



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

ANÁLISIS DE LOS PATRONES DE PRODUCCIÓN DE LIPOPÉPTIDOS  
ANTIFÚNGICOS DE *Bacillus subtilis* Ctpx S2-1 DURANTE DIFERENTES  
ETAPAS DE CRECIMIENTO

AUTOR

Nicole Anahí Coronel Rojas

AÑO

2018



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

ANÁLISIS DE LOS PATRONES DE PRODUCCIÓN DE LIPOPÉPTIDOS  
ANTIFÚNGICOS DE *Bacillus subtilis* Ctpx S2-1 DURANTE DIFERENTES  
ETAPAS DE CRECIMIENTO

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos  
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesora Guía

PhD. Viviana del Rocío Yáñez-Mendizábal

Autora

Nicole Anahi Coronel Rojas

Año

2018

## **DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA**

"Declaro haber dirigido el trabajo, Análisis de los patrones de producción de lipopéptidos antifúngicos de *Bacillus subtilis* Ctpx s2-1 durante diferentes etapas de crecimiento, a través de reuniones periódicas con la estudiante Nicole Anahi Coronel Rojas, en el semestre 2018-10, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

---

Viviana del Rocío Yáñez-Mendizábal

Doctora en Ciencia y Tecnología Agraria y Alimentaria

C. I. 1710469782

## **DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR**

"Declaro haber revisado este trabajo, Análisis de los patrones de producción de lipopéptidos antifúngicos de *Bacillus subtilis* Ctpx s2-1 durante diferentes etapas de crecimiento, de la estudiante Nicole Anahi Coronel Rojas, en el semestre 2018-10, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

---

Mayra Fernanda Chico Terán  
Máster en Biotecnología  
C. I.1003327044

## **DECLARACIÓN DEL ESTUDIANTE**

"Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes".

---

Nicole Anahi Coronel Rojas

C. I.1724062995

## AGRADECIMIENTOS

A la Dirección General de Investigación de la Universidad de Las Américas, Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE) y Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia Tecnología e Innovación SENESCYT por el aporte logístico y económico brindado para el desarrollo de este proyecto a través del proyecto “Mejora de la cadena productiva del chocho (*Lupinus mutabilis*) en Ecuador”.

A la Dra. Viviana Yáñez, a la Ing. Gabriela Samaniego, y a la Ing. Carolina Grijalva por brindarme sus conocimientos y apoyarme en el desarrollo de este proyecto.

Al laboratorio de Biotecnología de Universidad de las Américas, en especial al Ing. Paúl Sotaminga por el apoyo en el desarrollo de este proyecto.

## DEDICATORIA

A Dios “Porque de él, y por él, y para él, son todas las cosas. A él sea la gloria por los siglos. Amen.” Romanos 11:36.

A mis padres Ramiro y Shirley, que han sido el apoyo principal a lo largo de mi vida. A mis hermanas, que siempre me han animado seguir adelante. A David. A amigos que me han apoyado en la realización de este trabajo.

## RESUMEN

Bacterias del género *Bacillus spp.* han demostrado tener capacidad antagónica contra otros microorganismos como hongos y bacterias. Diferentes aislados de *Bacillus subtilis* son utilizados como un potente agente de biocontrol de enfermedades en plantas debido a su capacidad de producir compuestos antimicrobianos. Algunos de estos compuestos interactúan en forma beneficiosa con la planta y contra diferentes tipos de patógenos. Estudios previos realizados con *Bacillus subtilis* Cptx S2-1 demostraron que esta cepa controla eficientemente a *Colletotrichum acutatum* causante de la antracnosis en el cultivo y las semillas de chocho (*Lupinus mutabilis*). Este potencial de control del aislado se debe principalmente a la actividad de diferentes tipos de lipopéptidos agrupados en las familias Fengicinas, Iturinas con una alta actividad antifúngica, y de la familia de las Surfactinas con actividad de tensoactivo. Sobre esta base el objetivo de este estudio fue identificar los patrones de producción de los lipopéptidos antifúngicos producidos por *Bacillus subtilis* Cptx S2-1 en un biorreactor y caracterizar los genes implicados en la producción de lipopéptidos mediante amplificación de secuencias por PCR. Para cumplir este objetivo, primero se analizó la producción de lipopéptidos en relación a la cantidad de biomasa total y endosporas en un medio comercial (MOLP) y otro medio de bajo costo (HS40-MOLP2) durante las diferentes etapas de crecimiento bacteriano. La identificación de los patrones de producción de diferentes lipopéptidos antifúngicos del aislado mediante cromatografía en capa fina de alta resolución específica para proteínas (HPTLC) y autobiografía para actividad antifúngica (HPTLC + *C. acutatum*) seguido de análisis de expresión de genes por PCR. Los resultados obtenidos demostraron que tanto la producción de lipopéptidos antifúngicos como su actividad antifúngica están relacionados a la fase de crecimiento, especialmente a la producción de endosporas. Se pudo evidenciar una alta correlación entre la producción de endosporas y el incremento de las concentraciones de lipopéptidos en fase estacionaria. Todos estos resultados podrían servir de base para la optimización de procesos de producción a escala industrial de bio-insumos a partir de este microorganismo y su uso para el control de la antracnosis del chocho causada por *C. acutatum*.



## ABSTRACT

Bacteria of the genus *Bacillus spp.* have shown to have antagonistic capacity against other microorganisms such as fungi and bacteria. Different isolates of *Bacillus subtilis* are used as a potent biocontrol agent of diseases in plants due to their ability to produce antimicrobial compounds. Some of these compounds interact beneficially with the plant and against different types of pathogens. Previous studies conducted with *Bacillus subtilis* Cptx S2-1 demonstrated that this strain efficiently controls *Colletotrichum acutatum*, which causes anthracnose in the crop and seeds of lupine (*Lupinus mutabilis*). This potential control of the isolate is mainly due to the activity of different types of lipopeptides grouped in the Fengicinas families – Iturinas with a high antifungal activity – and of the Surfactin family with surfactant activity. On this basis, the objective of this study was to identify the production patterns of the antifungal lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* Cptx S2-1 in a bioreactor, and to characterize the genes involved in the production of lipopeptides by amplification of sequences by PCR. To meet this objective, the production of lipopeptides was first analyzed in relation to the amount of total biomass and endospores in a commercial medium (MOLP) and another low-cost medium (HS40-MOLP2) during the different stages of bacterial growth. The identification of production patterns of different antifungal lipopeptides of the isolate by high-resolution protein-specific thin layer chromatography (HPTLC) and autobiography for antifungal activity (HPTLC + *C. acutatum*) followed by analysis of gene expression by PCR. The results obtained showed that both the production of antifungal lipopeptides and their antifungal activity are related to the growth phase, especially the production of endospores. A high correlation was found between the production of endospores and the increase in concentrations of lipopeptides in stationary phase. All these results could serve as a basis for the optimization of industrial scale production processes of bio-inputs from this microorganism and its use for the control of the anthracnose of the cunt caused by *C. acutatum*.

# ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Planteamiento del problema .....	3
1.3 Objetivo general.....	5
1.4 Objetivos específicos.....	5
1.5 Justificación de la investigación .....	5
2. Marco teórico.....	6
2.1 <i>Bacillus subtilis</i> y sus aplicaciones.....	6
2.1.1 Características biológicas de <i>Bacillus subtilis</i> .....	6
2.1.2 Aplicaciones de <i>Bacillus subtilis</i> .....	8
2.2 Lipopéptidos antifúngicos de <i>Bacillus spp.</i> .....	9
2.2.1 Lipopéptidos, características generales y su aplicación .....	9
2.2.2 Síntesis de lipopéptidos antifúngicos de <i>Bacillus subtilis</i> y sus mecanismos de acción.....	10
2.2.3 Diversidad Estructural de lipopéptidos.....	12
2.2.4 Aplicaciones de los lipopéptidos .....	14
2.3 Producción <i>in vitro</i> – Proceso en biorreactor .....	15
3. Diseño del plan experimental .....	16
4. Procedimientos.....	16
4.1 Determinación de la población.....	16
4.2 Determinación de la muestra.....	17
4.3 Descripción de los materiales y métodos .....	17

4.3.1	Mantenimiento de la cepa <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Colletotrichum acutatum</i> .....	17
4.3.2	Calibración de Inóculo .....	17
4.3.3	Curva decrecimiento en biorreactor.....	18
4.3.4	Fermentación de <i>Bacillus subtilis</i> en Biorreactor .....	19
4.3.5	Análisis Bioquímico.....	20
4.3.5.1	Producción de endosporas y biomasa.....	20
4.3.5.2	Extracción de lipopéptidos.....	21
4.3.5.3	Caracterización de lipopéptidos de <i>B. subtilis</i> Cptx S2-1 mediante Cromatografía de capa fina (HPTLC) y HPTLC-autobiografía.....	21
4.3.6	Análisis molecular de lipopéptidos.....	22
4.3.6.1	Extracción y cuantificación de ADN.....	22
4.3.6.2	Amplificación de secuencias por Reacción de Cadena Polimerasa (PCR) .....	24
4.4	Evaluación estadística de los resultados .....	26
5.	Resultados y discusión.....	27
5.1	Curva de crecimiento en biorreactor.....	27
5.2	Caracterización de lipopéptidos de <i>B. subtilis</i> Cptx S2-1 mediante Cromatografía de capa fina (HPTLC) y análisis de actividad biológica por autobiografía. ....	30
5.3	Análisis molecular.....	40
5.4	Producción de Biomasa en Biorreactor.....	53
5.5	Producción de endosporas en Biorreactor .....	55
5.6	Producción de lipopéptidos en biorreactor .....	58

5.7	Correlación entre biomasa, endosporas y lipopéptidos producidos en biorreactor. ....	60
6.	Conclusiones y Recomendaciones .....	65
6.1	Conclusiones .....	65
6.2	Recomendaciones.....	66
	REFERENCIAS .....	67
	ANEXOS .....	75

## 1. Introducción

### 1.1 Antecedentes

El control biológico mediante el uso de microorganismos antagónicos naturales y/o sus metabolitos se ha venido estudiando ampliamente en las últimas décadas. Diferentes estudios han demostrado que algunas especies de levaduras, hongos y bacterias son eficaces agentes de biocontrol contra varios patógenos de pre y postcosecha (Yáñez-Mendizábal, Viñas, Usall, Torres, Solsona, & Teixidó, 2012). Entre los grupos de bacterias con capacidad de control biológico varias especies pertenecientes al género *Bacillus* particularmente a *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens* han demostrado ser efectivas contra un amplio espectro de patógenos vegetales (Touré, Ongena, Jacques, Guiro, & Thonart, 2004). Sobre esta base, diferentes grupos de investigación a nivel mundial han intensificado la búsqueda de aislados de estas dos especies bacterianas, para su posterior estudio de los mecanismos de acción y desarrollo de procesos eficientes de producción y formulación (Falconí & Yáñez-Mendizábal, 2017; Ongena et al., 2007; Ongena & Jacques, 2008; Yáñez-Mendizábal et al., 2011).

Para el desarrollo de procesos de producción y formulación de *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*, una vez demostrado su potencial de biocontrol contra enfermedades que afectan vegetales, el punto clave es determinar su modo de acción mediado por la producción de células, endosporas y metabolitos biocidas. Los estudios conducidos por Ongena et al., 2007; Touré et al., 2004; Yáñez-Mendizábal, Viñas, Usall, Cañamás, & Teixidó, 2012, han demostrado que la efectividad de ambas especies bacterianas está directamente relacionada a su capacidad para producir una amplia variedad de moléculas bioactivas con potente acción biocida y de estimulación de defensas secundarias en las plantas. Adicionalmente, el amplio espectro de aplicación de las biomoléculas producidas por estas bacterias se ha extendido al sector biotecnológico especialmente agrícola, industrial, y ambiental (Ongena & Jacques, 2008; Yáñez-Mendizábal, Viñas, Usall, Torres, Solsona, & Teixidó, 2012). Entre las biomoléculas

producidas por *Bacillus spp.* se ha demostrado que la mayor actividad biocida para el control de patógenos vegetales, especialmente hongos filamentosos y esporulados, se debe a compuestos como: enzimas líticas, lipopéptidos, antibióticos y péptidos no ribosomales (Falconí & Yáñez–Mendizábal, 2016; Ongena & Jacques, 2008). De estas diversas biomoléculas la mayoría de los estudios describen que los lipopéptidos cíclicos producidos por *Bacillus spp.* pertenecientes a las familias: Surfactinas, Iturinas y Fengicinas son los factores mayor involucrados en la actividad biocida de estas bacterias (Yáñez-Mendizábal et al., 2011).

Aunque los lipopéptidos están implicados en la activación de la resistencia sistémica inducida, se sabe poco sobre las respuestas de defensa inducidas por estas moléculas y su participación en la resistencia local a los hongos (Farace et al., 2015). El potencial de biocontrol de *B. subtilis* está relacionado con el fuerte antagonismo desarrollado por la cepa. Además, el nivel de protección proporcionado por la bacteria aumenta proporcionalmente con el número de células bacterianas utilizadas para el tratamiento. Esto sugiere que la antibiosis debido a la producción de compuestos fungitóxicos juega un papel importante en la inhibición de las enfermedades causadas por patógenos. (Touré et al., 2004).

La composición química de los lipopéptidos de *Bacillus subtilis* hace que su actividad biológica sea sujeta a amplias investigaciones (Falardeau, Wise, Novitsky, & Avis, 2013). En investigaciones hechas en el tallo de soya se demostró la inhibición del crecimiento de hongos formadores de esclerocio gracias a la presencia de proteínas antifúngicas secretadas al medio externo por la bacteria (Alvarez et al., 2012). Los isómeros de Surfactinas corresponden a lipopéptidos cíclicos con colas de aminoácidos y generalmente por si solos no tienen características antifúngicas, pero si surfactantes por lo cual actúan en sinergismo con Fengicinas e Iturinas. Los estudios realizados sobre estos lipopéptidos han demostrado que la actividad antifúngica de las Surfactinas es menor en comparación con las Fengicinas e Iturinas, y se ha comprobado que

la secreción al medio de este lipopéptido favorece la colonización bacteriana en la rizósfera y tejidos radiculares, favoreciendo la liberación de Fengicinas e Iturinas como antifúngicos (Cawoy et al., 2015).

Para el control de la antracnosis del chocho andino (*Lupinus mutabilis*) causada por *Colletotrichum acutatum* estudios realizados por nuestro grupo de investigación han demostrado que diferentes aislados nativos provenientes de regiones productoras son efectivos en el control de la enfermedad en la semilla y en el campo (Claudio, 2016; Grijalva, 2015; Samaniego, 2016).

## 1.2 Planteamiento del problema

El chocho andino (*Lupinus mutabilis* Sweet) es una leguminosa con gran importancia en el mercado nacional e internacional, debido a sus bondades nutritivas. Esta especie es originaria de la zona andina, y está considerado dentro de los alimentos que forman parte de la soberanía alimentaria del Ecuador (Caicedo & Peralta, 2001). En el mercado agroindustrial internacional, *L. mutabilis* es una especie con alta demanda debido a sus características nutricionales como el contenido proteico, grasas insaturadas, y de hierro. Sin embargo, la producción nacional y regional de este cultivo es baja, si se compara con otras especies comestibles del género *Lupinus*, debido a cambios climáticos y a la exposición a patógenos que disminuyen la calidad de la planta (Falconí & Yáñez-Mendizábal, 2016; Farace et al., 2015; Oliva, 2015; Yáñez-Mendizábal et al., 2011).

En Ecuador la producción de chocho andino es afectada principalmente por enfermedades y plagas. El chocho presenta diversos tipos de enfermedades causados por hongos, por ejemplo la antracnosis causada por *Colletotrichum acutatum* puede causar daños severos en el campo a lo largo de todo el ciclo de producción y pérdidas totales de la producción de semillas, las mismas que

quedan en estado de latencia (Alarcón, Falconi, & Oleas, 2012; Caicedo & Peralta, 2001). Adicionalmente, malas prácticas de selección, almacenamiento y siembra de semilla enferma pueden incrementar significativamente el desarrollo de la enfermedad y el bajo rendimiento agrícola. Debido a esto la búsqueda de estrategias de control eficientes de la enfermedad es prioritario.

Para el control de la antracnosis en el campo y en postcosecha las estrategias tradicionales involucran el uso de agroquímicos que causan un impacto negativo en la salud humana y el ambiente. Sin embargo, el uso de compuestos químicos en la mayoría de áreas de cultivo resultan ineficientes además de nocivos para el ambiente y la salud humana y animal (Lawrance et al., 2014). Debido a esto, el uso de métodos alternativos, a la aplicación de agroquímicos sintéticos, como sustancias de baja toxicidad, métodos fisicoquímicos y métodos de control biológico se vienen desarrollando con éxito para el control de la antracnosis del chocho andino (*Lupinus mutabilis* Sweet) causada por *Colletotrichum acutatum* (Falconí & Yáñez-Mendizábal, 2017; Falconí & Yáñez–Mendizábal, 2016; Meng, Yu, Yu, Yin, & Liu, 2015; Thomas & Sweetingham, 2003).

Dentro de los métodos alternativos el uso de tratamientos a la semilla de *L. mutabilis* con calor seco, radiación UV-C, solarización y control con bacterias como *Bacillus* spp. y/o sus metabolitos han demostrado resultados promisorios (Falconí & Yáñez-Mendizábal, 2017; Falconí & Yáñez–Mendizábal, 2016; Yáñez–Mendizábal, Falconí, & Grijalva, 2015). Dentro del control biológico con *Bacillus subtilis* estudios previos han demostrado la efectividad de aislados nativos mediada por la producción de lipopéptidos que actúan en postcosecha y campo reduciendo la incidencia de la antracnosis. Estos resultados demuestran que el potencial de biocontrol de esta bacteria está directamente relacionado con su capacidad para producir lipopéptidos antifúngicos igual que para otros aislados eficientes en el control de enfermedades en campo (Dunlap, Schisler, Bowman, & Rooney, 2015; D Romero, Vicente, Zerriouh, Cazorla, & Fernández-ortuño, 2007) y postcosecha (Alarcón et al., 2012; Yáñez-Mendizábal et al., 2012;



Yáñez-Mendizábal, Viñas, Usall, Torres, Solsona, & Teixidó, 2012). Adicionalmente, estudios para preliminares para optimizar la masificación de estas bacterias demuestran que la producción de biomasa y lipopéptidos *in vitro* es codependiente de los parámetros bióticos, abióticos y del tiempo de crecimiento. Sin embargo, los patrones de producción de lipopéptidos y su dependencia de las variaciones de biomasa (biomasa y endosporas) no han sido aún determinados. En este contexto, el objetivo de esta investigación es analizar los patrones de producción de *Bacillus subtilis* Ctpx S2-1 como base previa para desarrollar programas de producción y formulación de biopesticidas eficientes en el control de la antracosis del chocho andino causada por *Colletotrichum acutatum* (Thomas & Adcock, 2004).

