y otra minoritaria originada por el efecto del arabinogalactano.

7.5. Comparación de los diferentes cultivos elicitados

En este proyecto se evaluó el efecto de diferentes elicitores en la producción de γ -PGA, bacilomicina D y esporas en cultivos de *B. velezensis* 83. Además de la cuantificación de estos parámetros, se hicieron uso de otras herramientas. Se observó que el uso de estos elicitores en cultivos de *B. velezensis* 83 no tienen un efecto positivo o negativo en la producción de células vegetativas (anexo tabla A-14). Asimismo, con el equipo RAMOS, se determinó que en ninguno de los cultivos hubo limitación de oxígeno.

Como se había mencionado en secciones anteriores, el micelio inactivo de *C. gloeosporioides* tuvo un efecto positivo en la velocidad de esporulación de *B. velezensis* 83. Aunado a esto, las mayores concentraciones de esporas en el medio de fermentación se obtuvieron en los cultivos con micelio inactivo (tabla 7-1). La concentración de esporas en cultivos adicionados solo con micelio inactivo fue de 2.3 veces más respecto al control, mientras que en cultivos con micelio y arabinogalactano se obtuvo 3.1 veces más que en el cultivo control.

Tabla 7-1. Concentraciones máximas de esporas y productividad.

Condición	Concentración de esporas máxima (10^9 esporas/mL)	Productividad máxima (10^7 esporas/mL *h)
Control	1.54 ± 0.19^A	$2.14 \pm 0.26^{A+}$
Solución modelo	1.70 ± 0.06^A	$2.35 \pm 0.08^{A+}$
Micelio	$3.57 \pm 0.38^{B C}$	$9.26 \pm 1.43^{B*}$
α -celulosa	$2.17 \pm 0.49^{A B}$	$3.02 \pm 0.68^{A+}$
Arabinogalactano	1.61 ± 0.18^A	$2.24 \pm 0.25^{A+}$
Micelio + arabinogalactano	4.74 ± 1.49^C	$13.1 \pm 2.36^{C*}$

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. *La productividad se calculó a las 24 horas de cultivo. + La productividad se calculó a las 72 horas de cultivo.

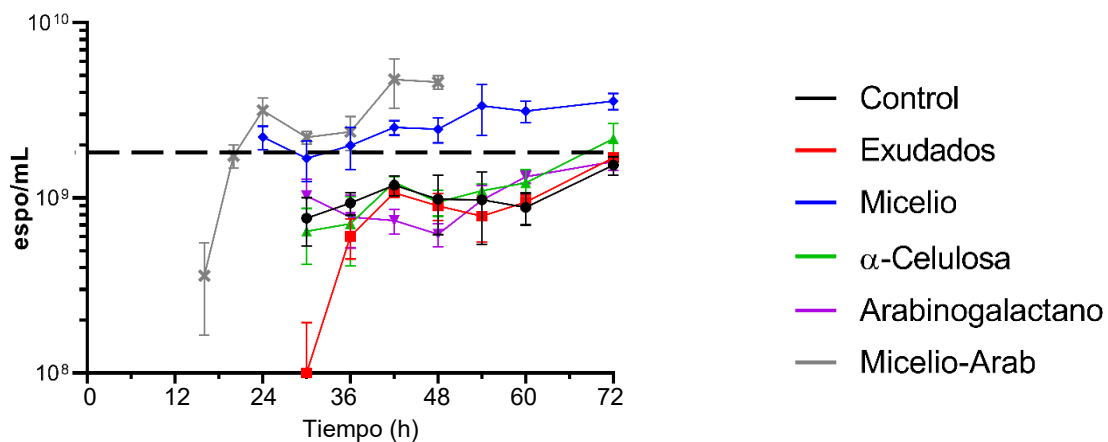


Figura 7-6. Evolución de concentración de esporas. La línea punteada marca la concentración máxima de esporas alcanzada en los cultivos sin micelio.

Además de obtener las mayores concentraciones de esporas, en los cultivos con micelio (solo y con arabinogalactano) se obtuvieron altas concentraciones de

esporas en menos tiempo que en el resto de los cultivos (figura 7-6). Para el cultivo control, y el resto de los cultivos que no fueron adicionados con micelio, la máxima concentración de esporas se obtuvo a las 72 horas de cultivo. Mientras que los cultivos con micelio superaban estos valores para las 24 horas de cultivo. La productividad del proceso de formación de esporas aumentó entre 4.33 y 6.12 veces utilizando micelio en comparación con el cultivo control. La productividad máxima lograda en cultivos sin micelio es a las 72 horas, mientras que en cultivos con micelio es a las 24 horas. Esto significa que, el uso de micelio inactivo reduciría potencialmente el tiempo de operación de hasta 48 horas en un proceso de producción de esporas en comparación con el control.

8. CONCLUSIÓN

Conclusión general

Los cultivos de *B. velezensis* 83 elicitados son una estrategia efectiva para incrementar la producción de metabolitos y la producción de esporas. La respuesta que se pudiese generar antes estos elicitores depende del elicitador empleado.

Conclusiones específicas

En este trabajo se reporta por primera vez:

- Un incremento de hasta 4.3 veces en la productividad de producción de esporas de *B. velezensis* 83 en cultivos elicitados con micelio no viable de *C. gloeosporioides* y 6.1 veces en los cultivos de micelio y arabinogalactano. Asimismo, se logró incrementar 2.3 y 3.1 veces la concentración de esporas en cultivos elicitados con micelio y con micelio y arabinogalactano respectivamente.
- El micelio no viable de *C. gloeosporioides* incrementa la velocidad específica de crecimiento de *B. velezensis* 83 1.3 veces respecto al cultivo control.
- Los polisacáridos (componentes de pared celular vegetal) tienen un efecto elicitador en la producción de bacilomicina D, aumentando hasta casi 4 veces su concentración en comparación con el control.
- La concentración de γ -PGA aumenta hasta 20% en cultivos elicitados con micelio no viable.

9. PERSPECTIVAS

- En cultivos donde se utilizan dos o más elicitores simultáneamente, para evaluar una posible coexistencia de respuestas obtenidas en cultivos con un solo elicitador, pudieran formarse subpoblaciones de *B. velezensis* 83. Se propone evaluar la formación de dichas subpoblaciones y la proporción de estas, resultantes de la heterogeneidad celular de *Bacillus* spp.
- Analizar la expresión de los genes involucrados en la regulación de las respuestas observadas en los cultivos elicitados con micelio no viable de *C. gloeosporioides*, α -celulosa y arabinogalactano (esporulación y síntesis de bacilomicina D y γ -PGA). Esto daría paso para identificar las vías de señalización que participan como consecuencia a la adición de dichos elicitores.
- Si bien resulta de interés producir concentraciones altas de esporas, también es importante asegurar que estas sean capaces de germinar y retomar su ciclo vegetativo *in planta*. Se propone analizar la capacidad de germinación y producción de metabolitos de las esporas obtenidas en cultivos adicionados con micelio inactivo de *C. gloeosporioides*.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Adeniji, A.A., Loots, D.T., & Babalola, O.O. (2019). *Bacillus velezensis*: phylogeny, useful applications, and avenues for exploitation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 103(9). 3669-3682.
- Anderlei, T. & Büchs, J. (2001). Device for sterile online measurement of the oxygen transfer rate in shaking flasks. *Biochemical Engineering Journal*. Vol. 7. 157-162.
- Andrić, S., Meyer, T., & Ongena, M. (2020). *Bacillus* responses to plant-associated fungal and bacterial communities. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 11. 1-9.
- Bais, H.P., Fall, R., & Vivanco, J.M. (2004). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiology*. Vol. 134. 307-319.
- Balderas-Ruíz, K.A., Bustos, P., Santamarina, R.I., González, V., Cristiano-Fajardo, S.A., Barrera-Ortíz, S., Mezo-Villalobos, M., Aranda-Ocampo, S., Guevara-García, A.A., Galindo, E., & Serrano-Carreón, L. (2020). *Bacillus velezensis* 83 a bacterial strain from mango phyllosphere, useful for biological control and plant growth promotion. *AMB Express*. Vol. 10(163).
- Bajaj, I., & Singhal, R. (2011). Poly (glutamic acid) – An emerging biopolymer of commercial interest. *Bioresource Technology*. Vol. 102. 5551-5561.
- Baral, B., Akhgari, A., & Metsä-Ketelä, M. (2018). Activation of microbial secondary metabolic pathways: Avenues and challenges. *Synthetic and Systems Biotechnology*. Vol. 3(3). 163-178.
- Baudoin, E., Benizri, E., & Guckert, A. (2003). Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry*. Vol. 35. 1183-1192.
- Beauregard, P.B., Chai, Y., Vlamakis, H., Losick, R., & Kolter, R. (2013). *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. Vol. 110(17). 1621-1630.
- Becker, D.M., Kinkel, L.L., & Schottel, J.L. (1997) Evidence for interspecies communication and its potential role in pathogen suppression in a naturally occurring disease suppressive soil. *Canadian Journal of Microbiology*. Vol.43. 985-990.
- Bertrand, S., Bohni, N., Schnee, S., Schumpp, O., Gindro, K., & Wolfender, J. (2014). Metabolite induction via microorganism co-culture: A potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. *Biotechnology Advances*. Vol. 32. 1180-1204.

- Canarini, A., Kaiser, C., Merchant, A., Richter, A., & Wanek, W. (2019). Root exudation of primary metabolites: Mechanisms and their role in plant responses to environmental stimuli. *Frontiers in Plant Science*. Vol. 10. 1-19.
- Cao, Y., Pi, H., Chandrangsu, P., Li, Y., Wang, Y., Zhou, H., Xiong, H., Helmann, J.D., & Cai, Y. (2018). Antagonism of two plant-growth promoting *Bacillus velezensis* isolates against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. *Scientific Reports*. Vol. 8(4360). 1-14.
- Cawoy, H., Debois, D., Franzil, L., De Pauw, E., Thonart, P., & Ongena, M. (2014). Lipopeptides as main ingredients for inhibition fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*. *Microbial Biotechnology*. Vol 8(2). 281-295.
- Chávez-Díaz, I.F., Angoa-Pérez, V., López-Díaz, S., Velázquez-Del Valle, M.G., & Hernández-Lauzardo, A.N. (2014). Antagonistic bacteria with potential for biocontrol on *Rhizopus stolonifer* obtained from blackberry fruits. *Fruits*. Vol. 69(1). 41-46.
- Chen, X.H., Koumoutsi, A., Scholz, R., & Borriss, R. (2009). More than anticipated – production of antibiotics and other secondary metabolites by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of Molecular Biology and Biotechnology*. Vol. 16. 14-24.
- Chowdhury, S.P., Hartmann, A., Gao, X., & Borriss, R. (2015). Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 – a review. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 6(780). 1-11.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clémen, C., & Barka, E.A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 71(9). 4951-4959.
- Cook, R. J. (1993). Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. Vol. 31(1). 53–80.
- Cristiano-Fajardo, S.A., Flores, C., Flores, N., Tinoco-Valencia, R., Serrano-Carreón, L., Galindo, E. (2019). Glucose limitation and glucose uptake rate determines metabolite production and sporulation in high cell density continuous cultures of *Bacillus amyloliquefaciens* 83. *Journal of Biotechnology*. Vol. 299. 59-65.
- Dang, Y., Zhao, F., Liu, X., Fan, X., Huang, R., Gao, W., Wang, S., & Yang, C. (2019). Enhanced production of antifungal lipopeptide iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* LL3 through metabolic engineering and culture conditions optimization. *Microbial Cell Factories*. Vol. 18(68). 1-14.
- Debois, D., Fernandez, O., Franzil, L., Jourdan, E., De Brogniez, A., Willems, L., Clément, C., Dorey, S., De Pauw, E., & Ongena, M. (2015). Plant polysaccharides initiate underground crosstalk with bacilli by inducing synthesis of the immunogenic lipopeptide surfactin. *Environmental Microbiology Reports*. Vol. 7(3). 570-582.

- DeFilippi, S., Groulx, E., Megalla, M., Mohamed, R., & Avis, T.J. (2018). Fungal competitors affect production of antimicrobial lipopeptides in *Bacillus subtilis* strain B9-5. *Journal of Chemical Ecology*. Vol. 44. 374-383.
- Emmert, E.A.B., & Handelsman, J. (1999). Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiology Letters*. Vol. 171. 1-9.
- Errington, J. (1993). *Bacillus subtilis* sporulation: Regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiological Reviews*. Vol. 57(1). 1-33.
- Errington, J. (2003). Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology*. Vol. 1(2). 117–126.
- Fan, B., Carvalhais, L.C., Becker, A., Fedoseyenko, D., von Wirén, N., & Borriss, R. (2012). Transcriptomic profiling of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 in response to maize root exudates. *BMC Microbiology*. Vol. 12. 1-13
- Fan, B., Wang, C., Song, X., Ding, X., Wu, L., Wu, H., Gao, X., & Borriss, R. (2018). *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 9. 1-14.
- Flores, C., Medina-Valdez, A., Peña, C., Serrano-Carreón, L., & Galindo, E. (2020). Oxygen transfer rate determines molecular weight and production of poly(γ -glutamic acid) as well as carbon utilization by *Bacillus velezensis* 83. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. Vol. 95 (9). 2383-2392.
- Galindo, E., Serrano-Carreón, L., Gutiérrez, C.R., Allende, R., Balderas, K., Patiño, M., Trejo, M., Wong, M.A., Rayo, E., Isauro, D., & Jurado, C. (2013). The challenges of introducing a new biofungicide to the market: A case study. *Electronic Journal of Biotechnology*. Vol. 16(3). 1-23.
- Galindo, E., Serrano-Carreón, L., Gutiérrez, C.R., Balderas-Ruíz, 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. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. Vol. 18(1). 52-60.
- Grandchamp, G.M., Caro, L., & Shank, E.A. (2017). Pirated siderophores promote sporulation in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 83(10).
- Grundy, F.J., Turinski, A.J., & Henkin, T.M. (1994). Catabolite regulation of *Bacillus subtilis* acetate and acetoin utilization genes by CcpA. *American Society of Microbiology*. Vol. 176(15). 4527-4533.
- Gu, Q., Yang, Y., Yuan, Q., Shi, G., Wu, L., Lou, Z., Huo, R., Wu, H., Borriss, R., & Gao, X. (2017). Bacillomycin D produced by *Bacillus amyloliquefaciens* is involved in the antagonistic interaction with the plant-pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *American Society for Microbiology*. Vol. 83(19). 1-17.

- Hamley, I.W. (2015). Lipopeptides: from self-assembly to bioactivity. *Chemical Communications*. Vol. 51. 8574-8583.
- Hassan, L., Lin, L., Sorek, H., Sperl, L.E., Goudoulas, T., Hagn, F., Germann, N., Tian, C., & Benz, J.P. (2019). Crosstalk of cellulose and mannan perception pathways leads to inhibition of cellulase production in several filamentous fungi. *mBio*. Vol. 10. 1-14.
- Harwood, C.R., Mouillon, J.M., Pohl, S., & Arnau, J. (2018). Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group. *FEMS Microbiology Reviews*. Vol. 42. 721-738.
- Hoch, J.A. (1993). Regulation of the onset of the stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Advances in Microbial Physiology*. Vol. 35. 111–133.
- Hsueh, Y.H., Huang, K.Y., Kunene, S.C., & Lee, T.Y. (2017). Poly- γ -glutamic acid synthesis, gene regulation, phylogenetic relationships, and role in fermentation. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 18(2644). 1-20.
- Jiang, M., Shao, W., Perego, M., & Hoch, J.A. (2000). Multiple histidine kinases regulate entry into stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*. Vol. 38(3), 535–542.
- Jiang, C.H., Yao, X.F., Mi, D.D., Li, Z.J., Yang, B.Y., Zheng, Y., Qi, Y.J., & Guo, J.H. (2019). Comparative transcriptome analysis reveals the biocontrol mechanism of *Bacillus velezensis* F21 against *Fusarium* wilt on watermelon. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 10(652).
- Kaplan, A. (1969). The determination of urea, ammonia, and urease. *Methods of Biochemical Analysis*. Vol. 17. 311-324.
- Karuppiah, V., Sun, J., Li, T., Vallikkannu, M., & Chen, J. (2019). Co-cultivation of *Trichoderma asperellum* GDFS1009 and *Bacillus amyloliquefaciens* 1841 causes differential gene expression and improvement in the wheat growth and biocontrol activity. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 10. 1-14.
- Kaspar, F., Neubauer, P., & Gimpel, M. (2019). Bioactive secondary metabolites from *Bacillus subtilis*: A comprehensive review. *Journal of Natural Products*. Vol. 82(7). 2038-2053.
- Keen, N.T. (1975). Specific elicitors of plant phytoalexin production: Determinants of race specificity in pathogens?. *Science*. Vol. 187. 74-75.
- Kim, S., Li, H., Oh, I., Kee, C., & Kim, M. (2012). Effect of viscosity-inducing factors on oxygen transfer in production culture of bacterial cellulose. *Korean Journal of Chemical Engineering*. Vol. 29(6). 792–797.
- Lee, Y., Jang, Y., Chang, H., Hyung, S.W., & Chung, H. (2005). A putative early response of antifungal *Bacillus lentimorbus* WJ5 against the plant pathogenic fungus, *Colletotrichum gloeosporioides*, analyzed by a DNA microarray. *The Journal of Microbiology*. Vol. 43(3). 308-312.