### 1.3 Objetivo general

Analizar de los patrones de producción de lipopéptidos antifúngicos de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1

### 1.4 Objetivos específicos

Caracterizar los patrones de producción de lipopéptidos antifúngicos de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 en las diferentes fases de crecimiento de la bacteria en medios de cultivo de laboratorio y de bajo costo mediante análisis bioquímico (HPTLC) y de actividad biológica (HPTLC-Autobiografía).

Identificar los genes involucrados en la producción de lipopéptidos antifúngicos de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 mediante amplificación de secuencias que codifican para los diferentes isómeros de las familias Iturinas, Surfactinas y Fengicinas.

Determinar la correlación entre las concentraciones de lipopéptidos totales y de las concentraciones de biomasa / endosporas producidas en biorreactor.

### 1.5 Justificación de la investigación

Para el control de la antracnosis del chocho andino (*Lupinus mutabilis* Sweet) causada por *Colletotrichum acutatum*, métodos alternativos al uso de agroquímicos sintéticos están siendo desarrollados con éxito. Estos métodos involucran el uso de tratamientos a la semilla con calor seco, radiación UV-C, solarización y control con bacterias como *Bacillus spp.* y/o sus metabolitos. Dentro del control biológico con *Bacillus* estudios previos han demostrado la efectividad de aislados nativos mediada por la producción de lipopéptidos que actúan en postcosecha y campo reduciendo la incidencia de la antracnosis. Adicionalmente, estudios para preliminares para optimizar la producción estas bacterias demuestran que la producción de biomasa y lipopéptidos in vitro es codependiente de los parámetros bióticos, abióticos y del tiempo de crecimiento. Sin embargo, los patrones de producción de lipopéptidos y su dependencia de las variaciones de biomasa (biomasa y endosporas) no han sido aún determinados.

Diferentes tipos de lipopéptidos han demostrado ser eficientes para el control de la antracnosis del chocho andino causada por *C. acutatum*. En este contexto, la identificación de los patrones de producción de los lipopéptidos producidos por *Bacillus subtilis* aislado Ctpx S2-1, y su relación con la activación de genes que codifican para las principales familias de lipopéptidos antifúngicos servirá de base preliminar para la optimización de procesos de producción y formulación de biopesticidas a nivel comercial.

## **2. Marco teórico**

### **2.1 *Bacillus subtilis* y sus aplicaciones**

#### **2.1.1 Características biológicas de *Bacillus subtilis***

*Bacillus subtilis* es una bacteria Gram- positiva no patógena la misma que durante la última década ha surgido como un organismo modelo para la producción de diversas moléculas bioactivas (Vlamakis, Chai, Beauregard,

Losick, & Kolter, 2013). Debido a sus características morfológicas, la producción de esporas, su uso como control biológico y la formación de biofilms, tiene un alto interés industrial (Yáñez–Mendizábal, 2012). *B. subtilis* debido a su capacidad formadora de esporas (Figura 1.), resistentes a la radiación con luz UV y la desecación, puede incrementar su supervivencia en la rizósfera vegetal, por lo que posee una ventaja en comparación a otros organismos, esta habilidad ha permitido que las bacterias del género *Bacillus* sean utilizadas en el desarrollo de biopesticidas desde un punto de vista tecnológico (Ongena & Jacques, 2008).

Las bacterias Gram positivas son normalmente las principales productoras de esporas, estas se producen de manera natural como mecanismo de supervivencia ante condiciones ambientales adversas o extremas para la bacteria. Se producen principalmente al estar expuestas a estas condiciones tras largos periodos. Para *B. subtilis* la esporulación ha servido como herramienta para identificar procesos transcripcionales y su ciclo celular a nivel molecular. La esporulación incluye el control temporal y espacial de la expresión génica, la comunicación intercelular y diversos aspectos de la morfogénesis celular. (Errington, 2003; Yáñez–Mendizábal, 2012).

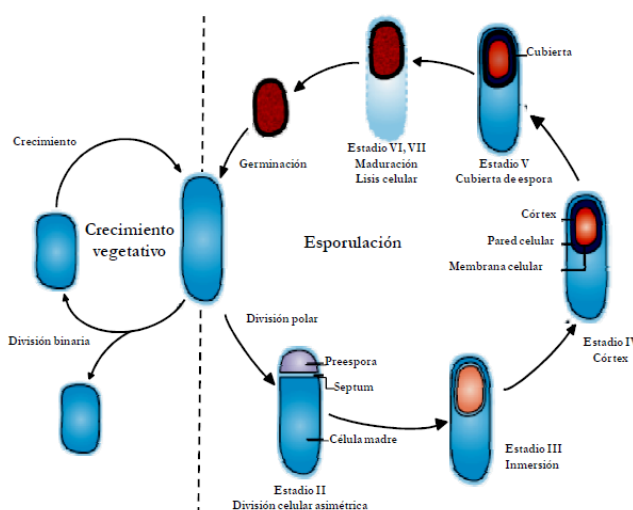


Figura 1. Ciclo de producción de endosporas y célula vegetativa

Tomado de: (Errington, 2003; Yáñez–Mendizábal, 2012)

### 2.1.2 Aplicaciones de *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* es un microorganismo con alto interés industrial, esto se debe a su alta tasa de crecimiento, los ciclos cortos de fermentación, bajos costos de producción y, además esta bacteria es capaz de secretar la mayoría de las proteínas producidas de manera extra celular, *B. subtilis* es considerado un microorganismo GRAS (*generally regarded as safe*), seguro en el uso en la producción de alimentos y medicamentos, además de ser un buen candidato como biocontrol para enfermedades post cosecha (Chen, Zhang, Fu, Li, & Wang, 2016; Yáñez–Mendizábal, 2012).

En la industria se ha usado a *B. subtilis* en la producción de biosurfactantes, producción de alimentos, bio-fármacos, enzimas, agricultura. Esta bacteria al no ser un organismo patógeno es usada ampliamente en la industria alimentaria como probiótico, y ha demostrado tener efectos ventajosos en plantas animales y seres humanos. Actúa mediante activación de mecanismos de resistencia inducida. En animales se ha logrado mejorar los estándares de nutrición y salud (Seyed, Jamshid, & Marzieh, 2015). Estudios previos revelaron que la antibiosis era uno de los principales mecanismos de *Bacillus spp.* contra patógenos de plantas, siendo varios los antibióticos producidos y no de tipo ribosomal en el caso del control de patógenos en plantas, en el caso del algodón, maíz y soya se ha demostrado que la acción de los compuestos lipopeptídicos inhiben el crecimiento de diversos tipos de hongos que afectan a estos cultivos (Chen et al., 2016; Falardeau et al., 2013; Guo et al., 2014)

*B. subtilis* es también un modelo de laboratorio para bacterias Gram positivas y se cultiva en fermentadores a escala industrial para la producción de enzimas y vitaminas (Pierre et al., 2013). Este organismo tiene un promedio de 4-5% de su genoma dedicado a la síntesis de antibióticos y tiene el potencial de producir más de dos docenas de compuestos antimicrobianos estructuralmente diversos (Ongena & Jacques, 2008).

## 2.2 Lipopéptidos antifúngicos de *Bacillus spp.*

Las moléculas bioactivas producidas por *B. subtilis* tienen una capacidad antibiótica y antifúngica, además de poseer una estructura química compleja. (Yáñez–Mendizábal, 2012). Los lipopéptidos son moléculas versátiles con un alto potencial y viabilidad capaces de remplazar a los surfactantes sintéticos utilizados en las industrias agrícolas, farmacéuticas, de alimentos y cosméticos. Los surfactantes son sustancias que reducen la tensión superficial del agua (Lawrance et al., 2014). Varias especies de Bacilos están involucradas en la biosíntesis de lipopéptidos, *Bacillus spp.* tiene la característica de producir una amplia gama de moléculas bioactivas con potencial fitopatógeno (Rangarajan & Clarke, 2016). Los lipopéptidos, oligopéptidos sintetizados de forma no ribosomal por grandes complejos multienzimáticos, son los compuestos antibióticos más frecuentes producidos por este género, y exhiben un amplio espectro antimicrobiano con actividades excepcionales de surfactante (Diego Romero, Vicente, Rakotoaly, Dufour, Veening, et al., 2007).

A pesar de que las bacterias Gram negativas han demostrado una alta producción de metabolitos antimicrobianos, las bacterias Gram positivas producen una gran cantidad de compuestos bioactivos contra hongos o bacterias, dentro de estos se pueden encontrar switermicina-A, kanosamina y lipopéptidos, Surfactinas Iturinas y Fengicinas (Touré et al., 2004; Yáñez–Mendizábal, 2012)

### 2.2.1 Lipopéptidos, características generales y su aplicación

Los tensoactivo sintetizados por bacterias, levaduras y hongos tienen ventajas especiales sobre los surfactantes comerciales debido a su baja toxicidad, biodegradabilidad, compatibilidad ambiental, mayor capacidad de formación de espuma y especificidad a temperaturas extremas, pH, salinidad y síntesis directa (Diego Romero, Vicente, Rakotoaly, Dufour, Arrebola, et al., 2007).

Los surfactantes de origen microbiano están ganando importancia en diversas aplicaciones industriales para la formación y estabilización de espuma en el procesamiento de alimentos, como detergentes para limpieza doméstica, dispersión de fase para cosméticos y textiles, para la solubilización de agroquímicos y para la biorremediación de contaminantes insolubles en agua. El primer tensoactivo derivado biológicamente se descubrió en *Bacillus subtilis*, que está compuesto por ocho péptidos con 13-16 átomos de carbono como parte del sistema de anillos. (Castro-Longoria, Trejo-guillén, Vilchis-nesor, & Avalos-borja, 2014; Chen, Juang, & Wei, 2015a; Pathak, Keharia, Gupta, Thakur, & Balaram, 2012)

Iturinas y Fengicinas muestran una fuerte actividad antifúngica y son inhibitorias para el crecimiento de una amplia gama de patógenos de plantas. Las Surfactinas no son fungitóxicas por sí mismas, pero conservan algún efecto sinérgico sobre la actividad antifúngica de la Iturina A (Ongena et al., 2005). Diferentes compuestos homólogos para cada familia de lipopéptidos se suelen coproducir (Falardeau et al., 2013).

### 2.2.2 Síntesis de lipopéptidos antifúngicos de *Bacillus subtilis* y sus mecanismos de acción.

Los lipopéptidos son proteínas cíclicas que se sintetizan a partir de complejos multienzimáticos (Yáñez–Mendizábal, 2012). Estos sistemas de biosíntesis conducen a una notable heterogeneidad entre los productos generados por *Bacillus subtilis* con respecto al tipo y secuencia de residuos de aminoácidos, la naturaleza de la ciclación de péptidos y la naturaleza, longitud y ramificación de la cadena de ácidos grasos (Ongena & Jacques, 2008).

Las cepas de *B. subtilis* producen una amplia variedad de metabolitos antifúngicos potentes, entre los que se encuentran los lipopéptidos de las familias Surfactina, Iturina y Fengicina. Estos péptidos anfifílicos cíclicos están

compuestos de siete  $\alpha$ -aminoácidos para el caso de Surfactinas e Iturinas y de diez  $\alpha$ -aminoácidos para la familia de Fengicinas. (Ongena et al., 2005). Las cadenas de  $\alpha$ -aminoácidos en las Iturinas se encuentran unidas a un único ácido graso  $\beta$ -amino, mientras que en las Surfactinas e iturinas esta cadena se encuentra unida a un  $\beta$ -hidroxi. La longitud de esta cadena de ácidos grasos puede variar de C13 a C16 para las Surfactinas, de C14 a C17 para las Iturinas y de C14 a C18 en el caso de las Fengicinas. Sobre la base de la amplia diversidad de poderosos metabolitos antifúngicos que pueden ser sintetizados por *B. subtilis* se sugiere que la producción de antibióticos por estas cepas desempeña un papel principal en la supresión de la enfermedad de las plantas. (Ongena et al., 2005; Diego Romero, Vicente, Rakotoaly, Dufour, Arrebola, et al., 2007).

#### Expresión biológica

Los mecanismos bioquímicos responsables de la biosíntesis de péptidos no ribosomales involucran una cascada de reacciones reguladas por el operón Surfactina sintetasa y principalmente los factores ambientales son los que intervienen en la producción de lipopéptidos. Aproximadamente entre el 4 y 5 % del genoma de *B. subtilis* se dedica a la producción de moléculas bioactivas que son capaces de inducir el crecimiento y respuesta ante ataques físicos, químicos, etc. (Calvo & Zuñiga, 2010; Jacques, 2011; Yáñez–Mendizábal, 2012). *B. subtilis* provee un control eficaz contra patógenos en ensayos *in vitro*, por lo que el uso como control biológico se presenta como una alternativa (D. Romero, Perez, Rivera, Cazorla, & de Vicente, 2004).

El ajuste de los transcriptomas en las bacterias les permite adaptarse a diferentes condiciones ambientales por lo que es muy complejo el sistema de acción, no se ha identificado el potencial completo establecido para cualquier especie bacteriana de manera individual (Pierre et al., 2013). Se han podido caracterizar más de 30 lipopéptidos diferentes producidos por varias cepas de

*Bacillus spp.* con un alto potencial producción y el crecimiento exponencial de secuencias genómicas ha permitido describir nuevas familias o variantes de lipopéptidos (Jacques, 2011).

### 2.2.3 Diversidad Estructural de lipopéptidos

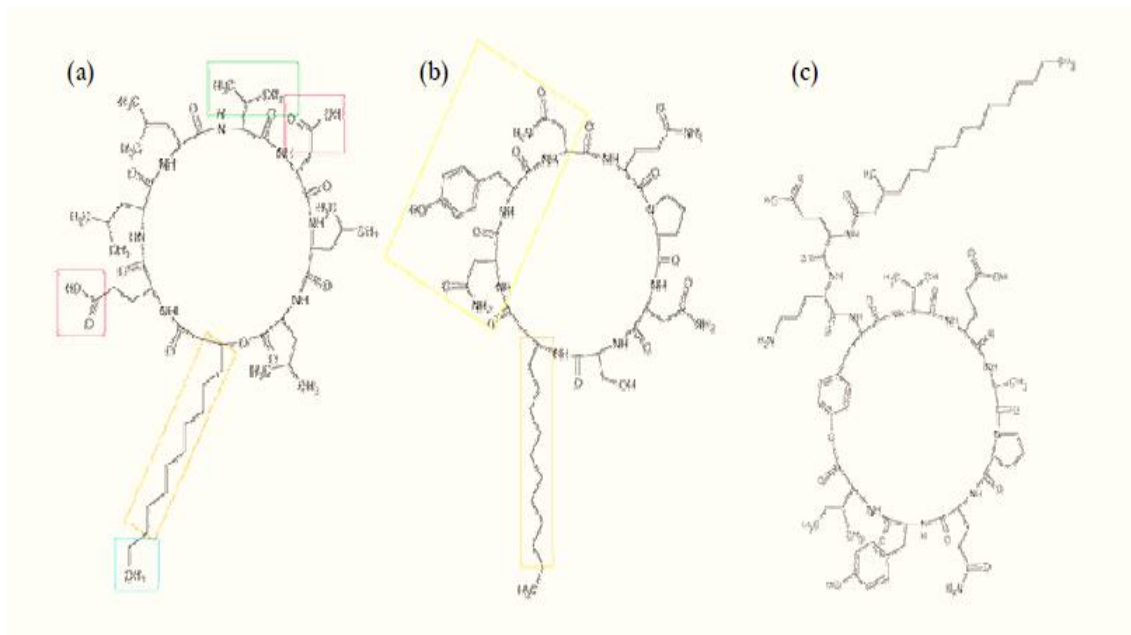
Los diferentes isómeros de lipopéptidos están agrupados en las familias: Fengicinas, Surfactinas, e Iturinas (Figura 2). Son compuestos homólogos, conformados por una cadena de ácido graso y un péptido con una secuencia específica de aminoácidos y fueron determinados como agentes antifúngicos (Jacques, 2011). Estructuralmente son moléculas anfipáticas que comprenden restos hidrofóbicos e hidrofílicos, siendo el componente apolar generalmente una cadena de carbono, mientras que la parte polar, más variable, puede ser iónica o no (Pereira et al., 2013). En general, los lipopéptidos bioactivos expresados naturalmente contienen un grupo de cabeza de péptido cíclico unido a una única cadena de lípidos. La ciclación de la unidad peptídica como en muchos lipopéptidos expresados bacterianamente aumenta la estabilidad in vivo del motivo en comparación con la contraparte lineal. Esto es resultado de proteólisis producida por la ausencia de extremos C y N libres. Por supuesto, la ciclación también restringe la conformación del péptido que también puede ser relevante para la bioactividad (Hamley, 2015).

**Fengicinas.** - Son biosurfactantes que muestran una fuerte actividad fungitóxicas, específicamente contra hongos filamentosos y es inhibidor del crecimiento de una amplia gama de patógenos de plantas (Chtioui, Dimitrov, Gancel, Dhulster, & Nikov, 2014). Fengicina es uno de los lipopéptidos antifúngicos más complejos producidos por *Bacillus subtilis*. Inhibe principalmente el crecimiento de hongos filamentosos, la inhibición se antagoniza con esteroides, fosfolípidos y ácido oleico, mientras que otros dos ácidos grasos insaturados aumentan el efecto antifúngico (Vanittanakom & Loeffler, 1986).



**Las Iturinas** A y C, las Bacillomicinas D, F, L se describieron como las variantes principales dentro de la familia de la Iturina. Son heptapéptidos unidos a una cadena de ácido graso  $\beta$ -amino con una longitud de 14 a 17 carbonos. Aunque también son fuertemente hemolíticos, la actividad biológica de las Iturinas es diferente a las Surfactinas: muestran una fuerte acción antifúngica *in vitro* contra una amplia variedad de levaduras y hongos, y sólo muestran actividad antibacteriana pero no antiviral (Jin et al., 2015; Ongena & Jacques, 2008).