- Lei, P., Xu, Z., Ding, Y., Tang, B., Zhang, Y., Li, H., Feng, X., & Xu, H. (2015). Effect of poly(γ -glutamic acid) on the physiological responses and calcium signaling of rape seedlings (*Brassica napus* L.) under cold stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 63. 10399-10406.
- Lei, P., Xu, Z., Liang, J., Luo, X., Zhang, Y., Feng, X., Xu, H. (2016). Poly(γ -glutamic acid) enhanced tolerance to salt stress by promoting proline accumulation in *Brassica napus* L. *Plant Growth Regulation*. Vol. 78. 233-241.
- Lewis, J. A., & Papavizas, G. C. (1991). Biocontrol of plant diseases: the approach for tomorrow. *Crop Protection*. Vol. 10(2). 95–105.
- Li, B., Li, Q., Xu, Z., Zhang, N., Shen, Q., & Zhang, R. (2014). Responses of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR to different soilborne fungal pathogens through the alteration of antifungal compounds production. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 5(636).
- López, D., Vlamakis, H., & Kolter, R. (2008). Generation of multiple cell types in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Reviews*. Vol. 33. 152-163.
- López, D., & Kolter, R. (2010). Extracellular signals that define distinct and coexisting cell fates in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Reviews*. Vol. 34(2). 134–149.
- Luna, A. (2015). Evaluación del papel de los antibióticos lipopeptídicos producidos por *Bacillus* sp. 83 en la inhibición del crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* 09. Tesis de maestría en Ciencias Bioquímicas. Instituto de Biotecnología, UNAM. Morelos, México.
- Luna-Bulbarela, A., Tinoco-Valencia, R., Corzo, G., Kazuma, K., Konno, K., Galindo, E., & Serrano-Carreón, L. (2018). Effects of bacillomycin D homologues produced by *Bacillus amyloliquefaciens* 83 on growth and viability of *Colletotrichum gloeosporioides* at different physiological stages. *Biological Control*. Vol. 127. 145-154.
- Lyngwi, N.A. & Joshi, S.R. (2014). *Biology of useful plants and microbes*. Narosa Publishing House: New Delhi, India. 33-43.
- Marero, L.M., Jin, J.H., Shin, J.H., Lee, H.J., Chung, I.S., & Lee, H.J. (1997). Effect of fungal elicitation on indirubin production from a suspension culture of *Polygonum tinctorium*. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 21. 97-101.
- Marmann, A., Aly, A.H., Lin, W., Wang, B., & Proksh, P. (2014). Co-cultivation – A powerful emerging tool for enhancing the chemical diversity of microorganisms. *Marine Drugs*. Vol. 12. 1043-1065.
- Medina Valdez, A. (2019). Estudio del consumo de potencia y de la velocidad de transferencia y consumo de oxígeno en cultivos de *Bacillus velezensis* 83 en matraces agitados para la producción de ácido- γ -poliglutámico. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, Estado de México.
- Meyer, V., & Stahl, U. (2003). The influence of co-cultivation on expression of the antifungal protein in *Aspergillus giganteus*. *Journal of Basic Microbiology* 43(1). 68-74.

- Miras, M., & Dubnau, D. (2016). A DegU-P and DegQ-dependent regulatory pathway for the K-state in *Bacillus subtilis*. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 7. 1-14.
- Molina-Santiago, C., Pearson, J.R., Navarro, Y., Berlanga-Clavero, M.V., Caraballo-Rodriguez, A.M., Petras, D., García-Martín, M.L., Lamon, G., Haberstein, B., Cazorla, F.M., de Vicente, A., Loquet, A., Dorrestein, P.C., & Romero, D. (2019). The extracellular matrix protects *Bacillus subtilis* colonies from *Pseudomonas* invasion and modulates plant co-colonization. *Nature Communications*. Vol. 10(1919).
- Molle, V., Fujita, M., Jensen, S.T., Eichenberger, P., González-Pastor, J.E., Liu, J.S., & Losick, R. (2003). The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*. Vol. 50(5). 1683-1701.
- Morales, D. (2007). Desarrollo de un proceso de alta densidad celular para la producción de esporas de *Bacillus subtilis* 83 con alta viabilidad. Tesis de maestría en Ciencias Bioquímicas. Instituto de Biotecnología, UNAM. Morelos, México.
- Müller, S., Strack, S.N., Hoefler, B.C., Straight, P.D., Kearns, D.B., & Kirby, J.R. (2014). Bacillaene and sporulation protect *Bacillus subtilis* from predation by *Myxococcus xanthus*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 80(18). 5603-5610.
- Murphy, T., Roy, I., Harrop, A., Dixon, K., & Keshavarz, T. (2007). Effect of oligosaccharide elicitors on bacitracin A production and evidence of transcriptional level control. *Journal of Biotechnology*. Vol. 131. 397-403.
- Nasir, M.N., & Besson, F. (2012). 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*. 187-193.
- Nicholson, W.L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H.J., & Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol. 64(3). 548-572.
- Nihorimbere, V., Cawoy, H., Seyer, A., Brunelle, A., Thonart, P., & Ongena, M. (2012). Impact of rhizosphere factors on cyclic lipopeptide signature from the plant beneficial strain *Bacillus amyloliquefaciens* S499. *FEMS Microbiology Ecology*. Vol. 79. 176-191.
- O'Brien, P. A. (2017). Biological control of plant diseases. *Australasian Plant Pathology*. Vol. 46(4). 293-304.
- Okada, M., Sato, I., Cho, S.J., Iwata, H., Nishio, T., Dubnau, D., & Sakagami, Y. (2005). Structure of the *Bacillus subtilis* quorum-sensing peptide pheromone ComX. *Nature Chemical Biology*. Vol. 1(1). 23-24.
- Ongena, M., & Jacques, P. (2007). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*. Vol 16(3). 115-125.
- Ortiz-Castro, R., Contreras-Cornejo, H.A., Macías-Rodríguez, L., & López-Bucio, J. (2009). The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signaling and Behavior*. Vol. 4(8). 701-712.