**Surfactinas.** - Las Surfactina es uno de los compuestos más poderosos dentro de los biosurfactantes, están compuestas aproximadamente de 20 diferentes tipos de lipopéptidos, tienen la estructura común de un heptapéptido unido a un grupo carboxilo y un grupo hidroxilo (Chen et al., 2015a). La secuencia quiral se encuentra interconectada con un ácido graso  $\beta$ -hidroxi y con un D-Leu en la posición 3 y 6, y una L-Asp en la posición 4. Los residuos de aminoácidos en las posiciones 2, 4 y 7 pertenecen al grupo alifático que incluye Val, Leu e Ile. También se observó una Surfactina con Ala en la posición 4 (Jacques, 2011). Son poderosos biosurfactantes con excepcionales propiedades emulsionantes y espumosas. Debido a su naturaleza anfifílica, las Surfactinas también pueden asociarse fácilmente y anclarse firmemente en capas de lípidos y, por lo tanto, pueden interferir con la integridad de la membrana biológica de una manera dependiente de la dosis (Ongena & Jacques, 2008)



*Figura 2.* Principales representantes de familias de lipopéptidos.

Tomado de: (Yáñez–Mendizábal, 2012).

- a) Representante de la familia de Surfactinas
- b) Representante de la familia de Iturina
- c) Representante de la familia de Fengicinas

#### 2.2.4 Aplicaciones de los lipopéptidos

Los agentes tensoactivos son una clase de compuestos químicos utilizados en diferentes sectores de la industria moderna, como la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética y petrolera. Estos compuestos son capaces de reducir las tensiones superficiales y de interfaces. Debido a cuestiones ambientales la demanda de surfactantes biodegradables y producidos naturalmente por microorganismos está aumentando. El uso de estos biocompuestos como alternativa a los tensoactivos químicos tradicionales se ha visto impulsado por su elevado potencial además de su baja toxicidad, mayor biodegradabilidad y eficacia a temperaturas extremas, salinidad y condiciones de pH (Pereira et al., 2013). El lipopéptido antibiótico Iturina A es un bioplaguicida atractivo con el

potencial de reemplazar pesticidas químicos para controlar patógenos de plantas.

### 2.3 Producción *in vitro* – Proceso en biorreactor

Los biosurfactantes han adquirido un alto interés industria en los últimos años porque tienen ventajas que favorecen su uso como: menor toxicidad, mayor biodegradabilidad, mejor compatibilidad ambiental, actividad específica bajo condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad, además su alta capacidad de ser sintetizados a partir de materia prima renovable y de bajo costo (Chen, Juang, & Wei, 2015b).

El uso de materias primas de bajo costo de fuentes abundantes puede ser un aspecto importante para mejorar la viabilidad económica de la industria. Los lipopéptidos superficiales derivados de microbianos se producen generalmente por fermentación usando microorganismos en sustratos miscibles o inmiscibles en agua. Pueden ser producidos por bacterias, mohos o levaduras. Para inducir la máxima productividad de biosurfactantes en el medio, es necesario añadir componentes al medio y establecer condiciones de cultivo óptimas que potencien dicha producción. De hecho, los parámetros nutricionales y fisicoquímicos como el pH, la temperatura y la aireación pueden influir en la producción de lipopéptidos y por lo tanto, en el costo de la fermentación (Mnif & Dhouha, 2015). En general, los costos de la bioproducción dependen en gran medida del diseño meticuloso y eficiente de las operaciones de purificación en *downstream*, que pueden representar casi el 70% del costo total de producción. Sin embargo, la purificación de biosurfactantes, particularmente los lipopéptidos, a diferencia de otros compuestos biológicos tales como proteínas y antibióticos cuya purificación *downstream* no está bien establecida por lo que continua siendo un problema (Rangarajan & Clarke, 2016).

### 3. Diseño del plan experimental

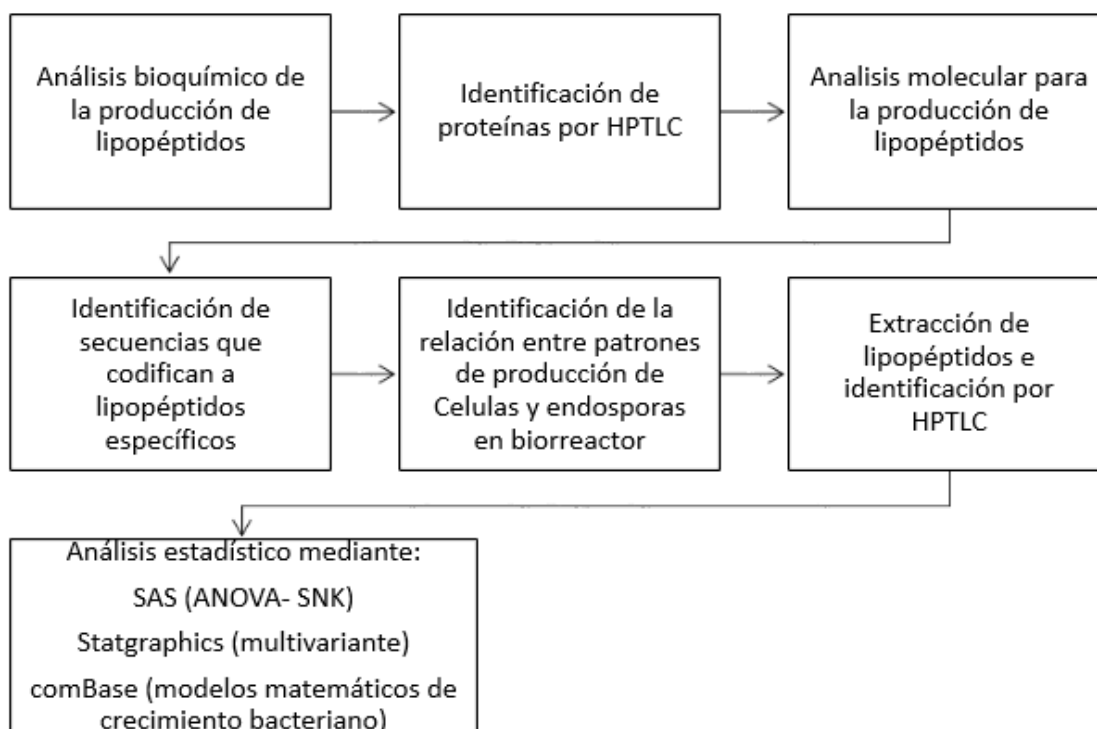


Figura 3. Diagrama de flujo del procedimiento experimental. Se muestran los procesos a realizar durante la fase experimental del proyecto.

### 4. Procedimientos

#### 4.1 Determinación de la población

Dentro de la familia *Bacillaceae*, se encuentra el género *Bacillus* en el cual se han identificado por lo menos 60 especies siendo todas de tipo Gram positivas bacilares capaces de formar endosporas (Yáñez-Mendizábal et al., 2012). El aislamiento de las especies de *Bacillus spp.* se realizaron a partir de muestras de filósfera y rizósfera de provincias de Cotopaxi y Chimborazo (Grijalva, 2015; Oliva, 2015). Se ha estudiado la capacidad antagónica de las bacterias del género *Bacillus spp.* principalmente ante hongos, que resultan ser la mayor causa de enfermedades patogénicas en los cultivos.

## 4.2 Determinación de la muestra

La bacteria *Bacillus subtilis* Cptx S2-1 fue aislada de filósfera y rizósfera suelo y material vegetal de cultivos de Chocho (*Lupinus mutabilis*) en la provincia de Cotopaxi en la localidad de Salcedo. Las áreas de cultivo de *L. mutabilis* son manejadas por grupos focales de agricultores y por el Programa Nacional de Leguminosas y granos andinos del INIAP. Además, esta bacteria produce compuestos lipopeptídicos que inhiben el crecimiento micelial de *C. acutatum*. (Oliva, 2015).

## 4.3 Descripción de los materiales y métodos

### 4.3.1 Mantenimiento de la cepa *Bacillus subtilis* y *Colletotrichum acutatum*

La cepa de *Bacillus subtilis* CptxS2-1 se obtuvo a partir criobolas del Banco de cepas del Centro de Investigación UDLA y se mantuvo en medio NYDA (caldo nutritivo 8 g L<sup>-1</sup>, extracto de levadura 5 g L<sup>-1</sup>, agar 20 g L<sup>-1</sup>, dextrosa 10 g L<sup>-1</sup>) (Samaniego, 2016; Yáñez-Mendizábal et al., 2012) se realizaron triples estrías y se incubó en un agitador (*High Performance Shaking Incubator Labnet International* 311DS®) a 30 ° C por 24 horas.

La cepa de *Colletotrichum acutatum* se obtuvo a partir criobolas del Banco de cepas del Centro de Investigación UDLA y se mantuvo en medio papa dextrosa agar (PDA), usando 39 g de agar por cada litro. Se incubó a temperatura ambiente entre 5-7 días.

### 4.3.2 Calibración de Inóculo

Inóculo *Bacillus subtilis*: Para la obtención del inóculo se refresco la cepa de *B. subtilis* Cptx S2-1 en una triple estría en medio NYDA, se incubó la placa durante 24 horas a 30°C. En un tubo falcon con solución tampón estéril (buffer fosfato

PBS pH = 6.5) se re suspendió la biomasa y se homogenizó entre 6 a 7 segundos usando un vórtex (*Fisher Scientific® AnaLog Vortex Mixer 20V 02215365*). Para determinar el crecimiento de la cepa midió la densidad celular por absorbancia a 600nm (Yáñez-Mendizábal, Viñas, Usall, Vicente, & Pérez-garcía, 2012). El inóculo inicial llegó a una concentración celular de  $5 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>

Inóculo *Colletotrichum acutatum*: Se inocularon placas con papa dextrosa agar (PDA) y se dejó incubar a temperatura ambiente entre 5-7 días, una vez que se formó una capa rosa del hongo, se recolectó en un tubo con 5mL de agua estéril con tweed 20. Se procuró recolectar los conidios hasta alcanzar una concentración entre  $5 \times 10^5$  y  $5 \times 10^6$ , los conteos celulares se observaron en cámara de Neubauer.

#### 4.3.3 Curva decrecimiento en biorreactor

El crecimiento se realizó de acuerdo a los protocolos diseñados por V Yáñez-Mendizábal et al., 2011 para *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 en medio de cultivo líquido MOLP (Medio optimizado para la producción de lipopéptidos) y en medio de bajo costo HS40-MOLP2 a base de harina de soya 40 g L<sup>-1</sup>, melaza 2 g L<sup>-1</sup> se evaluó durante 0 hasta 80 horas con muestreos cada 2 horas a 30°C y 200 rpm. La modelización se realizó con un diseño completamente al azar con un tratamiento y dos repeticiones. Para cada tiempo de evaluación se determinó la producción de biomasa en unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC mL<sup>-1</sup>) mediante dilución y siembra en medio NYDA (Samaniego, 2016).

Los datos obtenidos en UFC mL<sup>-1</sup> se transformaron a logaritmo en base diez (Log UFC mL<sup>-1</sup>). Para modelizar la curva de crecimiento se utilizó el modelo matemático de crecimiento sigmoideo propuesto por Baranyi y Roberts (1994), en base al cual se especificó la variación de concentraciones Log<sub>10</sub> UFC mL<sup>-1</sup> en función del tiempo (Grijalva, 2015; Oliva, 2015; Samaniego, 2016). Para el

análisis de los datos se usó el software ComBase® y las ecuaciones generadas a partir de este:

$$y(t) = y_o + \mu_{max}A(t) - \frac{1}{m} \ln \left[ e^{m\mu_{max}A(t)} - \frac{1}{e^{m(y_{max}-y_o)}} \right] \quad \text{(Ecuación 1)}$$

$$A(t) = t + 1/\mu_{max} \ln \left( e^{-\mu_{max}t} + \frac{q_o}{1 + q_o} \right) \quad \text{(Ecuación 2)}$$

$$\lambda = \ln \left( 1 + \frac{1}{q_o} \right) / \mu_{max} \quad \text{(Ecuación 3)}$$

Donde  $y(t)$  es el logaritmo natural de la concentración de células en el tiempo  $t(h)$ ;  $y_o$  es el logaritmo natural de la concentración de células en tiempo 0;  $\mu_{max}$  es la tasa máxima de crecimiento específico ( $h^{-1}$ );  $A(t)$  es la variable integral desde el tiempo 0 al tiempo  $t(h)$ ;  $m$  es el parámetro relacionado con la curvatura después de la fase exponencial;  $y_{max}$  es el logaritmo natural de la máxima concentración de células,  $q_o$  es el estado fisiológico de la célula al tiempo 0 y es la duración de la fase de latencia.

#### 4.3.4 Fermentación de *Bacillus subtilis* en Biorreactor

Se realizó un proceso de fermentación por lotes en un biorreactor (*Ampplikon*® eZ control 7L ), se prepararon 5L de Medio Optimizado para la Producción de lipopéptidos (MOLP: Peptona 30 g L<sup>-1</sup>; Sacarosa 20 g L<sup>-1</sup>; Extracto de levadura 7 g L<sup>-1</sup>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.9 g L<sup>-1</sup>; CuSO<sub>4</sub> 0.0001 mg L<sup>-1</sup>; FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O 0.0005 mg L<sup>-1</sup>; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 0.004 mg L<sup>-1</sup>; KI 0.0002 mg L<sup>-1</sup>; MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 3.6 mg L<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub> 0.45 g L<sup>-1</sup>; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.14 mg L<sup>-1</sup>; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.01 mg L<sup>-1</sup>; C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> 10 mg L<sup>-1</sup>; pH 7) (Jacques et al., 1999). El biorreactor se calibró siguiendo las instrucciones de acuerdo al manual. El medio se autoclavó a 121°C por 30 minutos, el proceso de fermentación se realizó a 30°C, con una agitación a 200 rpm, pH de 6,5; suministro de oxígeno suficiente para el crecimiento celular. Se inóculo con 5mL de suspensión de *B. subtilis* CprXS2-1 con concentración de  $5 \times 10^7$  células. Se

suministró antiespumante (Sigma® *Antifoam* 204) al 0,01% de manera constante. Se tomaron muestras cada 24 h durante 3 días.

Se replicó el experimento con el medio de bajo costo HS40-MOLP2 (Melaza 2 g L<sup>-1</sup>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,9 g L<sup>-1</sup>; Harina de soya 40 g L<sup>-1</sup>; CuSO<sub>4</sub> 0.0001 mg L<sup>-1</sup>; FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O 0.0005 mg L<sup>-1</sup>; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 0.004 mg L<sup>-1</sup>; KI 0.0002 mg L<sup>-1</sup>; MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 3.6 mg L<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub> 0.45 g L<sup>-1</sup>; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.14 mg L<sup>-1</sup>; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.01 mg L<sup>-1</sup>; C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> 10 mg L<sup>-1</sup>; pH 7) , en un reactor de 5 L. con condiciones optimizadas tomando muestras cada 24 horas por 3 días en tubos falcón de 50 mililitros y un tubo de 15 mililitros.

#### 4.3.5 Análisis Bioquímico

##### 4.3.5.1 Producción de endosporas y biomasa

La cuantificación de endosporas y biomasa se realizó siguiendo los protocolos diseñados por V Yáñez-Mendizábal et al., 2011. Se tomó una muestra de 6mL en un tubo falcón (Boeco Germany de 15 mL) para realizar cultivo de biomasa y endosporas. Las muestras fueron tomadas del biorreactor (Amplikon® eZ control 7L) con las condiciones que se especifican en el apartado 4.3.3. Se preparó tubos de ensayo de 5 mL y 4.5 mL con buffer fosfato (PBS a pH 6.5). Se realizó diluciones seriadas desde 10<sup>-2</sup> hasta 10<sup>-8</sup> en bancos de diluciones dobles. El procedimiento se repitió 3 veces para medio MOLP y medio de bajo costo HS40-MOLP2. Las muestras de biomasa se tomaron cada 24 horas por 3 días.

La producción de endosporas se empezó a analizar a partir de las 24 horas, se eliminó la biomasa presente en el medio colocándolas a 80° centígrados por 20 minutos para las muestras de medio MOLP. Para las muestras provenientes del medio HS40-MOLP2 se realizó el mismo procedimiento en un periodo entre 20 - 30 minutos. Se tomó muestras cada 24 horas por 3 días. La cuantificación de colonias viables y endosporas se realizó mediante el conteo de UFC que



resultaron de la siembra de 100  $\mu$ L en medio NYDA. Las placas inoculadas se incubaron (High Performance Shaking Incubator Labnet International 311DS®) a 30 ° C durante 24 horas (Samaniego, 2016).

#### 4.3.5.2 Extracción de lipopéptidos

La extracción de lipopéptidos se realizó siguiendo los protocolos establecidos por Yáñez-Mendizábal et al., 2012. Del biorreactor se tomaron muestras en tubos falcón (Boeco 50 mL) y se centrifugó (Eppendorf Centrifuge 5804R® A4-44) por 40 minutos a 5000 rpm y a 4°C, se separó la biomasa del sobrenadante libre de células (SLC) el proceso se repitió de 2 a 3 veces. El sobrenadante se filtró con filtros de 0,2  $\mu$ m. Se colocó el SLC + n-butanol en relación 1:1, en frascos Boeco con tapa de 250 mL. Se agitó durante 24 horas en agitador orbital (Boeco Universal Orbital Shaker PSU-10i ®) bajo cámara extractora de gases (Cabina extractora de gases BIOBASE® FH 1800) a 60-80 rpm. El sobrenadante que contenía n-butanol más los lipopéptidos se separó de la fracción acuosa. Se dejó evaporar el sobrenadante en agitación bajo Sorbona (Cabina extractora de gases BIOBASE® FH 1800). Los extractos fueron re suspendidos en agua tipo Mili- Q en una concentración 1:10. Los extractos se colocaron en tubos falcón de 15 mL previamente pesados. Los tubos se congelaron a -80°C durante la noche. Se liofilizaron las muestras en el equipo liofilizador (BenchTop Pro with omnitronics™) y se determinó el peso final del tubo falcón con los lipopéptidos. Los lipopéptidos recogidos fueron re suspendidos con metanol a con concentración 1:10.

#### 4.3.5.3 Caracterización de lipopéptidos de *B. subtilis* Cptx S2-1 mediante Cromatografía de capa fina (HPTLC) y HPTLC-autobiografía.

El análisis se realizó con extractos metanólicos de lipopéptidos obtenidos en un medio de bajo costo y un medio optimizado de 24, 48 y 72 horas. Las familias presentes de lipopéptidos se analizaron mediante HPTLC, su actividad

antifúngica se determinó mediante HPTLC-autobiografía según los protocolos establecidos por Hamburger & Cordell, 1987; Yáñez-mendizábal et al., 2012.

Para el proceso de cromatografía de capa fina (TLC) en placas de sílica gel (Sigma Aldrich® TLC plates Z193291-1PAK Sigma gel matrix LXW 20X20) se inocularon 100 µL de extracto en la placa de sílica gel (fase estacionaria). Como solvente se utilizó cloroformo: metanol: agua en concentración 64:25:4 v/v/v (fase móvil). Se identificó los lipopéptidos en base al factor de retención (Rf) al observar las placas bajo luz UV.

$$Rf = \frac{Ds}{Dd} \quad \text{(Ecuación 4)}$$

Siendo  $Ds$  la medida de la distancia recorrida del elemento, y  $Dd$  la medida de la distancia recorrida por el solvente (Samaniego, 2016).

Una vez que la fase móvil recorrió la placa de sílica gel por aproximadamente 1 hora y 30 minutos, se dejó secar para luego ser colocadas en cajas Petri con iguales dimensiones a la placa de sílica. Se preparó 150 mL de PDA y se inoculó con *Colletotricum Acutatum* a 25 °C por 7 días y se observó las zonas de inhibición en el crecimiento del hongo. Las placas de sílica gel se realizaron una para cada lectura en el tiempo.

#### 4.3.6 Análisis molecular de lipopéptidos

##### 4.3.6.1 Extracción y cuantificación de ADN

EL ADN genómico de la cepa de *Bacillus subtilis Cptx S2-1* se obtuvo mediante kit PureLink® Genomic DNA Catalog Numbers K1820-01, K1820-02, K1821-04 Invitrogen. Siguiendo el protocolo establecido por el fabricante (Life technologies, 2013).

Del biorreactor se tomaron muestras del cultivo en medio MOLP y HS40MOLP-2 al finalizar las 24 h, 48 h y 72 h en tubos falcón (Boeco de 50 mL). Las muestras se centrifugaron a 5000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5804R@A4-44) durante 20 minutos y se separó la biomasa del sobrenadante, ésta fue resuspendida en 180 µL de Lizozime Digestion Buffer (incluido en el kit de extracción) con una concentración de  $2 \times 10^9$  células de *Bacillus subtilis* Cptx S2-1 de cada aislado. Se homogenizó la muestra usando un vórtex durante 5 segundos. Se incubó las muestras a 37°C en termobloque (Labnet Accublock D-1100), durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se colocó 20 µL de Proteinasa K (suplementada en el Kit) y 200 µL de PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer (incluido en el kit) y se homogenizó en el vórtex. Se incubó por 30 minutos a 55°C en un termobloque. Se añadieron 200 µL de etanol al 96% y se homogenizó en el vórtex durante 5 segundos (Life technologies, 2013; Oliva, 2015).

Para la purificación se colocaron aproximadamente 640 µL de lisado en PureLink® Spin Column (suplementada en el kit). Se centrifugó (Eppendorf Centrifuge 580R®, Rotor ML-154) a 10000 rpm durante un minuto. Se descartó el tubo colector y se colocó la columna en un nuevo tubo colector. Se colocaron 500 µL de Wash Buffer 1 (preparado según las instrucciones del kit), se centrifugó (Eppendorf Centrifuge 580R®, Rotor ML-154) a 10000 rpm por un minuto, se descartó el tubo colector y la columna se colocó en un nuevo tubo colector (suplementado en el kit). Se colocaron 500 µL de Wash Buffer 2 en la columna y se centrifugó (Eppendorf Centrifuge 580R®, Rotor ML-154) a máxima velocidad por 3 minutos (Life technologies, 2013; Oliva, 2015).

Se colocó la columna en un tubo estéril (Eppendorf 1,5 mL) correctamente etiquetado. Se añadieron 200 µL de buffer de elución (suplementado en el kit) se incubó a temperatura ambiente durante un minuto. Se centrifugó (Eppendorf Centrifuge 580R®, Rotor ML-154) a 15000 rpm durante 2 minutos. El ADN recolectado en el tubo de 1.5 mL se cuantificó a 260 nm para ácidos nucleicos

(Nanodrop2000 Spectrophotometer Thermo Scientific) (Life technologies, 2013; Oliva, 2015).

#### 4.3.6.2 Amplificación de secuencias por Reacción de Cadena Polimerasa (PCR)

Para la identificación molecular de lipopéptidos se realizó una PCR de punto final siguiendo el protocolo optimizado por Yáñez-mendizábal et al., 2012 para la amplificación de lipopéptidos de *B. subtilis*. Se diseñó grupos de primers para cada subfamilia de lipopéptidos como se muestra en la tabla 1. Los primers se diluyeron usando agua grado molecular, a una concentración de 50  $\mu\text{M}$ . Se realizaron alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ . Se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

La reacción de cadena polimerasa se realizó en 25  $\mu\text{L}$  de volumen los cuales contenían 1  $\mu\text{L}$  de ADN con concentración 100  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ , 1.25U de Taq Polimerasa (Taq DNA recombinant, Invitrogen. Ref. 11615-010), 10  $\mu\text{M}$  de cada primer (1  $\mu\text{L}$  de cada primer *Forward* y *reverse*), 200  $\mu\text{M}$  de solución de dNTPs (0.5  $\mu\text{L}$  de solución 100  $\mu\text{M}$  Invitrogen. Ref 10297-018), 2.5  $\mu\text{L}$  de buffer 10X y 2mM de  $\text{MgCl}_2$  (0.5  $\mu\text{L}$  de solución 50mM).

Tabla 1. *Primers para los genes que codifican lipopéptidos en B. subtilis*

<b><i>Lipopeptide</i></b>	<b><i>Primer name</i></b>	<b><i>Secuence</i></b>	<b><i>Expected product bps</i></b>
<b><i>Fengycin</i></b>	fenA-F-1	CAAGCGCCGTTATTCAGAGC	~153
	fenA-R-1	CGGCTTAAGCGTCCGATTTG	
	fenB-F-2	AATCGCAATGTCGTGTCCCT	~969

fenB-R- 2	GAGTGCGCTGCGATTGATTT	
fen C-F	CGACCGCCATGATATTTTCAGA	~1828
fen C-R	CATTTCAAAGGTGACGGCGTCAAA GC	
fenD-F- 2	TTTCAGCGGCGGAACATTTG	
fenD-R- 1	GCTGTTTTGAAGCACGAGCA	~343
fenD-R- 2	ACATCGTCGTTCCCGTTTCA	~591
fenE-F-1	ACAAAACGGGTGATTTGGCG	~678
fenE-R- 1	CATACATCCGCTTTTGGGCG	
<hr/>		
ituB-F-1	CAGCGGATAAAGCGTCGTTG	~952
ituB-R-1	TCAGGATCCAGGGGCACATA	
ituC-F-1	AACGAACACCGGATCAAGCA	~942
ituC-R-1	AATTGGCACATAGGCCCTC	
<i>Iturin</i> itu-F-1	GGACAAGGGTCTCAATTTGTAGG AATGG	~1116
itu-R-1	GCATAAATGGATCGAATGTTCGAG	
itu-F-2	GTCACGGAAGTCATCGAAATGG	~338
itu-R-2	CATAAATGGATCGAATGTTCGAG	
<hr/>		
srfB-F-1	GCGCTCTATTTTGAGCCTGC	~234
srfB-R-1	GATGCGTCAAATCCGAAGCC	
sfp-F-1	CAGGAATACGGGAAGCC	~252
<i>Surfactin</i> sfp-R-1	GATAAAGCTTTCTTTCATTGACCA	
sfp-F-2	GCCGCACAAACGGCCAGCTTA	~507
sfp-R-2	GGAGGATGCTCACCGCACC	
srfA-F-1	GCTGGTTTCAGCTGATGCGA	~4358
srfA-R-1	GCGAAGCAGCCTCCTCTTCAG	

	srfA-F-2	ATCAGGTGAAAATCCGCGG	~2026
	srfA-R-2	GCGTTCAGCTCGCCGTACGTCC	
	bamD-F-2	GGGATCAGGGGAGAGGAACT	~726
<b>Bacillomycin</b>	bamD-R-2	GCTGGACAAATTGCGGTTGT	
	bacillo-F	GACACAGCGCAGCCTGCTGG	~2297
	bacillo-R	CGAACATTCCCACGACCGGCTC	

Las condiciones para la PCR se siguieron según el protocolo establecido por Yáñez-mendizábal et al., 2012, el termociclador (Agilent Technologies Sure Cycler 8800) se programó con las siguientes condiciones: 94 °C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 94 °C por un minuto, 60 °C por un minuto 72°C por un minuto. La extensión final se realizó a 72°C por 8 minutos.

Para observar los resultados se preparó un gel de agarosa (Ultra Pure™ Agarose, Invitrogen™) al 1% de concentración, para teñir los amplicones se usó 2µL SYBER Safe (SYBER® Safe DNA gel stain 10000X, Invitrogen. Ref S33102). Para cargar las muestras se usó Blue juice 10X (Blue juice 10X™ Gel Loading Buffer, Cat no. 10816-015) y Marcador molecular de 100bp (TrackIt™ 100bp DNA Ladder. Ref 10488-058). El gel se corrió en una cámara de electroforesis (Labnet Enduro™ Gel XL) a 100V por 30 minutos. Los resultados se observaron en Transiluminador (Bio-Rad Chemidoc™ MP Imaging System). Las muestras se almacenaron a -20°C.

#### 4.4 Evaluación estadística de los resultados

Los resultados se transformaron a  $\text{Log}_{10} \text{UFC.mL}^{-1}$  y fueron analizados con el software estadístico SAS (SAS ® Instituye Inc, Cary, NC, USA) en el cual se

realizó un análisis univariante Student- Newman Keuls (ANNOVA S-N-K) para identificar la diferencia entre medias de los dos tratamientos en biorreactor con sus diferentes repeticiones. Se usó el promedio de UFC/mL de biomasa y endosporas de las muestras al finalizar las 24 h, 48 h y 72 h, además la concentración en mg/mL de lipopéptidos obtenidos de 100 mL de muestra del fermentador en diferentes tiempos.

Statgraphic Centrion se usó para realizar un análisis multivariante que identifique la correlación entre la producción de lipopéptidos respecto a la cantidad de biomasa y endosporas producidas en diferentes fases de crecimiento en dos medios diferentes.

## **5. Resultados y discusión**

### **5.1 Curva de crecimiento en biorreactor**

Como se observa en la figura 4, la curva de crecimiento de *B. subtilis* Ctpx S2-1 en biorreactor en medio MOLP, demostró una dinámica poblacional sigmoidea similar a lo reportado previamente por Yáñez-Mendizábal et al. 2012 para esta especie. La concentración celular fue aumentando gradualmente a partir de 5 a 6 log<sub>10</sub> UFC mL<sup>-1</sup>, luego de la fase de latencia (6 horas) hasta las 16 horas con una concentración máxima celular de alrededor de 8.9 log<sub>10</sub> UFC mL<sup>-1</sup>, se observa que la bacteria tiene un crecimiento sigmoideo comparable con el crecimiento establecido por Baranyi Roberts (1994). Se ha demostrado que existe una codependencia en la producción de lipopéptidos con respecto a la biomasa (Jacques et al., 1999). A pesar de que la fase estacionaria comienza en las 20 horas de cultivo, se toman muestras para evaluar la producción de lipopéptidos a partir de las 24 horas ya que hay un incremento en la producción y mejores resultados partiendo desde esa fase (Ongena et al., 2005; Yáñez-Mendizábal, Viñas, Usall, Vicente, et al., 2012).

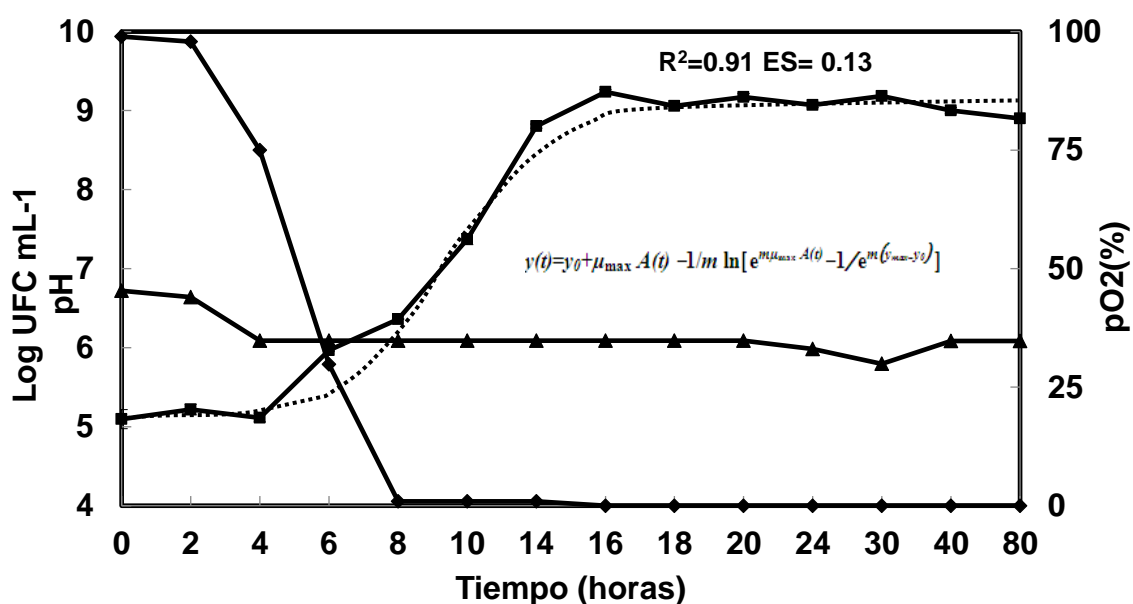


Figura 4. Evolución de la población de *B. subtilis* Ctpx S2-1 ( $\log \text{UFC mL}^{-1}$ ) (■), pH (▲) y oxígeno disuelto  $\text{pO}_2$  (◆) durante 80 horas en medio optimizado para producción de lipopéptidos MOLP y suplemento en sales en biorreactor de 5 L a  $30^\circ \text{C}$ , 200 rpm y  $100 \text{ L}^{-1}$  de alimentación de aire. Cada punto representa el promedio de la concentración en  $\log \text{UFC mL}^{-1}$  de tres repeticiones y las barras verticales indican desviación estándar. Relación de los datos de concentración celular (—) y la función de ajuste de la curva de crecimiento (...) utilizando la ecuación Baranyi y Roberts (1994). Se indican el coeficiente de correlación y error estándar.

El crecimiento de *Bacillus subtilis* en el biorreactor se realizó en medio HS40-MOLP2 como se observa en la figura 5, la concentración celular va aumentando gradualmente de 5 a  $6 \log_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$  durante las primeras 6 horas de crecimiento. El inicio de la fase estacionaria comienza las 14 horas con una concentración celular de  $9 \log_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$ , se observa que la bacteria tiene un crecimiento sigmoideo comparable con el crecimiento establecido por Baranyi Roberts (1994). Se observa que la fase estacionaria comienza a las 16 de cultivo, se toman muestras para evaluar la producción de lipopéptidos a partir de las 24



horas (Ongena et al., 2005; Yáñez-Mendizábal, Viñas, Usall, Vicente, et al., 2012).

La producción en medios de bajo costo permite una reducción en el tiempo de cultivo y mejores resultados en la producción de biomasa y endosporas. La temperatura y el pH tienen efectos significativos sobre la producción de *B. subtilis* durante la fermentación líquida. Además, se ha demostrado que la producción máxima de crecimiento celular, endosporas y lipopéptidos por fermentación líquida se produce entre 25 y 37 °C y un pH óptimo de 7. La aireación y la velocidad de agitación han demostrado ser factores importantes para *B. subtilis* y su producción de lipopéptidos en biorreactores basados en esta bacteria (Jacques et al., 1999; Yáñez-Mendizábal et al., 2012, p. 287).

Se puede observar que existe una diferencia en el crecimiento celular en el medio de bajo costo HS40-MOLP2 con respecto al medio comercial MOLP, la fase logarítmica o exponencial para los dos medios comienza a las 6 horas, pero en el medio de bajo costo existe un incremento logarítmico de unidades formadoras de colonias por mililitro a las 10 horas de cultivo. Como se observa en la figura 5, a las 10 horas se observa  $8 \times 10^5$  Log UFC mL<sup>-1</sup>. Mientras que en el medio comercial se observa en la figura 4 que las unidades formadoras de colonias se encuentran entre los 7 y 7,5 log UFC mL<sup>-1</sup> que en el medio comercial. El medio comercial se apega a la predicción de la curva predicha por Baranyi Roberts (1994).