- Pal, K.K., & McSpadden Gardener, B. (2006). Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*. 1-25.
- Palazzini, J.M., Dunlap, C.A., Bowman, M.J., & Chulze, S.N. (2016). *Bacillus velezensis* RC 218 as a biocontrol agent to reduce *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation: Genome sequencing and secondary metabolite cluster profiles. *Microbiological Research*. Vol 192. 30-36.
- Pettit, R.K. (2011). Small-molecule elicitation of microbial secondary metabolites. *Microbial Biotechnology*. Vol. 4(4). 471-478.
- Prescott, L.M., Harley, J.P., & Klein, D.A. (2004). *Microbiología*. 5ta Edición. McGraw Hill: Madrid, España. 566-567.
- Raaijmakers, J.M., Bruijn, I., Nybroe, O., & Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*. Vol. 34. 1037-1062.
- Rabbee, M., Ali, M., Choi, J., Hwang, B., Jeong, S., & Baek, K. (2019). *Bacillus velezensis*: A valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. *Molecules*. Vol. 24(6), 1-14.
- Radman, R., Saez, T., Bucke, C., & Keshavarz, T. (2003). Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. Vol. 37. 91-102.
- Ramírez-Vigil, E., Peña-Urbe, C.A., Macías-Rodríguez, L.I., Reyes de la Cruz, H. & Chávez-Avilés, M.N. (2020). *In vitro* growth of *Colletotrichum gloeosporioides* is affected by butyl acetate, a compound produced during the co-culture of *Trichoderma* sp. And *Bacillus subtilis*. *3 Biotech*. Vol. 10(8). 1-14.
- Regestein née Meissner, L., Arndt, J., Palmén, T. G., Jestel, T., Mitsunaga, H., Fukusaki, E., & Büchs, J. (2017). Investigation of poly(γ -glutamic acid) production via online determination of viscosity and oxygen transfer rate in shake flasks. *Journal of Biological Engineering*. Vol. 11(1). 1-16.
- Richard, A., & Margaritis, A. (2003). Rheology, oxygen transfer, and molecular weight characteristics of poly(glutamic acid) fermentation by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 82(3). 299–305.
- Scherlach, K., & Hertweck, C. (2009). Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. *Organic & Biomolecular Chemistry*. Vol. 7. 1753-1760.
- Serrano Carreón, L., & Galindo, E. (2007). Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. *Ciencia*. Vol. 58. 77-89.
- Setlow, P. (2003). Spore germination. *Current Opinion in Microbiology*. Vol. 6. 550-556.
- Shank, E. A., & Kolter, R. (2011). Extracellular signaling and multicellularity in *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology*. Vol. 14(6). 741–747.

- Shentu, X.P., Liu, W.P., Zhan, X.H., Yu, X.P., Zhang, C.X. (2013). The elicitation effect of pathogenic fungi on trichodermin production by *Trichoderma brevicompactum*. The Scientific World Journal. Vol. 2013. 1-6.
- Shih, I., & Van, Y. (2001). The production of poly-(γ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications. Bioresource Technology. Vol. 79. 207-225.
- Siebring, J., Elema, M.J.H., Vega, F.D., Kovács, Á.T., Haccou, P., Kuipers, O.P. (2014). Repeated triggering of sporulation in *Bacillus subtilis* selects against a protein that affects the timing of cell division. The ISME Journal. Vol. 8. 77–87.
- Smith, D.L., Gravel, V., & Yergeau, E. (2017). Signaling in the phytomicrobiome. Frontiers in Plant Science. Vol. 8. 4-6.
- Soriano, E.Y. (2013). Evaluación de esporulación de *Bacillus* sp. 83 en función de la densidad celular en cultivos continuos. Tesis de licenciatura. Universidad Politécnica de Puebla – Instituto de Biotecnología, UNAM. Morelos, México.
- Soriano, E.Y. (2016). Efecto de la limitación nutricional en la esporulación de *Bacillus amyloliquefaciens* 83. Tesis de maestría en Ciencias Bioquímicas. Instituto de Biotecnología, UNAM. Morelos, México.
- Suneeta, P., Aiyathan, K.E.A., & Nakkeeran, S. (2018). Bacillomycins – The effective molecules in plant disease management. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. Vol. 7(2). 823-835.
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, synthesis and specific functions. Molecular Microbiology. Vol. 56(4). 845-857.
- Stülke, J., & Hillen, W. (2000). Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. Annual Review of Microbiology. Vol. 54. 849-880.
- Tahir, H.A.S., Gu, Q., Wu, H., Raza, W., Hanif, A., Wu, L., Colman, M.V., & Gao, X. (2017). Plant growth promotion by volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* SYST2. Frontiers in Microbiology. Vol. 8 (171). 1-11.
- Tan, Z.Q., Leow, H.Y., Lee, D.C.W., Karisnan, K., Song, A.A.L., Mai, C.W., Yap, W.S., Lim, S.H.E., & Lai, K.S. (2019). Co-culture systems for the production of secondary metabolites: Current and future prospects. The Open Biotechnology Journal. Vol. 13. 18-26.
- Tocheva, E.I., Ortega, D.R., & Jensen, G.J. (2016). Sporulation, bacterial cell envelopes and the origin of life. Nature Reviews Microbiology. Vol. 14(8). 535-542.
- Tojo, S., Hirooka, K., & Fujita, Y. 2013. Expression of *kinA* and *kinB* of *Bacillus subtilis*, necessary for sporulation initiation, is under positive stringent transcription control. Journal of Bacteriology. Vol. 195. 1656-1665.

- Trach, K.A., & Hoch, J.A. (1993). Multisensory activation of the phosphorelay initiating sporulation in *Bacillus subtilis*: identification and sequence of the protein kinase of the alternate pathway. *Molecular Microbiology*. Vol. 8(1). 69–79.
- Vallad, G.E., & Goodman, R.M. (2004). Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Science*. Vol. 44(6). 1920-1934.
- Wan, C., Fan, X., Lou, Z., Wang, H., Olatunde, A., & Rengasamy, K.R.R. (2021). Iturin: cyclic lipopeptide with multifunction biological potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1-13.
- Wang, L., Wang, N., Mi, D., Luo, Y., & Guo, J. (2017). Poly—glutamic acid productivity of *Bacillus subtilis* BsE1 has positive function in motility and biocontrol against *Fusarium graminearum*. *Journal of Microbiology*. Vol. 55(7). 554-560.
- Wang, N., Wang, L., Zhu, K., Hou, S., Chen, L., Mi, D., Gui, Y., Qi, Y., Jiang, C., & Guo, J. (2019). Plant root exudates are involved in *Bacillus cereus* AR156 mediated biocontrol against *Ralstonia solanacearum*. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 10. 1-14.
- Xu, Z., Shao, J., Li, B., Yan, X., Shen, Q., & Zhang, R. (2013). Contribution of bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to antifungal activity and biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 79(3). 808-815.
- Xu, Z., Mandic-Mulec, I., Zhang, H., Liu, Y., Sun, X., Feng, H., Xun, W., Zhang, N., Shen, Q., & Zhang, R. (2019a). Antibiotic bacillomycin D affects iron acquisition and biofilm formation in *Bacillus velezensis* through a Btr-mediated FeuABC-dependent pathway. *Cell Reports*. Vol. 29. 1192-1202.
- Xu, Z., Zhang, H., Sun, X., Liu, Y., Yan, W., Xun, W., Shen, Q., & Zhang, R. (2019b). *Bacillus velezensis* wall teichoic acids are required for biofilm formation and root colonization. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 85(5). 1-14.
- Yi, Y., de Jong, A., Frenzel, E., & Kuipers, O.P. (2017). Comparative transcriptomics of *Bacillus mycoides* strains in response to potato-root exudates reveals different genetic adaptation of endophytic and soil isolates. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 8(1487). 1-14.
- Yu, Y., Yan, F., Chen, Y., Jin, C., Guo, J., & Chai, Y. (2016). Poly- γ -glutamic acids contribute to biofilm formation and plant root colonization in selected environmental isolates of *Bacillus subtilis*. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 7. 1-15.
- Zihahirwa Kulimushi, P., Argüelles Arias, A., Franzil, L., Steels, S., & Ongena, M. (2017). Stimulation of fengycin-type antifungal lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* in the presence of the maize fungal pathogen *Rhizomucor variabilis*. *Frontiers in Microbiology*. Vol 8(850). 1-12.

11. ANEXOS

Curvas de calibración para la determinación de diferentes sustratos y metabolitos analizados en el presente proyecto

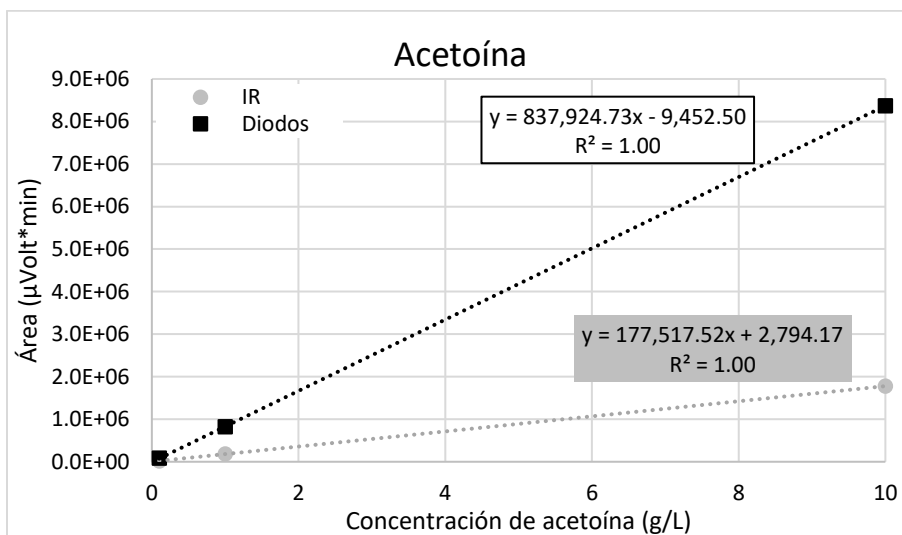


Figura A-1. Curva de calibración para determinar la concentración de acetoína por HPLC. Valores para estándar comercial de acetoína Sigma-Aldrich en detector de arreglo de diodos a 210 nm y detector de índice de refracción.