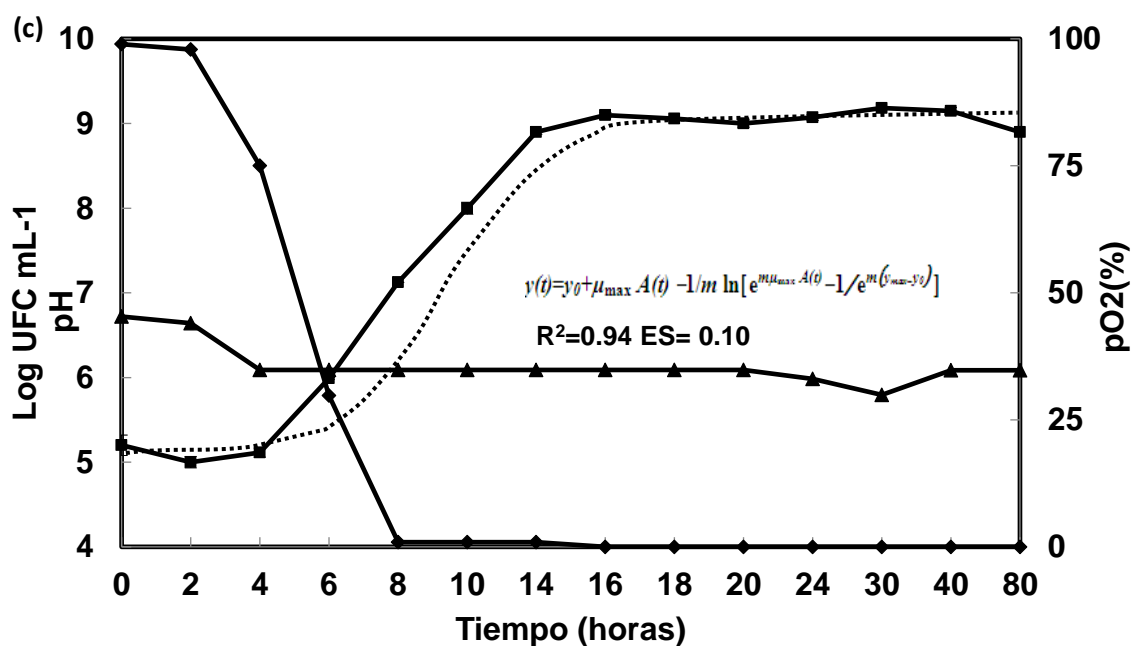


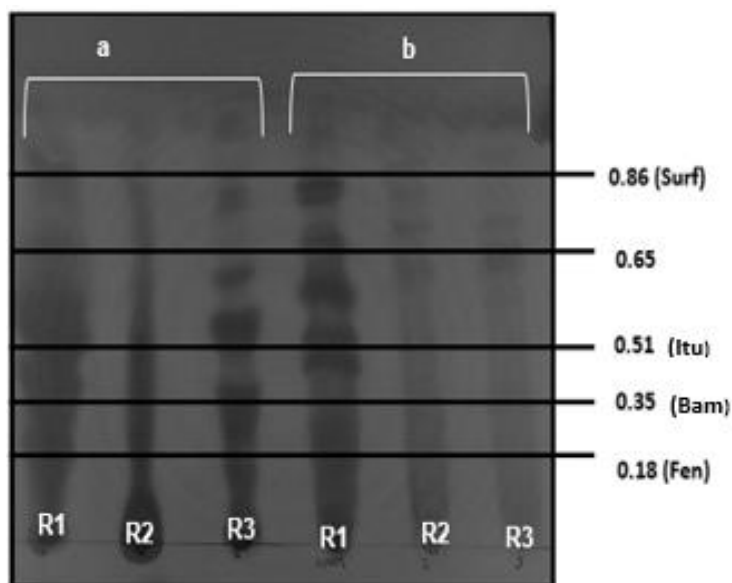
Figura 5. Evolución de la población de *B. subtilis* (log UFC mL<sup>-1</sup>) (■), pH (▲) y oxígeno disuelto pO<sub>2</sub> (◆) durante 80 horas en medio optimizado de HS2MOL2: harina de soya desengrasada 40gL<sup>-1</sup>, melaza 2gL<sup>-1</sup> y suplemento en sales en biorreactor de 5 L a 30° C, 200 rpm y 100 L<sup>-1</sup> de alimentación de aire. Cada punto representa el promedio de la concentración en log UFC mL<sup>-1</sup> de cuatro repeticiones y las barras verticales indican desviación estándar. Relación de los datos de concentración celular (—) y la función de ajuste de la curva de crecimiento (...) utilizando la ecuación Baranyi y Roberts (1994). Se indican el coeficiente de correlación y error estándar.

## 5.2 Caracterización de lipopéptidos de *B. subtilis* Cptx S2-1 mediante Cromatografía de capa fina (HPTLC) y análisis de actividad biológica por autobiografía.

La presencia de lipopéptidos extraídos de *B. subtilis* a las 24 h, 48 h, y 72 h del medio MOLP y HS40- MOLP2 se determinó mediante un análisis cromatográfico (HPTLC). Este análisis evidenció la presencia de Fengicinas, Iturinas, Surfactinas. La medición de la distancia recorrida por los lipopéptidos sobre la placa sirvió para determinar el factor de retención y con esto una aproximación

al grupo al que corresponden. La capacidad de retención en la palca de sílica gel depende de la cantidad de carbonos que conforman al lipopéptido (Hamburger & Cordell, 1987; Jacques, 2011).

Se observa en la figura 6 la presencia de diferentes familias de lipopéptidos a las 24 horas, con un factor de retención ( $R_f$ ) de 0,18 se encuentra la familia de Fengicinas, estas tienen un mayor peso debido a que las cadenas de carbonos son mucho más largas que las otras familias, estas pueden ir de entre 14 a 18 carbonos. Las Iturinas le siguen en peso a las Fengicinas con una longitud de 14 a 17 carbonos el factor de retención está en 0.35 para Bacillomicinas, Iturinas, presentan un factor de retención de 0.51 esto se debe a que su peso es menor que las Bacillomicinas. Las Sufactinas son lipopéptidos de bajo peso molecular, sus cadenas pueden ir de entre 13 a 15 carbonos, el factor de retención se encuentra en 0.86. Se puede observar que la concentración de lipopéptidos es mayor en medio MOLP. En la primera repetición de medio HS40 MOLP2 hay una alta concentración. Que permite identificar de mayor manera la separación de lipopéptidos en la cromatografía.



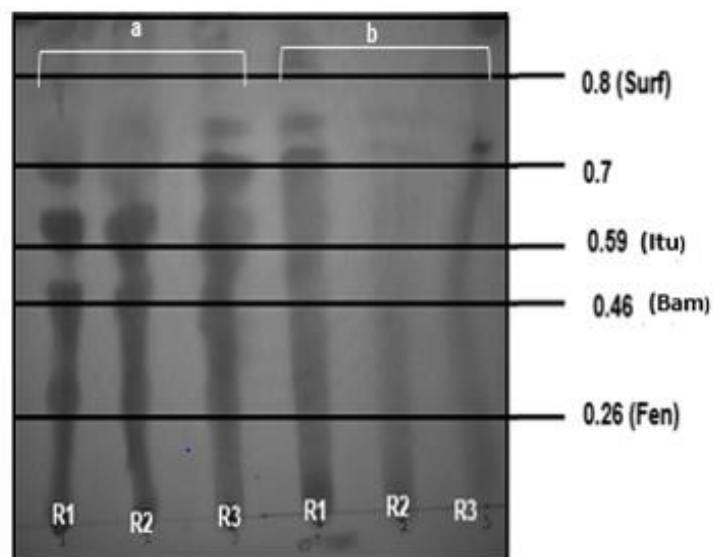
*Figura 6.* Análisis cromatográfico HPTLC (cromatografía en capa fina de alta definición) de extractos de lipopéptidos provenientes de cultivos 24 horas de *B. subtilis* CtpxS2-1. Se muestran las fracciones separadas de lipopéptidos con los correspondientes valores de retención (factor de retención) para Fengicinas (0.18), Iturinas (0.51), Bacillomicinas (0.35) y Surfactinas (0.86). El experimento se realizó en un biorreactor con tres repeticiones diferentes (R1-R3) Bacillomicinas (Bam) y Surfactinas (Surf). El experimento se realizó en biorreactor y con tres repeticiones diferentes (R1-R3).

- a) Medio MOLP
- b) Medio HS40-MOLP2

Los miembros de la familia Fengicina incluida la Plipastatina son decapeptidos con un ácido graso  $\beta$ -hidroxi que muestran propiedades inusuales como la presencia de Ornitina en la porción de péptido. También muestran actividad antifúngica, aunque más específica para hongos filamentosos (Steller et al., 1999; Vanittanakom y otros, 1986).

A las 48 horas se observa menor concentración de lipopéptidos (Figura 7), esto se puede comparar con el análisis de producción. En las repeticiones 2 y 3 del

medio HS40-MOLP2 no se ve un patrón claro de separación de lipopéptidos. Se observa que las Fengicinas tienen un Rf de 0.26, Rf para Bacillomicinas es de 0.56, Rf de Iturinas 0.59, y Surfactinas de Rf de 0.8

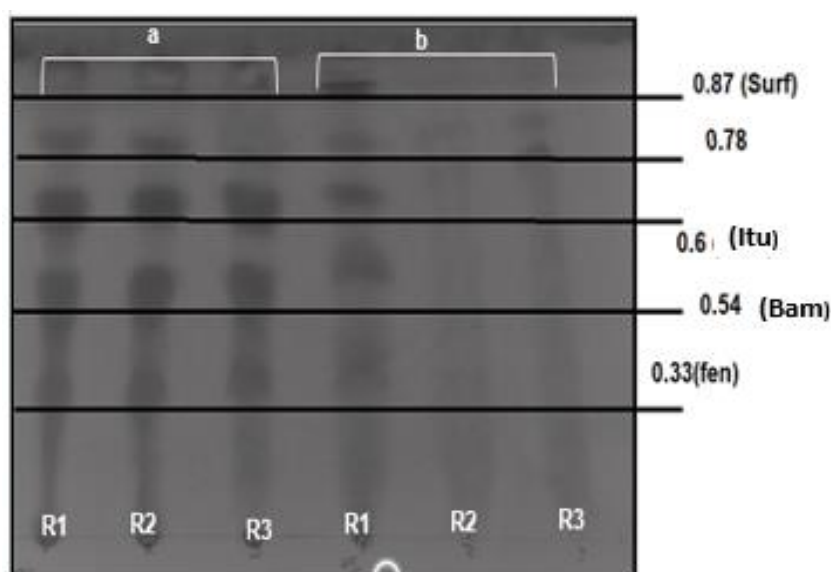


*Figura 7.* Análisis cromatográfico HPTLC (cromatografía en capa fina de alta definición) de extractos de lipopéptidos provenientes de cultivos 48 horas de *B. subtilis* CtpXS2-1. Se muestran las fracciones separadas de lipopéptidos con los correspondientes valores de retención (factor de retención) para Fengicinas (0.26), Iturinas (0.59), Bacillomicinas (0.46) y Surfactinas (0.8). El experimento se realizó en biorreactor con tres repeticiones diferentes (R1-R3).

- a) Medio MOLP
- b) Medio HS40-MOLP2

A las 72 horas, se puede evidenciar con claridad la separación de lipopéptidos (Figura 8), por factor de retención Fengicinas se observa que el Rf equivale a 0.33, Bacillomicinas con 0.54 de factor de retención, Iturinas con Rf de 0.6, y Surfactinas 0.87. Para las repeticiones 2 y 3 en medio de harina de soya HS40-MOLP2.

D. Romero et al. (2004).observaron diferentes resultados en tratamientos realizados con células bacterianas procedentes de fase logarítmica o fase estacionaria de crecimiento, los mejores fueron aquellos que emplearon células de cultivos de fase estacionaria, que pueden atribuirse a la propiedad de especies de *Bacillus* de producir sustancias antibióticas en fase log tardía y principalmente en la fase estacionaria del crecimiento.



*Figura 8.* Análisis cromatográfico HPTLC (cromatografía en capa fina de alta definición) de extractos de lipopéptidos provenientes de cultivos 72 horas de *B. subtilis* CtpxS2-1. Se muestran las fracciones separadas de lipopéptidos con los correspondientes valores de retención (factor de retención) para Fengicinas (0.33), Iturinas (0.6), Bacillomicinas (0.54) y Surfactinas (0.87). El experimento se realizó en biorreactor con tres repeticiones diferentes (R1-R3).

- a) Medio MOLP
- b) Medio HS40-MOLP2

Se puede observar en las figuras 6, 7 y 8 que el factor de retención tanto para Surfactinas, Iturinas y Fengicinas va incrementando respecto al tiempo. Esto puede deberse a que estos compuestos al ser metabolitos secundarios que se excretan al medio se van acumulando progresivamente (Ongena & Jacques,

2008; Yáñez-Mendizábal et al., 2012). Además, es importante recalcar que existe una diferencia significativa entre los lipopéptidos obtenidos de medio MOLP respecto a los obtenidos de medio de harina de soya. En el medio de bajo costo se observa que las bandas tienen una mejor definición comparadas con las bandas de medio MOLP, por otro lado, la cantidad de lipopéptidos es mayor en el medio comercial. En la repetición R2 y R3 del medio de bajo costo, las bandas de la cromatografía es menos intenso en los tres tiempos analizados, se puede deber a que el medio de harina dificulta la purificación del medio (Jin et al., 2015; Pereira et al., 2013)

La actividad antifúngica se determinó por autobiografía en la cual se evidenció inhibición de crecimiento de *Colletotrichum acutatum* principalmente por parte de la familia de Fengicinas. Para identificar la actividad biológica contra *Colletotrichum acutatum* se realizó una HPTLC- autobiografía que identifica la acción biológica de los lipopéptidos al inhibir el crecimiento micelial del hongo. Se puede observar que las Fengicinas tienen una mayor actividad antifúngica.

La autobiografía reveló que la actividad antifúngica contra *C. acutatum* se evidencia desde las 24 horas, la inhibición se presenta a la altura en la cual se encuentran presentes las Fengicinas en la cromatografía. En la figura 9 se observa la comparación entre la autobiografía entre el medio de bajo costo HS40-MOLP2 y medio comercial MOLP. Se observa que en medio MOLP hay un halo de inhibición con mayor tamaño en comparación al medio de bajo costo. Se puede observar en la cromatografía del medio MOLP que las bandas de fengicina no se encuentran bien definidas por lo que no se distinguen con claridad la separación de fengicinas con iturinas, esto genera que el halo de inhibición sea más grande. Es posible que la harina de soya de medio de bajo costo produzca cierta interferencia en la obtención de lipopéptidos, a pesar de las bajas concentraciones obtenidas se puede notar el alto potencial biológico contra *C. acutatum*. Por otro lado, en la cromatografía del medio de bajo costo la

banda de fengicina es más clara y da como resultado una inhibición exactamente en el punto en el que se encuentran estos lipopéptidos.

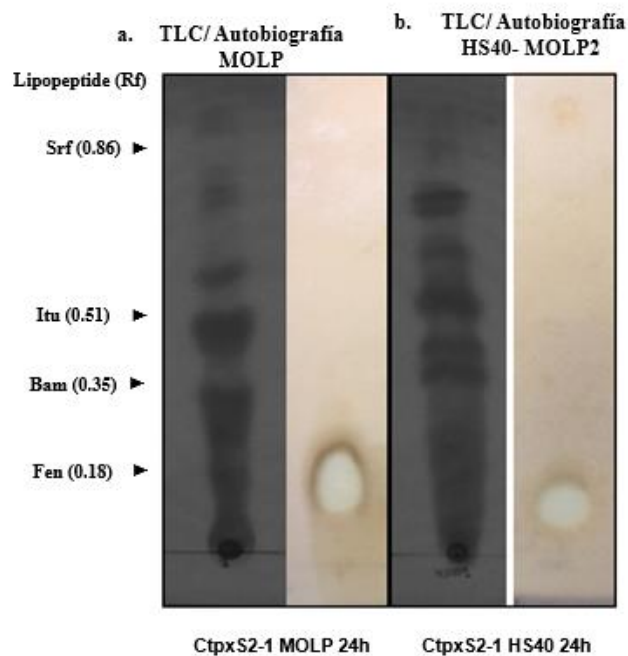
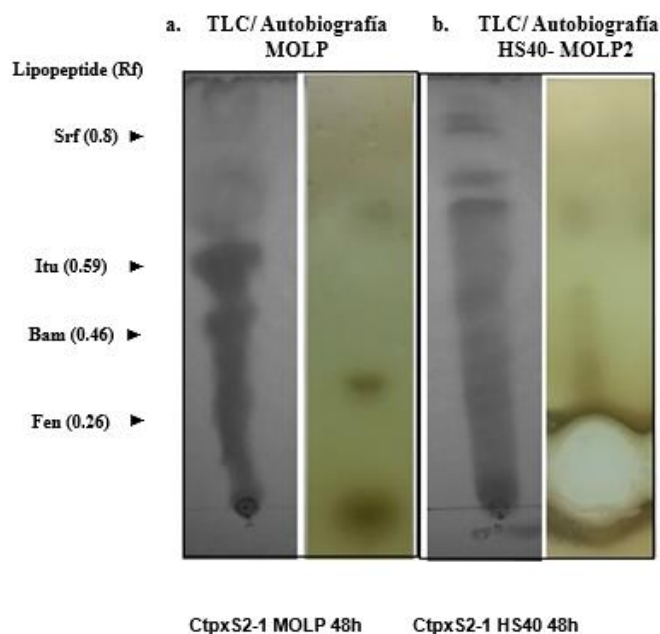


Figura 9. Análisis de inhibición de crecimiento con extractos de lipopéptidos de 24 horas por HPTLC- autobiografía.

- a) Medio MOLP
- b) Medio HS40-MOLP2

A las 48 horas se observa una leve actividad biológica (Figura 10) contra el hongo por parte de los extractos de lipopéptidos de *B. subtilis* en medio MOLP a comparación del medio de bajo costo que tiene una mayor actividad antifúngica. El halo de inhibición es mayor al que se presenta en el medio comercial.





*Figura 10.* Análisis de inhibición de con crecimiento extractos de lipopéptidos de 48 horas por HPTLC- autobiografía.

- a) Medio MOLP
- b) Medio HS40-MOLP2

A las 72 horas (Figura 11) se puede observar que existe inhibición del crecimiento en ambos medios, en medio de harina de soya HS40- MOLP 2 la inhibición es mayor que en el medio comercial. La concentración de lipopéptido extraídos del medio de bajo costo puede influir en la inhibición. Se puede observar que el halo formado tiene un mayor tamaño en comparación con el halo que se presenta en el medio comercial.