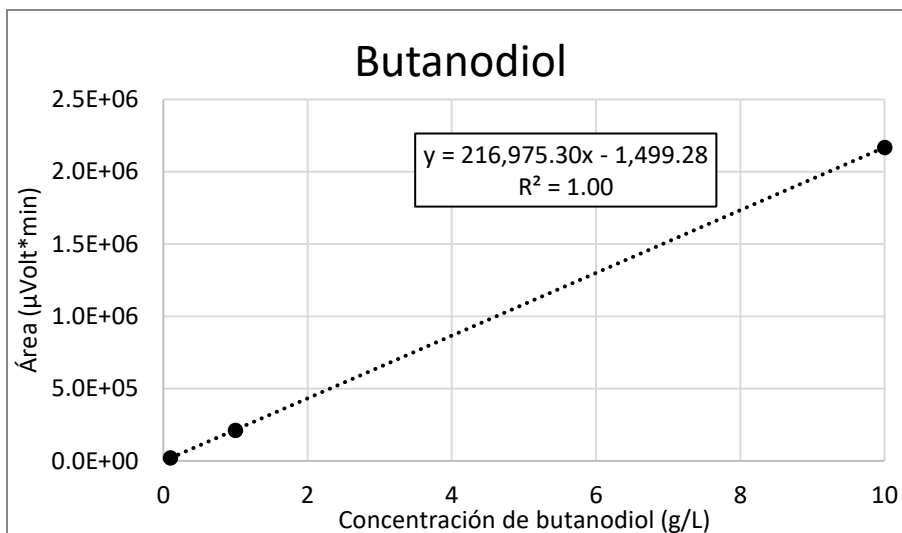


Figura A-2. Curva de calibración para determinar la concentración de butanodiol por HPLC. Valores para estándar comercial de butanodiol Sigma-Aldrich en detector de índice de refracción.

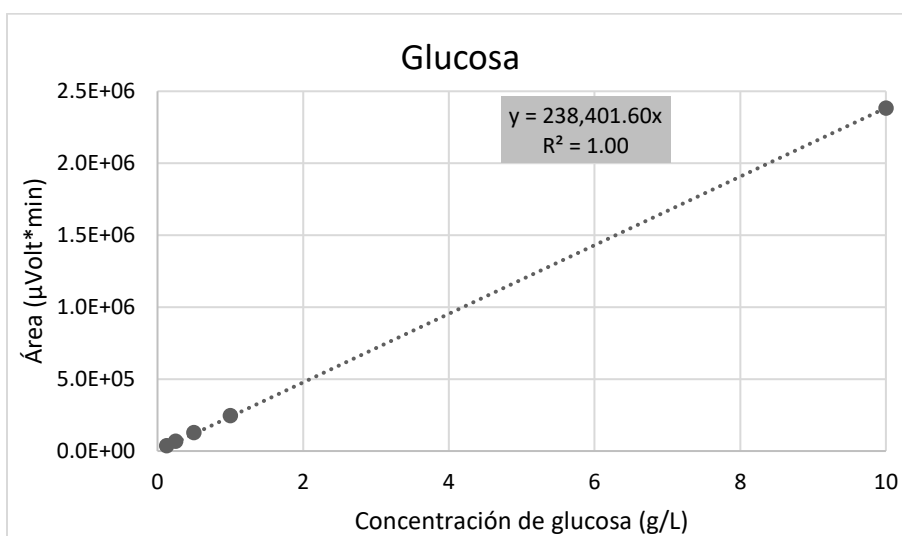


Figura A-3. Curva de calibración para determinar la concentración de glucosa por HPLC. Valores para estándar comercial de dextrosa Sigma-Aldrich en detector de índice de refracción.

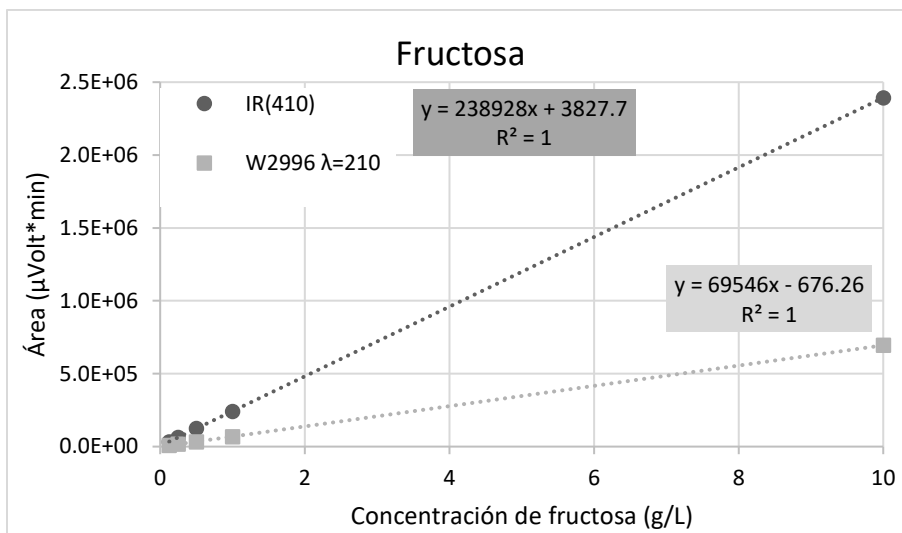


Figura A-4. Curva de calibración para determinar la concentración de fructosa por HPLC. Valores para estándar comercial de fructosa Sigma-Aldrich en detector de arreglo de diodos a 210 nm y detector de índice de refracción

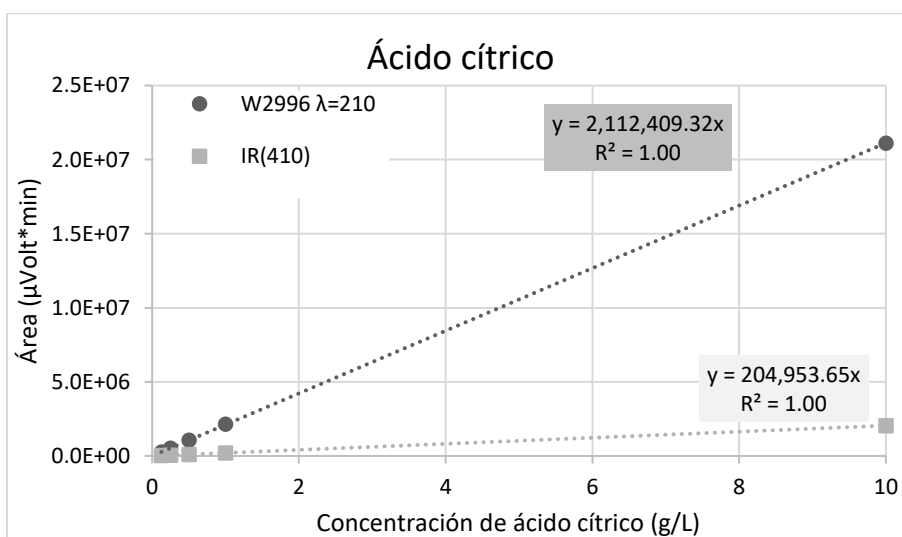


Figura A-5. Curva de calibración para determinar la concentración de ácido cítrico por HPLC. Valores para estándar de ácido cítrico Sigma-Aldrich en detector de arreglo de diodos a 210 nm y detector de índice de refracción.

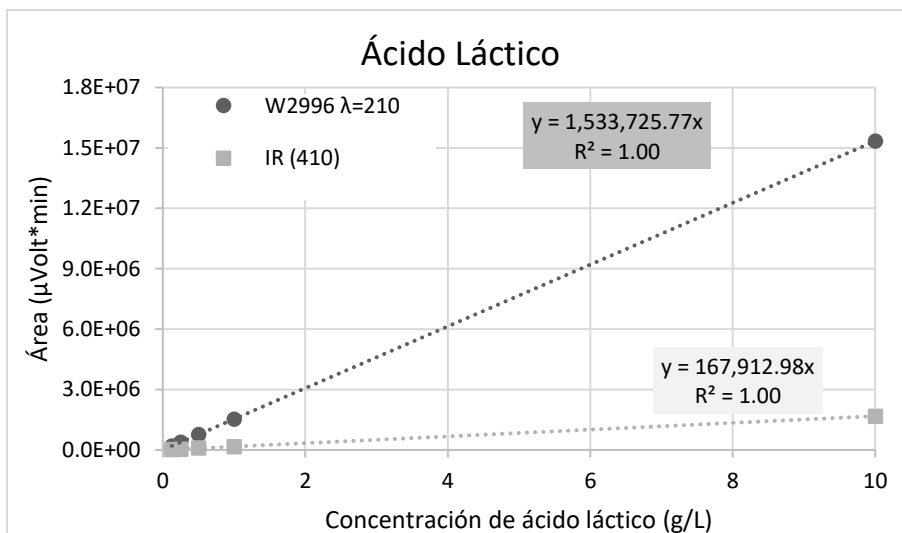


Figura A-6. Curva de calibración para determinar la concentración de ácido láctico por HPLC. Valores para estándar de ácido láctico Sigma-Aldrich en detector de arreglo de diodos a 210 nm y detector de índice de refracción.

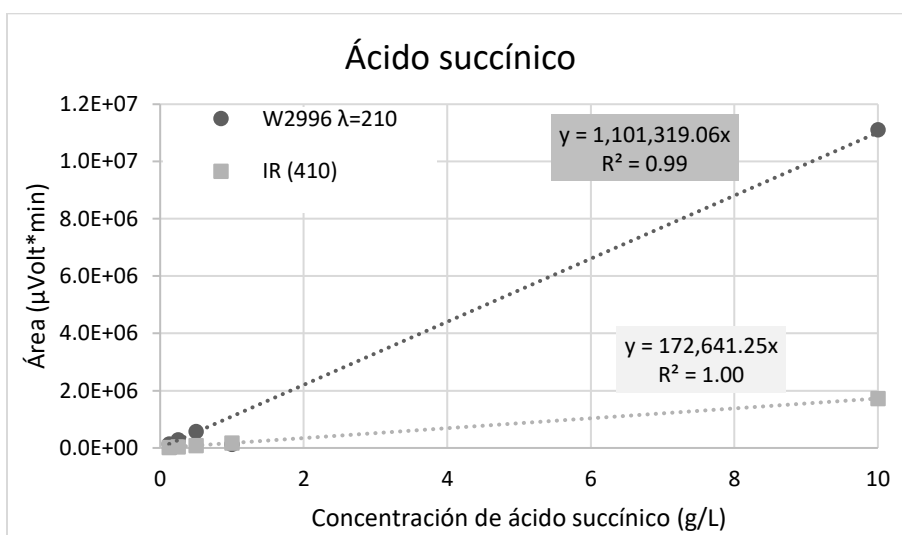


Figura A-7. Curva de calibración para determinar la concentración de ácido succínico por HPLC. Valores para estándar de ácido succínico Sigma-Aldrich en detector de arreglo de diodos a 210 nm y detector de índice de refracción.

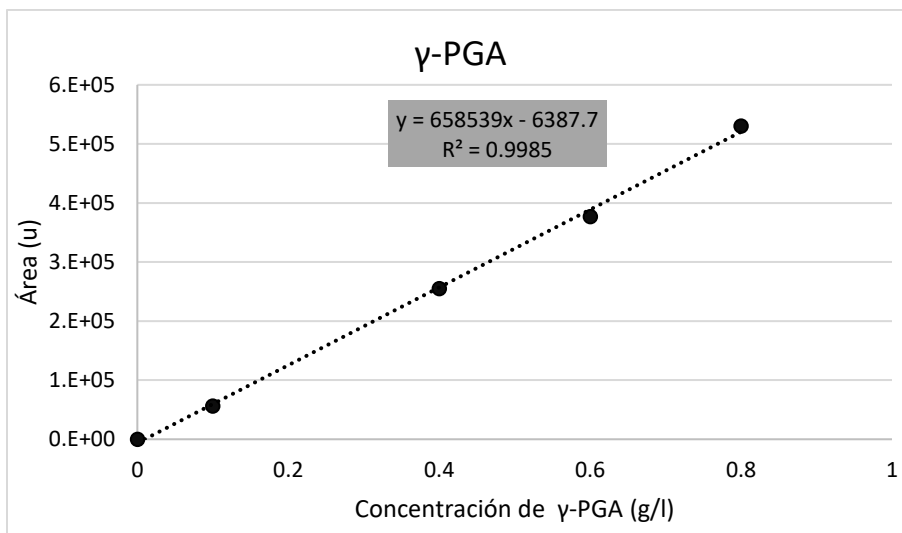


Figura A-8. Curva de calibración para determinar la concentración de γ-PGA por HPLC. Valores para estándar de γ-PGA Sigma-Aldrich en detector de índice de refracción.

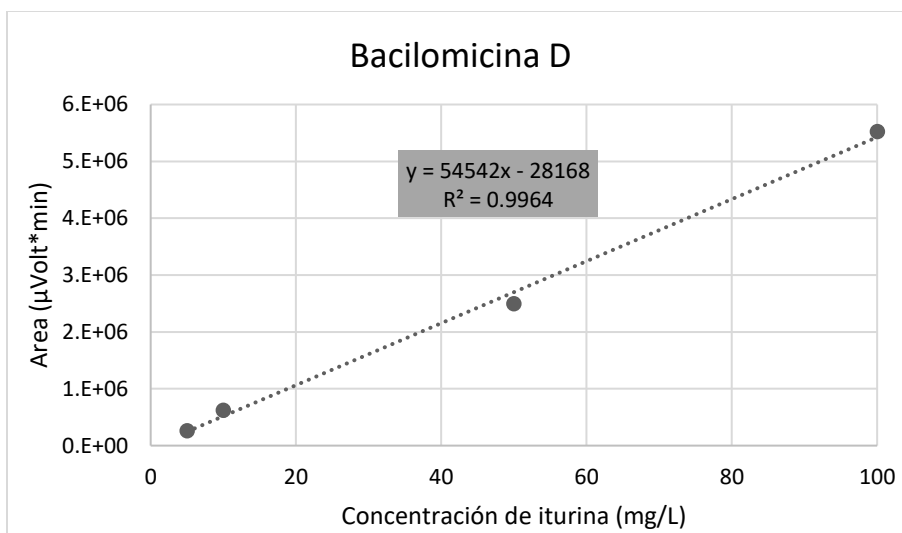


Figura A-9. Curva de calibración para determinar la concentración de bacilomicina D por HPLC. Valores para estándar de iturinas Sigma-Aldrich comercial en detector de arreglo de diodos a 205 nm.

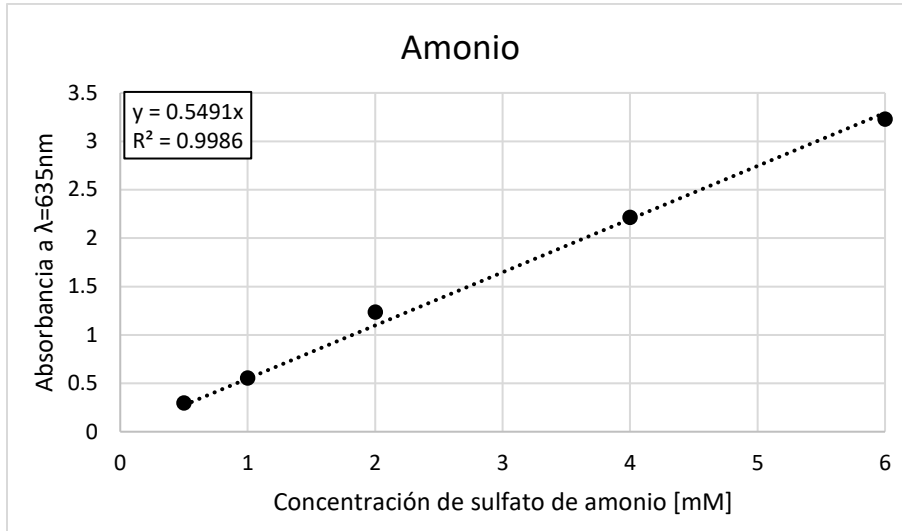


Figura A-10. Curva de calibración para determinar la concentración de amonio residual espectrofotometría de absorbancia. Valores para estándar de sulfato de amonio Sigma-Aldrich comercial en espectrofotómetro Genesys 10s UV-VIS a una longitud de onda de 635 nm.