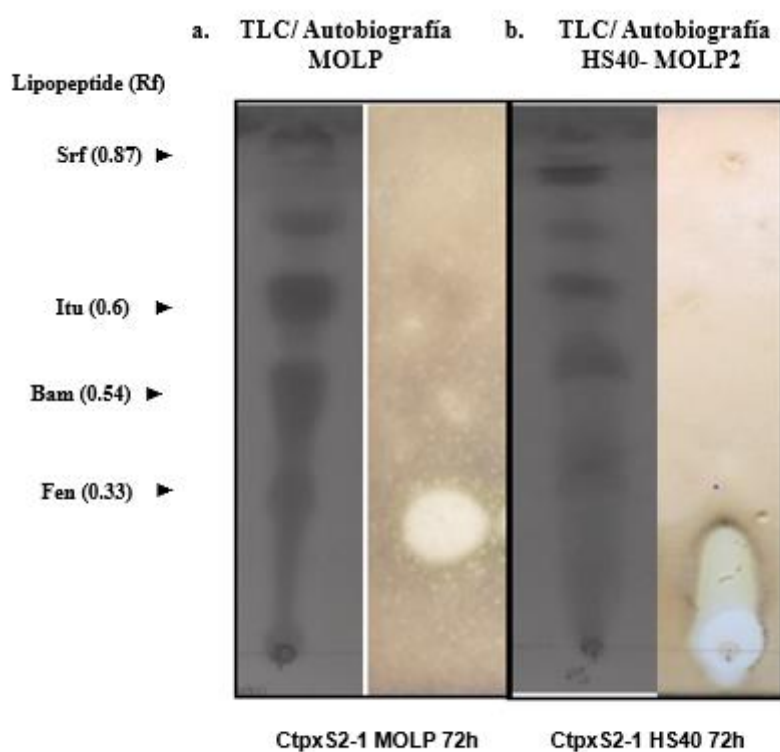


Figura 11. Análisis de inhibición de crecimiento con extractos de lipopéptidos de 72 horas por HPTLC- autobiografía.

- a) Medio MOLP
- b) Medio HS40-MOLP2

A las 24 horas (figura 9) y 72 horas (figura 11) se observa inhibición del crecimiento de *C. acutatum* en ambos medios. A las 48 horas (figura 10) solo se observó un halo de inhibición en el medio de bajo costo. La autobiografía, como método para localizar la actividad antibacteriana en un cromatograma, ha encontrado una amplia aplicación en la búsqueda de nuevos antibióticos. Las zonas de inhibición se visualizan mediante halos alrededor de los compuestos antimicrobianos (Hamburger & Cordell, 1987).

Se han realizado diversos tipos de estudio que identifican la capacidad antagónica de lipopéptidos producidos por *Bacillus spp.* Contra diversos tipos de

hongos. Se ha probado su efecto contra el hongo causante de esclerotinia en plantas de soya. Estos lipopéptidos han demostrado inhibición de crecimiento contra *Sclerotinia sclerotiorum*, y su aplicación en la zona foliar de la planta es una estrategia de control de la enfermedad (Alvarez et al., 2012). Por otro lado se han estudiado enfermedades causadas por hongos como *Ovularia* y *Fusarium* que causan enfermedades a nivel de semilla de *L. mutabilis* (Grijalva, 2015; Yáñez–Mendizábal et al., 2015). El uso de estos compuestos antifúngicos ha demostrado inhibir el crecimiento micelial de estos y otros tipos de hongos en cultivos de interés comercial como el maíz, soya, algodón y chocho. Los estudios realizados por Cawoy et al. (2015) compararon la capacidad para inhibir un conjunto de hongos infecciosos de importancia agronómica, incluidos dos patógenos foliares, *Cladosporium cucumerinum* y *Botrytis cinerea*, y dos patógenos transmitidos por el suelo, *Fusarium oxysporum* y *Pythium aphanidermatum*. El control biológico con lipopéptidos de origen bacteriano ha surgido como un tratamiento alternativo prometedor. En las últimas décadas, se han identificado algunos microorganismos antagónicos como agentes de control biológico para enfermedades postcosecha causadas por hongos que incluyen *B. licheniformis*, *T. harzianum* y *T. atroviride* *Monilinia spp.* (Chen et al., 2016; Li et al., 2013; Yáñez-Mendizábal, Viñas, Usall, Vicente, et al., 2012)

Se ha informado que el control biológico mediante el uso de bacterias antagónicas es una alternativa atractiva debido a su capacidad de antagonizar el agente patógeno por diferentes modos de acción y colonizar de manera efectiva hábitats de plantas distintos. Varios informes han demostrado que el éxito del control por bacterias antagónicas se define principalmente por su capacidad para afectar al patógeno en la fase de germinación o inicio de la enfermedad. La producción de sustancias antifúngicas en cantidades suficientes para afectar la germinación de los conidios y el crecimiento de los tubos germinales podría ser uno de los modos de acción más probables de la bacteria (D. Romero et al., 2004).

Además del desarrollo del antagonismo directo hacia los patógenos fúngicos, algunas bacterias beneficiosas pueden ejercer su efecto protector indirectamente a través de la estimulación de mecanismos de defensa de plantas inducibles que hacen que el huésped sea más resistente a la entrada de otros patógenos. La inducción de una mayor capacidad defensiva puede ser sistémica, ya que se demostró que el tratamiento de raíz con tales bacterias desencadena efectos protectores en las partes de la planta sobre el suelo (Ongena et al., 2005). Esta fungitoxicidad se basa en la perturbación osmótica debido a la formación de poros conductores de iones y no a la disrupción o solubilización de la membrana causada por la Surfactina (Alvarez et al., 2012).

Más recientemente, se descubrió que la Surfactina, era una mezcla de dos variantes que difieren en el residuo aminoacídico terminal. Este tipo de lipopéptidos no exhibe una actividad antifúngica pero, potencia la acción de Iturina A si están presentes en una mezcla (Razafindralambo et al., 1993).

La presencia de colesterol en la bicapa de fosfolípidos atenúa el efecto desestabilizador de la Surfactina, sugiriendo que la susceptibilidad de las membranas biológicas a la Surfactina puede variar de manera específica dependiendo del contenido de esteroides del organismo objetivo. Esto podría explicar por qué la Surfactina muestra actividades hemolíticas, antivirales, antimicoplasmáticas y antibacterianas, pero no presenta una actividad fungitóxica marcada (Alvarez et al., 2012; Jacques, 2011).

### 5.3 Análisis molecular

#### **Amplificación PCR**

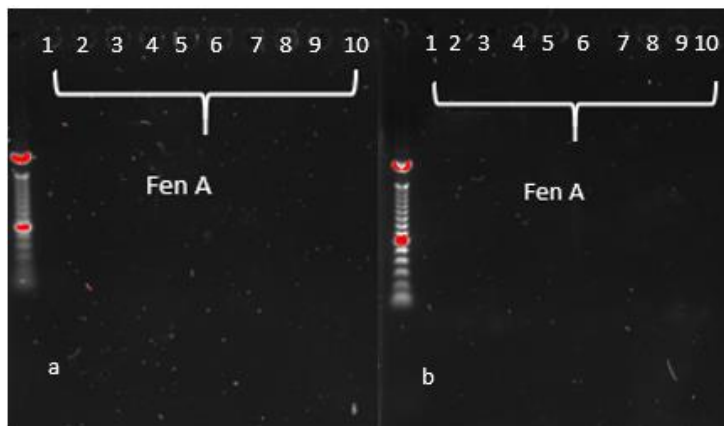
Se pudo observar que la cepa de *Bacillus subtilis* Cptx S2-1 amplifica a diferentes subfamilias de lipopéptidos. Además, se puede observar la presencia de todas las familias principales de lipopéptidos representadas por una o varias subclases

de productos de la PCR. Estos compuestos antifúngicos comparten una estructura cíclica común que consiste en un ácido graso  $\beta$ -amino o  $\beta$ -hidroxi integrado en un resto peptídico. Las principales diferencias se basan en la secuencia de aminoácidos y la ramificación de ácidos grasos, criterios que permiten su clasificación en tres familias (Gond, Bergen, Torres, & White, 2015; Jacques, 2011; Ongena & Jacques, 2008).

### **Fengicinas**

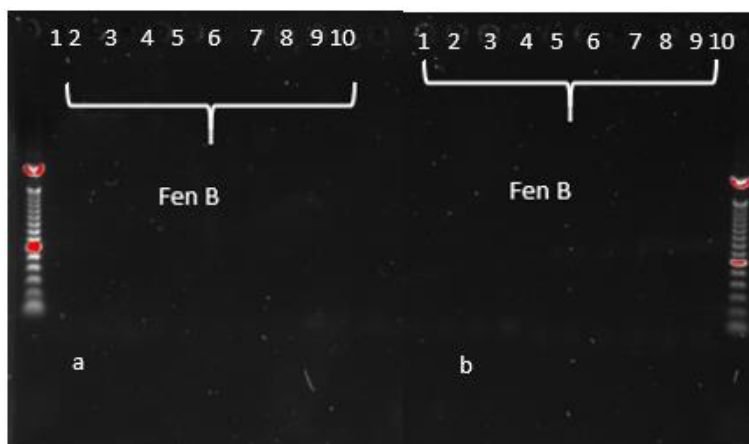
El análisis molecular de lipopéptidos de *B. subtilis* se realizó con el protocolo establecido por Viviana Yáñez-Mendizábal et al., 2012. Se observa que las Fengicinas están presentes en las cepas de *B. subtilis* Cptx S2-1, para Fengicinas A (Figura 12), Fengicina B (Figura 13) y Fengicina D 1 y 2 (Figura 15), no se observan productos PCR. Por lo que se puede aducir que no existe la presencia de genes que codifican a estos lipopéptidos en esta cepa de *B. subtilis*.

Para la cepa en estudio se observó que existe presencia de Fengicina C (figura 14), el amplicón tiene una longitud de 1828 pares de bases aproximadamente. En el ADN extraído de la biomasa proveniente de medio HS40-MOLP2 se observa que hubo mayor concentración de amplicón en el gel de electroforesis. La presencia de Fengicinas se mantiene en la fase logarítmica y estacionaria de crecimiento de la bacteria. En la figura 16 se puede observar la presencia de Fengicina E. el amplicón es de aproximadamente 678 pares de bases.



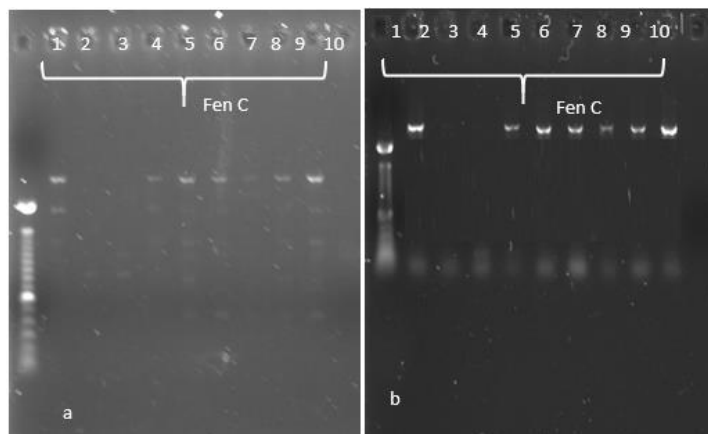
*Figura 12.* Productos PCR para Fengicina A. Primer carril: marcador de peso molecular 100pb, Carril 1, 4,7 Muestras ADN 24h; 2, 5,8 Muestras ADN 48h; 3, 6,9 Muestras ADN 72h. Carril 10 control negativo.

- a) Medio MOLP
- b) Medio HS40-MOLP2



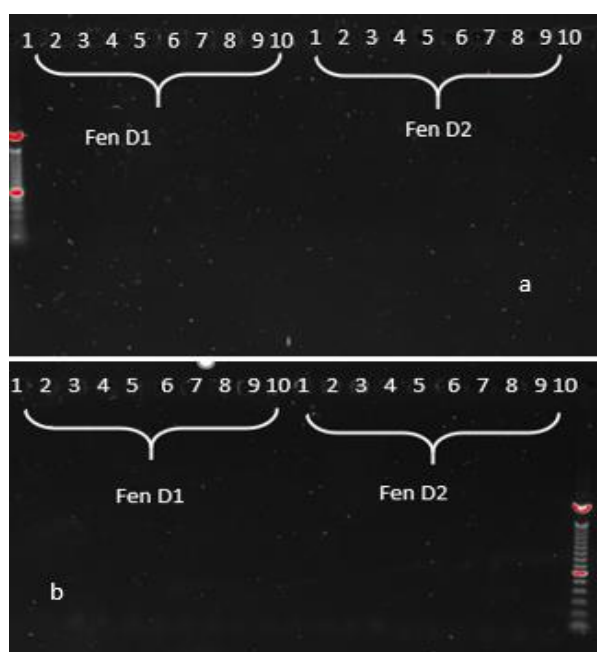
*Figura 13.* Productos PCR para Fengicina B. Primer y último carril: marcador de peso molecular 100pb, Carril 1, 4,7 Muestras ADN 24h; 2, 5,8 Muestras ADN 48h; 3, 6,9 Muestras ADN 72h. Carril 10 control negativo. No se observa amplicón para Fengicina B

- a) Medio MOLP
- b) Medio HS40-MOLP2



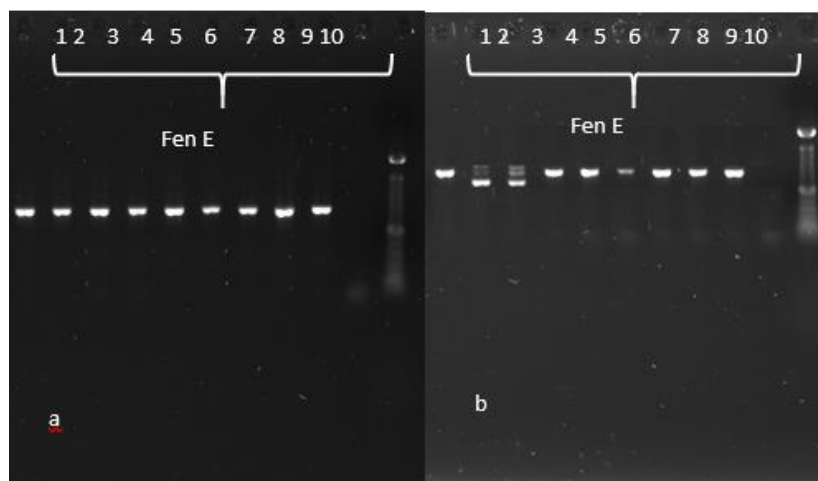
*Figura 14.* Productos PCR para Fungicida C. Primer carril: marcador de peso molecular 100pb, Carril 1, 4,7 Muestras ADN 24h; 2, 5,8 Muestras ADN 48h; 3, 6,9 Muestras ADN 72h. Carril 10 control negativo.

- a) Medio MOLP
- b) Medio HS40-MOLP2



*Figura 15.* Productos PCR para Fungicida D1 y D2. Primer carril: marcador de peso molecular 100pb, Carril 1, 4,7 Muestras ADN 24h; 2, 5,8 Muestras ADN 48h; 3, 6,9 Muestras ADN 72h. Carril 10 control negativo. No se observa amplicón para Fungicidas D.

- a) Medio MOLP
- b) Medio HS40-MOLP2



*Figura 16.* Productos PCR para Fengicina E. Primer carril: marcador de peso molecular 100pb, Carril 1, 4,7 Muestras ADN 24h; 2, 5,8 Muestras ADN 48h; 3, 6,9 Muestras ADN 72h. Carril 10 marcador negativo. Se observa amplicón para Fengicina E.

- a) Medio MOLP
- b) Medio HS40-MOLP2

Para la figura 14 se observó que existe la presencia de Fengicina C y en la figura 16 la presencia de Fengicina E. Las Fengicinas son lipopéptidos antifúngicos de *Bacillus spp.* sintetizado por el péptido sintetasa no ribosomal. Los péptidos sintetasa no ribosomales responsables de su biosíntesis están codificadas por cinco genes, que incluyen fenC (ppsC) y fenE (ppsE). Estas sintetatas se transforman de apo-proteínas a holo-proteínas mediante la adición del cofactor 40-fosfopantetínico. Esta reacción está catalizada por una fosfopanteteinil transferasa codificada por el gen sfp. La expresión de operones lipopéptidos implica una compleja maquinaria reguladora vinculada a la detección de quórum, también descrita a nivel molecular para surfactina o Micosubtilina (Yáñez-Mendizábal, Viñas, Usall, Vicente, et al., 2012; Yaseen, Gancel, Drider, Béchet, & Jacques, 2016).

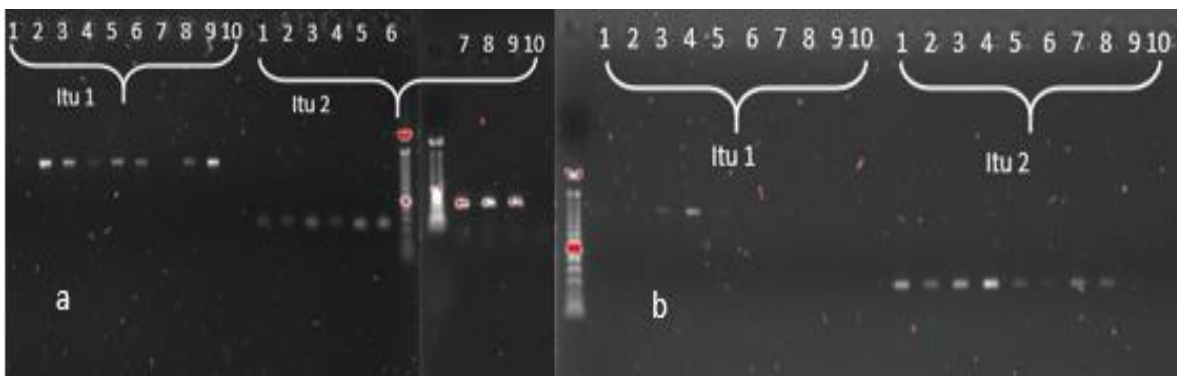
### **Iturinas**



Se observó la presencia de Iturina A (figura 17), representada en dos tipos de amplicones como iturina 1 e iturina 2. El tamaño del amplicón para Iturina A 1 fue de 1116 pares de bases aproximadamente, el amplicón se observa en ambos medios. Para medio HS40 MOLP2 Iturina 1 se amplificó en menor cantidad. Por otro lado la Iturina 2 tiene un amplicón de 338 pares de bases para. Además, se amplificó el gen para Iturina B (Figura 18) con un tamaño de 952 pares de bases aproximadamente. Por lo que se deduce que *B. subtilis* posee genes que codifican para Iturina A e Iturina B. Por otro lado *B. subtilis*. No posee los genes que codifican para Iturina C (Figura 19) y no se presenta amplicón.