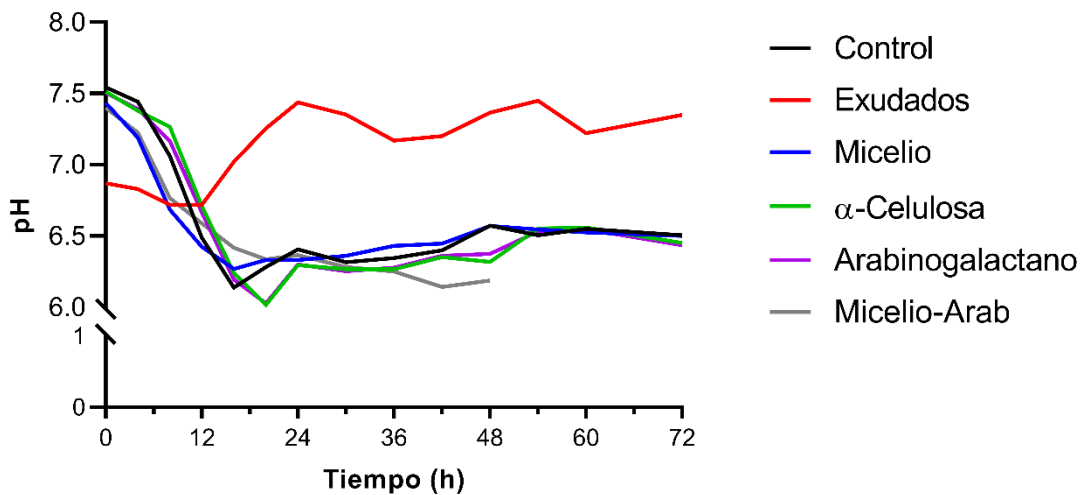


Figura A-11. Evolución del pH en los cultivos de *B. velezensis* 83 con y sin elicitores.

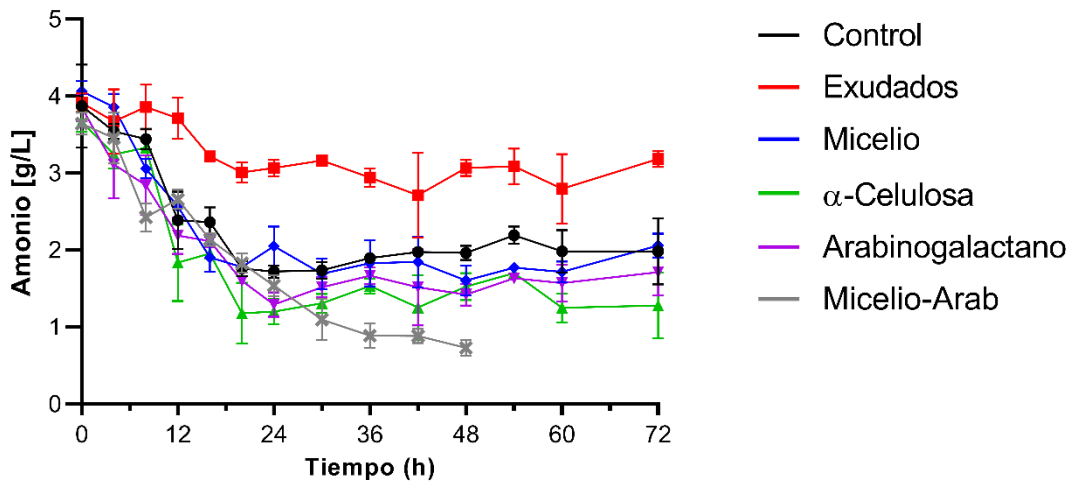


Figura A-12. Consumo de sulfato de amonio en los cultivos de *B. velezensis* 83 con y sin elicitores.

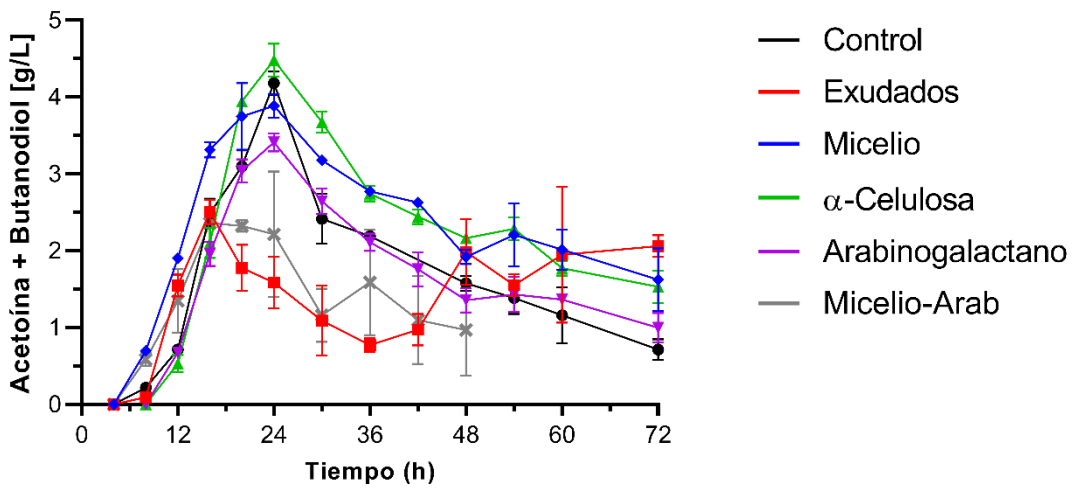


Figura A-13. Producción de acetoína y butanodiol.

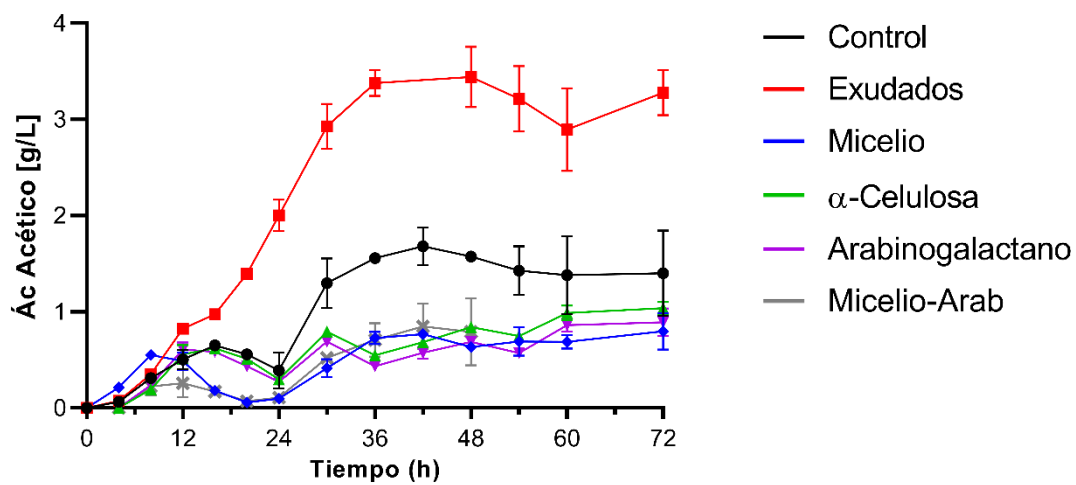


Figura A-14. Producción de ácido acético.