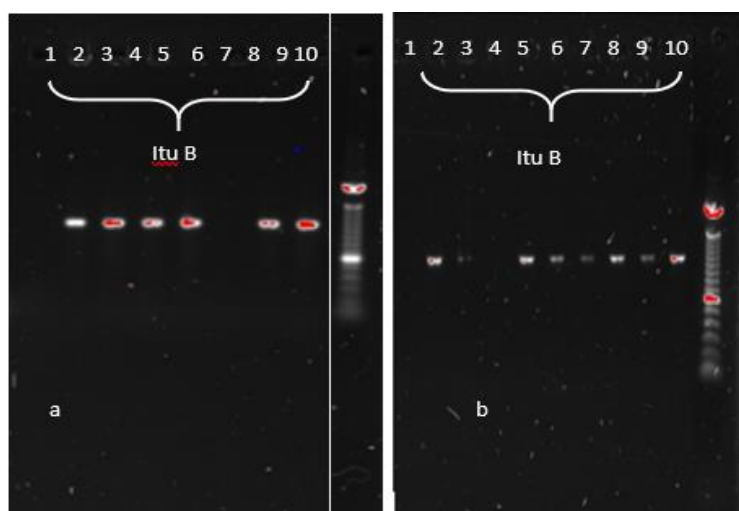
La familia Iturina, representada por Iturina A, Micosubtilina y Bacillomicina, son heptapéptidos con un ácido graso  $\beta$ -amino que exhibe una fuerte actividad antifúngica (Diego Romero, Vicente, Rakotoaly, Dufour, Veening, et al., 2007).

La familia Iturina comprende Iturina A, C, D, E, Bacillomicina D, F, L, Bacilopeptina y Micosubtilina. Son heptapéptidos unidos a una cadena de ácido graso  $\beta$ -amino con una longitud de 14-17 carbonos. El operón consta de cuatro ORF llamados Itu DABC para Iturina A en *B. subtilis*. El grupo de genes Iturina A se inserta exactamente en la misma posición que el operón de Bacillomicina (*bmy*). Las Iturinas muestran una fuerte acción antifúngica *in vitro* pero limitadas actividades antibacterianas y no virales (Alvarez et al., 2012; Jin et al., 2015).



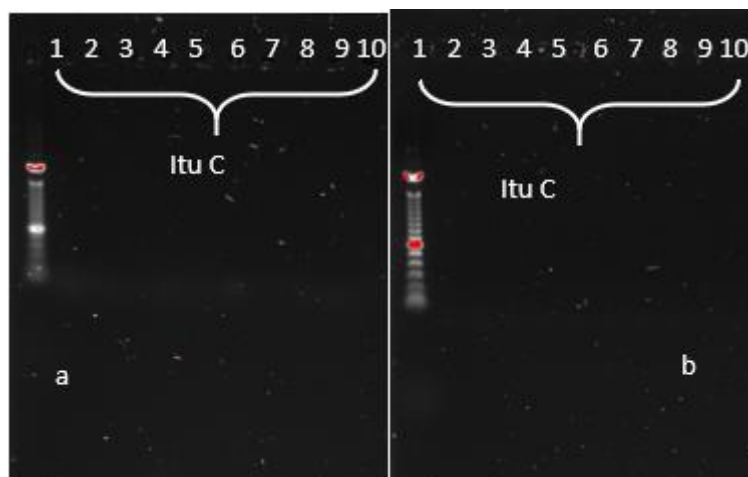
*Figura 17.* Productos PCR para Iturina 1; Iturina 2. Ultimo carril: marcador de peso molecular 100pb, Carril 1, 4,7 Muestras ADN 24h; 2, 5,8 Muestras ADN 48h; 3, 6,9 Muestras ADN 72h. Carril 10 control negativo.

- a) Medio MOLP
- b) Medio HS40-MOLP2



*Figura 18.* Productos PCR para Iturina B. Ultimo carril: marcador de peso molecular 100pb, Carril 1, 4,7 Muestras ADN 24h; 2, 5,8 Muestras ADN 48h; 3, 6,9 Muestras ADN 72h. Carril 10 Control negativo. Se observa amplicón para Iturina B.

- a) Medio MOLP
- b) Medio HS40-MOLP2



*Figura 19.* Productos PCR para Iturina C. Último carril: marcador de peso molecular 100pb, Carril 1, 4,7 Muestras ADN 24h; 2, 5,8 Muestras ADN 48h; 3, 6,9 Muestras ADN 72h. Carril 10 marcador negativo. No se observa amplicón para Iturina C.

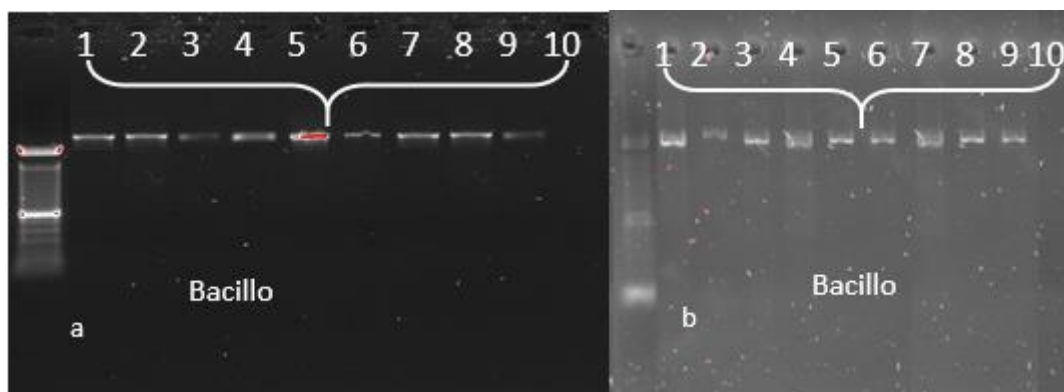
- a) Medio MOLP
- b) Medio HS40-MOLP2

### Bacillomicinas

Las Bacillomicinas son pertenecientes a la familia de Iturinas, se observó que para Bacillomicina D (Figura 21) el amplicón tiene 726 pares de bases aproximadamente y Bacillomicina (Figura 20) tiene un tamaño de amplicón de 2997 pares de bases aproximadamente.

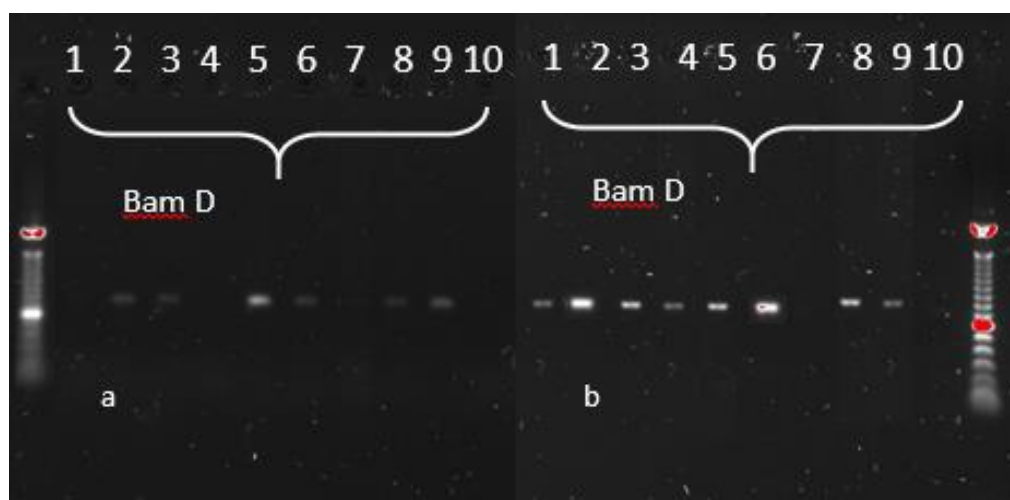
Ensayos adicionales llevados a cabo con fracciones de lipopéptidos purificados muestran que la Iturina A, Bacillomicina y Fengicina presentan las actividades antifúngicas más elevadas, mientras que la Surfactina mostró una acción limitada. En este sentido, la acción directa de los antimicrobianos en el antagonismo bacteriano *in vitro* ha sido bien caracterizada, además, la evidencia de la producción *in situ* de estos lipopéptidos en sus entornos correspondientes para correlacionarlos con la capacidad de control biológico ha sido una limitación. Se ha comprobado que existe un sinergismo entre la producción de Iturina A,

Bacillomicina y Fengicina en el antagonismo de *B. subtilis* hacia diversos tipos de hongos patógenos (Diego Romero, Vicente, Rakotoaly, Dufour, Veening, et al., 2007).



*Figura 20.* Productos PCR para Bacillomicina. Último carril: marcador de peso molecular 100pb, Carril 1, 4,7 Muestras ADN 24h; 2, 5,8 Muestras ADN 48h; 3, 6,9 Muestras ADN 72h. Carril 10 control negativo.

- a) Medio MOLP
- b) Medio HS40-MOLP2



*Figura 21.* Productos PCR para Bacillomicina. Último carril: marcador de peso molecular 100pb, Carril 1, 4,7 Muestras ADN 24h; 2, 5,8 Muestras ADN 48h; 3, 6,9 Muestras ADN 72h. Carril 10 control negativo.

- a) Medio MOLP
- b) Medio HS40-MOLP2

## Surfactinas

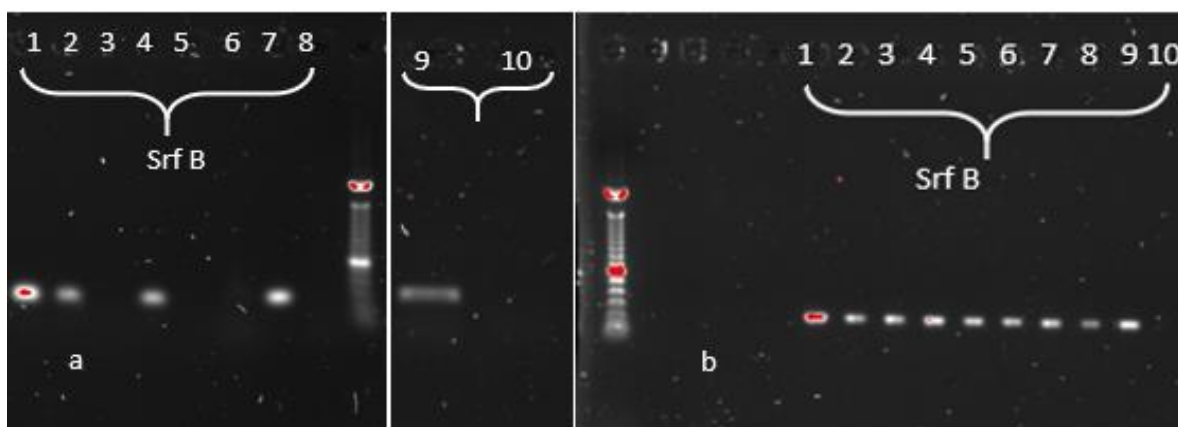
Dentro de la familia de Surfactinas se observa la presencia de Surfactina B con un aproximado 234 pares de bases, ésta tuvo mayor concentración en medio HS40 MOLP 2 (figura 22). En la Surfactina A1 se observa únicamente la expresión del gen en medio HS40 MOLP2 a partir de las 48 horas. El amplicón tiene un peso mayor a 4358 pares de bases (Figura 23). Para la Surfactina A2 se observa que el tamaño de amplicón es mayor con un aproximado de 2026 pares de bases además se presentarse únicamente en medio MOLP (Figura 24). Finalmente, la Surfactina P2 tiene un tamaño de amplicón de 507 pares de bases, hay mayor concentración del gen en medio MOLP (Figura 26). Para la Surfactina p1 (Figura 25) no se presenta amplicón. Por lo que no se ha expresado el gen.

Principalmente la familia de lipopéptidos más estudiada, la familia de la Surfactina consiste en heptapéptidos que contienen un ácido graso  $\beta$ -hidroxi con un número de átomos de carbono en el rango de 13 a 15 que, posiblemente sean los bio-tensoactivos más potentes descritos y que además exhiben características antivirales. Estos, aunque son ligeramente antifúngicos, muestran una fuerte acción sinérgica en combinación con Iturina A.

El operón de Surfactina contiene cuatro marcos de lectura abiertos (ORF) que codifican tres proteínas multifuncionales SrfA-C y una enzima tioesterasa/aciltransferasa externa, SrfD (Chen et al., 2009). La Surfactina se comporta como un biotensioactivo muy potente y posee otras actividades biológicas interesantes, principalmente al alterar la integridad de la membrana como consecuencia del establecimiento de interacciones fuertes con los constituyentes de la membrana de fosfolípido (Alvarez et al., 2012).

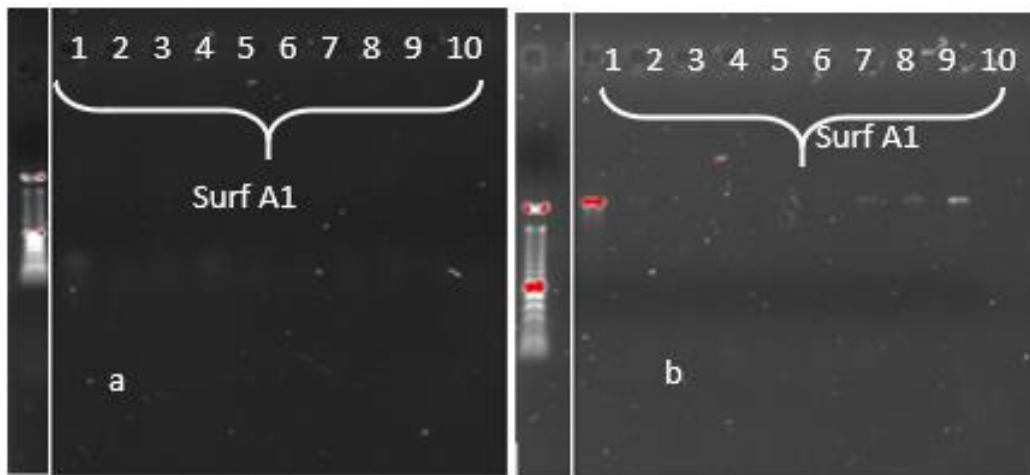
Se ha establecido que la producción de surfactantes se da principalmente durante la fase exponencial tardía hasta el final de la fase estacionaria en las

especies de *Bacillus spp.* Los tensioactivos se generan típicamente durante la fase estacionaria del crecimiento y las concentraciones elevadas de tensioactivo, incluso después del desplazamiento del crecimiento. Esto podría deberse a la liberación de tensioactivo unido a las células en el medio de crecimiento (Lawrance et al., 2014).



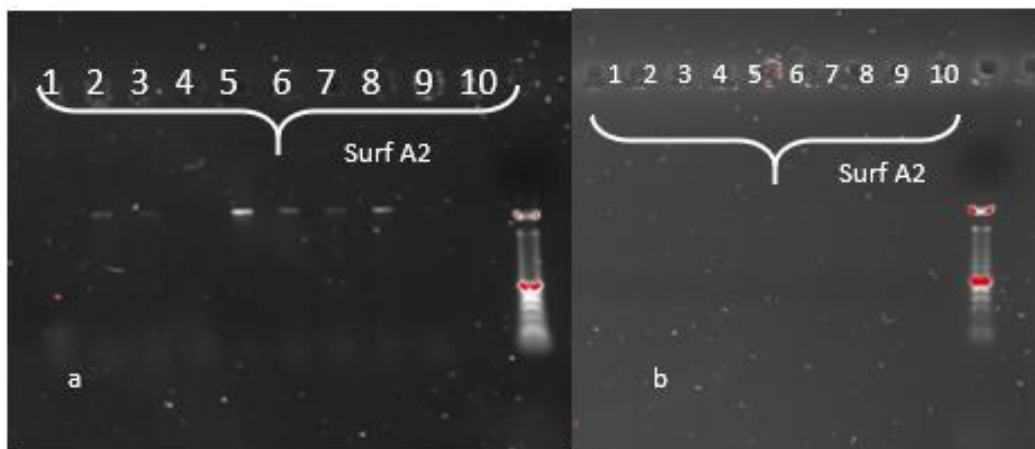
*Figura 22.* Productos PCR para Surfactina B. Ultimo carril: marcador de peso molecular 100pb, Carril 1, 4,7 Muestras ADN 24h; 2, 5,8 Muestras ADN 48h; 3, 6,9 Muestras ADN 72h. Carril 10 control negativo.

- a) Medio MOLP
- b) Medio HS40-MOLP2



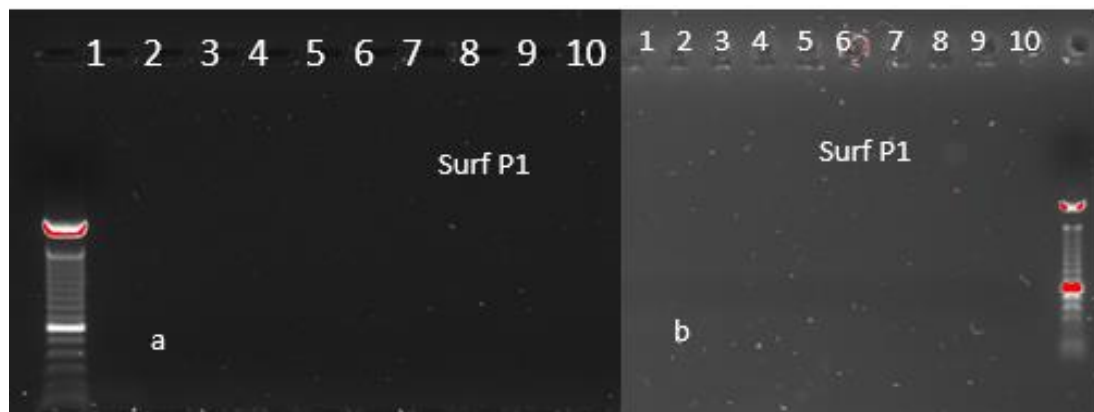
*Figura 23.* Productos PCR para Surfactina A1. Ultimo carril: marcador de peso molecular 100pb, Carril 1, 4,7 Muestras ADN 24h; 2, 5,8 Muestras ADDN 48h; 3, 6,9 Muestras ADN 72h. Carril 10 marcador negativo.