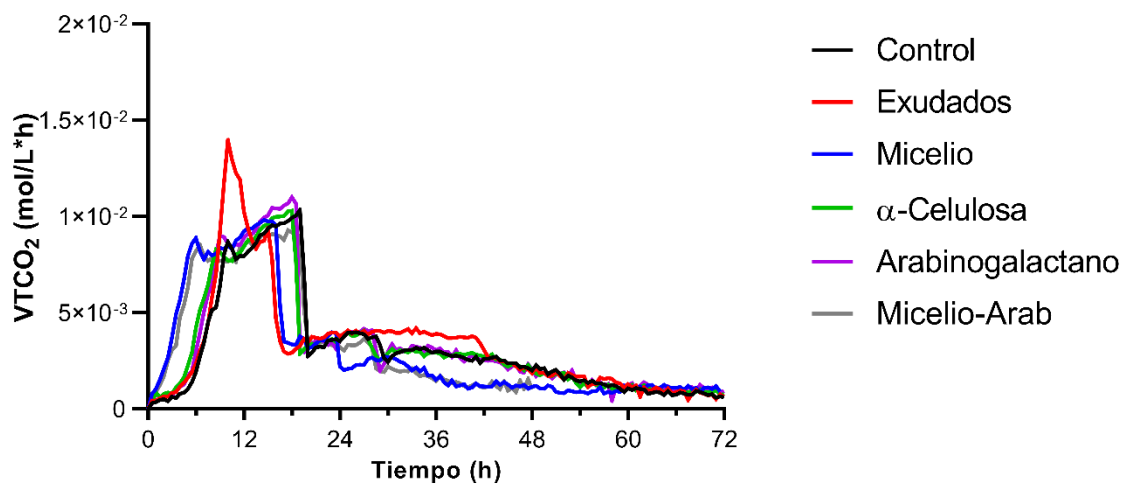


Figura A-15. Velocidad de transferencia de CO₂.

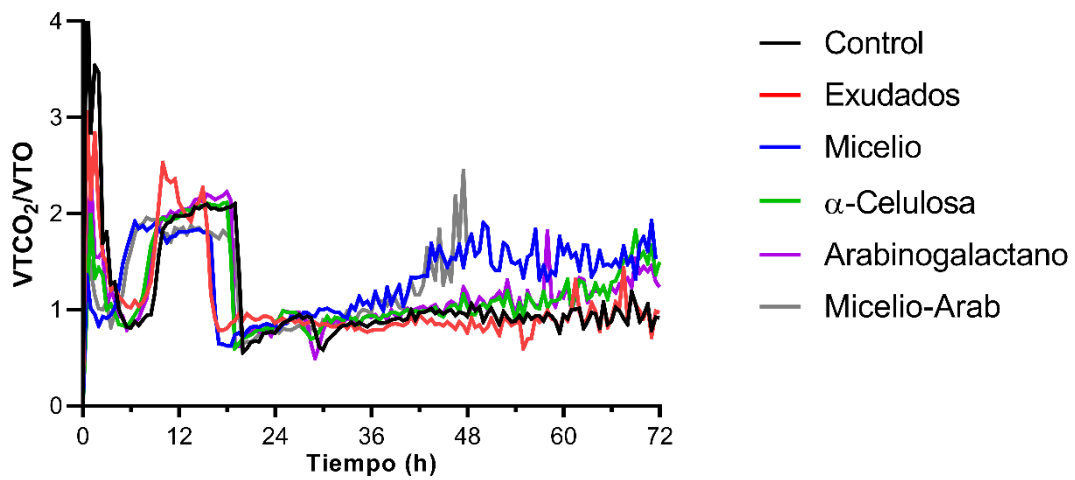


Figura A-16. Coeficiente respiratorio de *B. velezensis* 83 cultivado con y sin elicitores.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tabla A-1 ANOVA de un solo factor de velocidad de crecimiento. Nivel de confianza de 95% ($\alpha = 0.05$)

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	5	0.075967	0.015193	71.82	0.000
Error	12	0.002539	0.000212		
Total	17	0.078505			

Tabla A-2 Agrupación de medias de velocidad de crecimiento (en h⁻¹) por método de Tuckey

Factor	N	Media	Agrupación
Micelio	3	0.44	A
Micelio-Arabinogalactano	3	0.42	A
Control	3	0.32	B
Arabinogalactano	3	0.29	B C
Solución modelo	3	0.29	B C
Celulosa	3	0.28	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tabla A-3 ANOVA de un solo factor de concentración máxima de bacilomicina. Nivel de confianza de 95% ($\alpha = 0.05$).

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	5	6335.6	1267.12	82.79	0.000
Error	12	183.7	15.31		
Total	17	6519.3			

Tabla A-4 Agrupación de medias de concentración máxima de bacilomicina (en mg/L) por método de Tuckey

Factor	N	Media	Agrupación
Celulosa	3	57.29	A
Arabinogalactano	3	49.85	A
Micelio-Arabinogalactano	3	19.71	B
Control	3	15.15	B
Solución modelo	3	13.89	B
Micelio	3	9.43	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tabla A-5 ANOVA de un solo factor de VTO máxima. Nivel de confianza de 95% ($\alpha = 0.05$)

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	5	0.18918	0.037837	7.64	0.002
Error	12	0.05947	0.004956		
Total	17	0.24865			

Tabla A-6 Agrupación de medias de VTO máxima (en mmol/L*h) por método de Tuckey

Factor	N	Media	Agrupación	
Arabinogalactano	3	5.69	A	
Celulosa	3	5.64	A	
Solución modelo	3	5.58	A	
Control	3	5.55	A	B
Micelio	3	5.53	A	B
Micelio-Arabinogalactano	3	5.36	B	

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tabla A-7 ANOVA de un solo factor de concentración máxima de esporas. Nivel de confianza de 95% ($\alpha = 0.05$)

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	5	2.59×10^{19}	5.18×10^{18}	11.58	0.000
Error	12	5.36×10^{18}	4.47×10^{17}		
Total	17	3.12×10^{19}			

Tabla A-8 ANOVA de un solo factor de productividad de esporas. Nivel de confianza de 95% ($\alpha = 0.05$).

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	5	3.32×10^{16}	6.63×10^{15}	48.44	0.000
Error	12	1.64×10^{15}	1.37×10^{14}		
Total	17	3.48×10^{16}			

Tabla A-9 ANOVA de un solo factor de concentración máxima de γ -PGA. Nivel de confianza de 95% ($\alpha = 0.05$)

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	5	0.57014	0.114029	15.51	0.000
Error	12	0.08824	0.007354		
Total	17	0.65839			

Tabla A-10 Agrupación de medias de concentraciones máxima de γ -PGA (en g/L) por método de Tuckey

Factor	N	Media	Agrupación	
Micelio-Arabinogalactano	3	1.58	A	
Micelio	3	1.51	A	
Arabinogalactano	3	1.37	A	B
Control	3	1.21	B	C
Solución modelo	3	1.14	B	C
Celulosa	3	1.13	C	

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tabla A-11 ANOVA de un solo factor de peso molecular de γ -PGA. Nivel de confianza de 95% ($\alpha = 0.05$)

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	5	4179957	835991	98.88	0.000
Error	12	101458	8455		
Total	17	4281414			

Tabla A-12 Agrupación de medias de peso molecular de γ -PGA (en kDa) por método de Tuckey

Factor	N	Media	Agrupación
Control	3	2556.2	A
Micelio-Arabinogalactano	3	2492	A
Solución modelo	3	2449.24	A
Arabinogalactano	3	2137.0	B
Celulosa	3	1946.8	B
Micelio	3	1157.55	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tabla A-13 ANOVA de un solo factor de concentración de células. Nivel de confianza de 95% ($\alpha = 0.05$).

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	5	1.81×10^{19}	3.62×10^{18}	0.98	0.467
Error	12	4.42×10^{19}	3.68×10^{18}		
Total	17	6.23×10^{19}			

Tabla A-14 Agrupación de medias de concentración de células (en células/mL) por método de Tuckey

Factor	N	Media	Agrupación
Micelio-Arabinogalactano	3	9.10x10 ⁹	A
Micelio	3	7.58x10 ⁹	A
Celulosa	3	7.48x10 ⁹	A
Arabinogalactano	3	6.42x10 ⁹	A
Control	3	6.32x10 ⁹	A
Solución modelo	3	6.30x10 ⁹	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.