- a) Medio MOLP
- b) Medio HS40-MOLP2



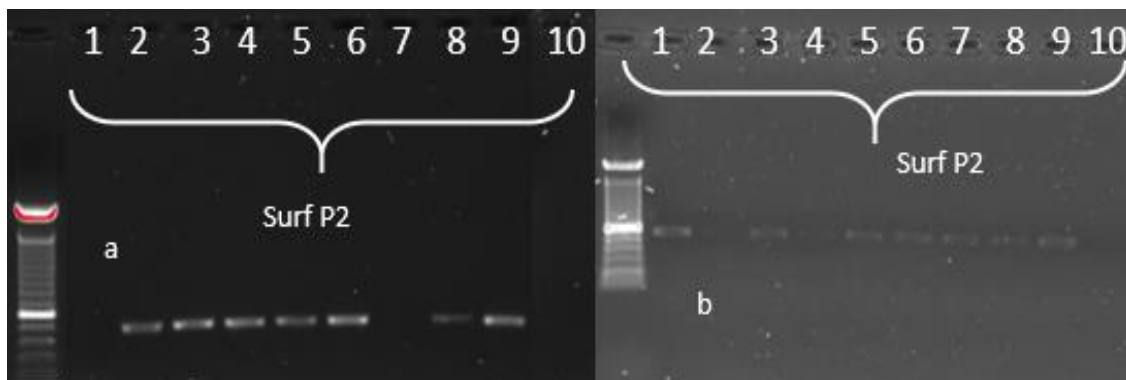
*Figura 24.* Productos PCR para Surfactina A2. Ultimo carril: marcador de peso molecular 100pb, Carril 1, 4,7 Muestras ADN 24h; 2, 5,8 Muestras ADN 48h; 3, 6,9 Muestras ADN 72h. Carril 10 marcador negativo.

- a) Medio MOLP
- b) Medio HS40-MOLP2



*Figura 25.* Productos PCR para Surfactina P1. Ultimo carril: marcador de peso molecular 100pb, Carril 1, 4,7 Muestras ADN 24h; 2, 5,8 Muestras ADN 48h; 3, 6,9 Muestras ADN 72h. Carril 10 control negativo.

- a) Medio MOLP
- b) Medio HS40-MOLP2



*Figura 26.* Productos PCR para Surfactina P2. Ultimo carril: marcador de peso molecular 100pb, Carril 1, 4,7 Muestras ADN 24h; 2, 5,8 Muestras ADN 48h; 3, 6,9 Muestras ADN 72h. Carril 10 control negativo.

- a) Medio MOLP
- b) Medio HS40-MOLP2



#### 5.4 Producción de Biomasa en Biorreactor

De las muestras recolectadas en el biorreactor se obtuvieron diferentes concentraciones celulares, se observó que el número de células presente en el medio incrementaba según el tiempo de cultivo. De cada repetición en el biorreactor se calculó el promedio de logaritmo de UFC mL<sup>-1</sup> por cada banco de dilución en diferente tiempo incluida la desviación estándar (SD) como se muestra en la tabla 2. Se obtuvieron 6 datos de biomasa en dos bancos de dilución de cada hora muestreada, se analizaron los datos en base al promedio de las repeticiones y desviación estándar (Figura 27). Dando como resultado que el medio optimizado de bajo costo incrementa la proliferación celular incluso al pasar las 72 horas de cultivo. Por el contrario, el medio MOLP al llegar a las 72 horas disminuye la cantidad de células por lo que se encuentra en fase de muerte. Se observa un mayor rendimiento en el medio de bajo costo a base de harina de soya y melaza (HS40-MOLP2).

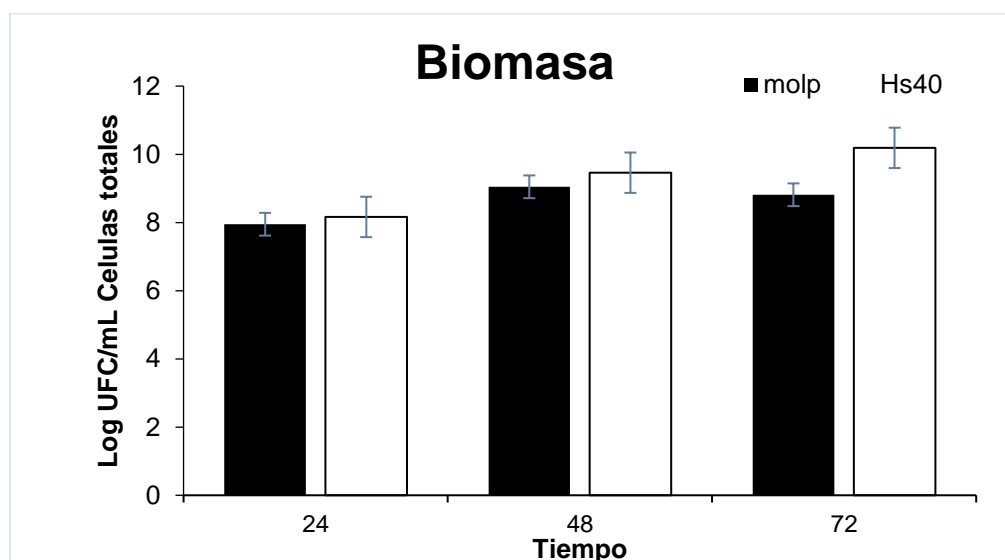
Los resultados muestran que el medio de bajo costo promueve el crecimiento celular de *B. subtilis*, además del uso de productos comerciales y subproductos como la harina de soya y melaza proporciona un alto crecimiento en el reactor bajo condiciones estandarizadas. *B. subtilis* puede producirse en un medio de bajo costo que combina fuentes de nitrógeno y carbono de bajo costo en matraces agitados y un fermentador de laboratorio (5L). El uso de materias primas de bajo costo de fuentes abundantes puede ser un aspecto importante para mejorar la viabilidad económica a nivel industrial (Jin et al., 2015; Yáñez-Mendizábal, Viñas, Usall, Torres, Solsona, & Teixidó, 2012).

Tabla 2. Promedio y Desviación estándar de Log UFC mL<sup>-1</sup> Biomasa en medio MOLP y medio de bajo costo HS40-MOLP2.

#### Biomasa

Tiempo (horas)	Log UFC mL <sup>-1</sup>	Log UFC mL <sup>-1</sup>
----------------	--------------------------	--------------------------

	MOLP	HS40
24	7,9490	8,1630
48	9,0470	9,4610
72	8,8140	10,1890
<b>SD</b>		
24	0,71850	0,71130
48	0,57480	0,43790
72	0,40850	0,48550



*Figura 27.* Diagrama de barras Log UFC mL<sup>-1</sup> de biomasa vs Tiempo. Líneas verticales color negro representa el promedio de Log UFC mL<sup>-1</sup> de células totales en medio MOLP. Líneas verticales blanco de Log UFC mL<sup>-1</sup> de células totales en medio HS40-MOLP2 de tres repeticiones en biorreactor. La desviación estándar de los resultados con un margen de error de (+/- 1).

Dentro de los resultados estadísticos obtenidos de las pruebas SNK's (Student-Newman Keuls) se establece que, dentro del análisis de varianza de biomasa, se pueden agrupar los resultados en tres grupos diferentes, el mejor tratamiento para la producción celular es el medio optimizado a las 72 horas de cultivo (Anexo 5). Al comparar la diferencia entre medias de cada tratamiento se observa que el mejor tratamiento para el incremento de biomasa para *B. subtilis* Cptx S2-1 es el medio HS40 a las 72 horas de cultivo. Mediante el programa estadístico SAS 9.4, se identifica que hay diferencias significativas entre medias y agrupa los tratamientos en 3 grupos diferentes. Para este análisis se identifica que en el medio de bajo costo a las 48 horas de cultivo se tienen mejores resultados en comparación con el medio MOLP en el mismo tiempo. En el medio que menos cantidad de células *B. subtilis* existe es en el medio MOLP a las 24 horas. Para el medio MOLP a las 72 horas se observa que tiene una menor producción de células en comparación del medio de harina de soya a las 48 horas.

### 5.5 Producción de endosporas en Biorreactor

La cantidad de endosporas producidas en el tiempo se pudo identificar mediante tratamiento con calor, una vez que se eliminaron todas las células de *B. subtilis* Cptx S2-1 del medio se pudo conocer el Log UFC mL<sup>-1</sup> de endosporas. Se obtuvo la concentración de UFC mL<sup>-1</sup> de cada banco de dilución realizado. Del promedio de endosporas se obtuvo que la mayor cantidad de endosporas producidas se obtiene con el medio de bajo costo a las 72 horas. En la Tabla 3 se puede observar los resultados de promedio y desviación estándar para medio MOLP y medio de bajo costo HS40-MOLP2.

La cantidad de endosporas presentes en el medio aumenta con el tiempo, esto puede deberse al exceso de nutrientes como carbono, puede someter a la bacteria a cierta clase de estrés, lo que promueve la producción de endosporas. Esto se evidenció debido a que en el medio MOLP a las 72 horas incrementa la

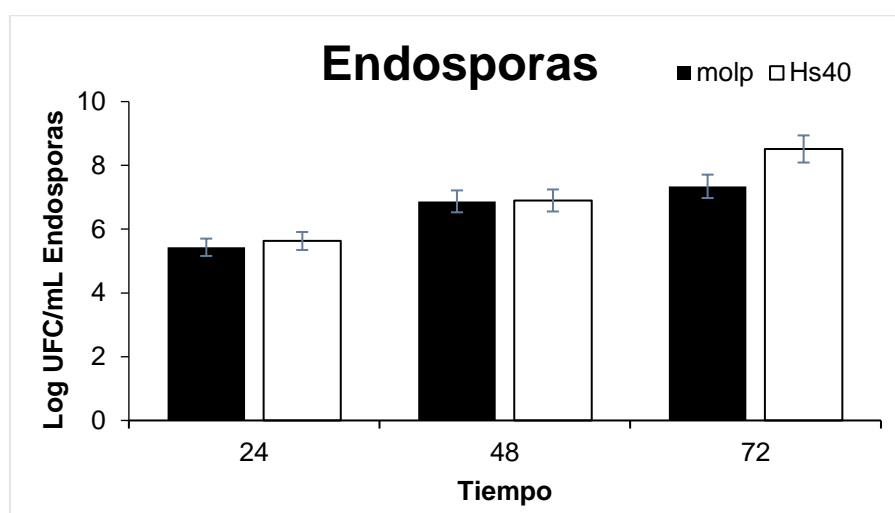
producción de endosporas por escasos de nutrientes. En este medio se evidenció una disminución de biomasa y un incremento de endosporas. Por otro lado, en el medio de bajo costo se evidencia una mayor cantidad de endosporas (Figura 28), esto puede deberse a la limitación de otro tipo de nutrientes que necesita la bacteria para el incremento de biomasa.

La esporulación en *B. subtilis* también ha demostrado ser una herramienta muy poderosa que ha permitido comprender los procesos básicos en bacterias, incluida la regulación transcripcional y el ciclo celular. Se han realizado muchas revisiones exhaustivas de la esporulación que identifiquen los mecanismos de acción de la bacteria para generar esporas (Errington, 2003). Las endosporas producidas por *B. subtilis* son estructuras de reposo que se caracterizan por tener un estado metabólico prácticamente detenido. La estructura de la endospora bacteriana, intrínseca a la supervivencia, contiene un cromosoma condensado e inactivo y capas adicionales alrededor, incluyendo una corteza rica en peptidoglicano y una o más capas de material proteico como envoltura de la spora (Yáñez-Mendizábal, 2012, pp. 9–10). Se sabe que los mecanismos de esporulación de *B. subtilis* están relacionados con la producción de metabolitos antimicrobianos que se caracterizan por ser parte del mecanismo de defensa de la bacteria (Ongena & Jacques, 2008).

Tabla 3. Promedio y Desviación estándar de Log UFC mL<sup>-1</sup> Endosporas en medio MOLP y medio HS40.MOLP2.

<b>Endosporas</b>		
	Log UFC mL <sup>-1</sup> Log UFC mL <sup>-1</sup>	
<b>Tiempo (horas)</b>	MOLP	HS40
24	5,4311	5,6280
48	6,8709	6,8991

72	7,3428	8,5139
<b>SD</b>		
24	0,4343	0,5273
48	0,4231	0,4687
72	0,5279	0,5907



*Figura 28.* Diagrama de barras Log UFC mL<sup>-1</sup> de Endosporas vs Tiempo. Líneas verticales color negro representa el promedio de Log UFC mL<sup>-1</sup> de endosporas en medio MOLP. Líneas verticales blanco de Log UFC mL<sup>-1</sup> de endosporas en medio HS40-MOLP2 de tres repeticiones en biorreactor. La desviación estándar de los resultados con un margen de error de (+/- 1).

Se realizó el análisis univariante de endosporas en el cual se identificó que existe diferencia significativa para la producción de endosporas para cada tratamiento. La diferencia de medias identifico como mejor tratamiento al medio de bajo costo en el tiempo de 72 horas. Se agrupa en 3 grupos diferentes sin relación entre medias. La producción de esporas al igual que en la producción de biomasa se evidenció como mejor tratamiento al medio de bajo costo de 72 horas, existe una diferencia significativa entre tratamiento con medio MOLP y medio de bajo costo,

pero no hay diferencia significativa entre tratamientos a las 48 horas en los dos medios. A las 24 horas se evidencia menor cantidad de endosporas sin diferencia significativa entre el medio de bajo costo HS40-MOLP2 y el medio MOLP.

Se pudo observar que el medio MOLP tiene menor producción de endosporas en el tiempo, se sugiere que las cantidades de nutrientes en el medio evita que la bacteria se encuentre en estrés por lo que los mecanismos de defensa no se activan disminuyendo la cantidad de esporas al medio. Las condiciones controladas en el biorreactor promueven el crecimiento de *B. subtilis* y dan un ambiente óptimo para su desarrollo.

#### 5.6 Producción de lipopéptidos en biorreactor

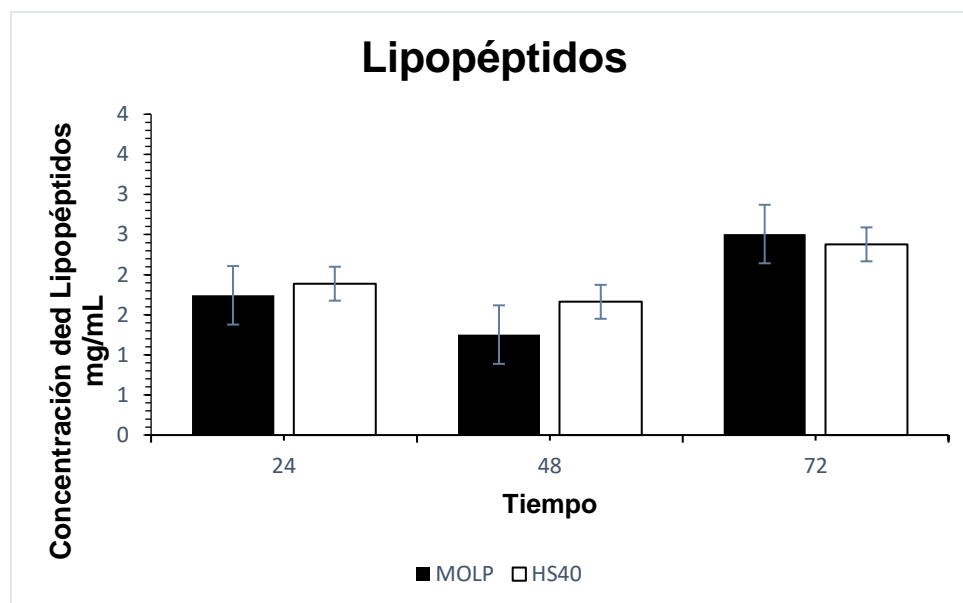
La producción de lipopéptidos está ligada a la cantidad de biomasa, biomasa y endosporas presentes en el medio. Se obtuvo lipopéptidos de *B. subtilis* de cada repetición del crecimiento en el biorreactor. Se calculó la concentración de los extractos en base al peso final de lipopéptidos obtenidos. Se pudo observar que hay un incremento de lipopéptidos con respecto al tiempo. Existe una acumulación de lipopéptidos a las 72 horas en los dos medios MOLP y HS40-MOLP2. En la tabla 4 se observa el promedio de concentración de lipopéptidos en  $\text{mg mL}^{-1}$  de los lipopéptidos obtenidos del biorreactor. Se calculó la desviación estándar entre diferentes repeticiones para poder identificar la dispersión que existe entre datos. En la figura 29 se observa la acumulación de lipopéptidos en diferentes fases de crecimiento.

Cuando las células están expuestas al estrés, los compuestos de bajo peso molecular a menudo se sintetizan y expulsan al medio externo o se acumulan intracelularmente para equilibrar la presión del citoplasma con el del ambiente circundante (Abadías, Teixidó, Usall, Viñas, & Magan, 2000).

Las bacterias Gram positivas y especialmente las cepas de *Bacillus subtilis* también producen una variedad de antibióticos antibacterianos y antifúngicos. En estudios realizados se ha demostrado que la glucosa es la mejor fuente de carbono para el crecimiento y la biosíntesis de tensioactivos, y tras la optimización con fuentes orgánicas e inorgánicas (Lawrance et al., 2014).

Tabla 4. Promedio y Desviación estándar de producción de lipopéptidos en medio MOLP y medio HS40.MOLP2.

<b>Lipopéptidos</b>		
<b>Tiempo (horas)</b>	<b>MOLP</b>	<b>HS40</b>
24	1,7400	1,8900
48	1,2500	1,6600
72	2,5100	2,3800
<b>SD</b>		
24	0,5800	0,6700
48	0,3200	0,6000
72	1,9700	1,6800



*Figura 29.* Diagrama de barras producción de lipopéptidos medio MOLP y medio HS40. MOLP2 vs Tiempo Líneas verticales color negro representa el promedio de concentración de lipopéptidos en medio MOLP. Líneas verticales blanco de concentración de lipopéptidos en medio HS40-MOLP2 de tres repeticiones en biorreactor. La desviación estándar de los resultados con un margen de error de (+/- 1).

Según el análisis estadístico entre medias no existe diferencias significativas entre tratamientos, por lo que en los tratamientos se evidencia que la cantidad de lipopéptidos se mantiene constante, va aumentando gradualmente respecto al tiempo.

#### 5.7 Correlación entre biomasa, endosporas y lipopéptidos producidos en biorreactor.

Tras realizar el análisis multivariante se observa que en el medio MOLP la producción de lipopéptidos está relacionada en su mayoría a la producción de endosporas (Figura 30). A las 24 horas la cantidad de biomasa es menor en comparación a las 48 y 72 horas (Tabla 5).



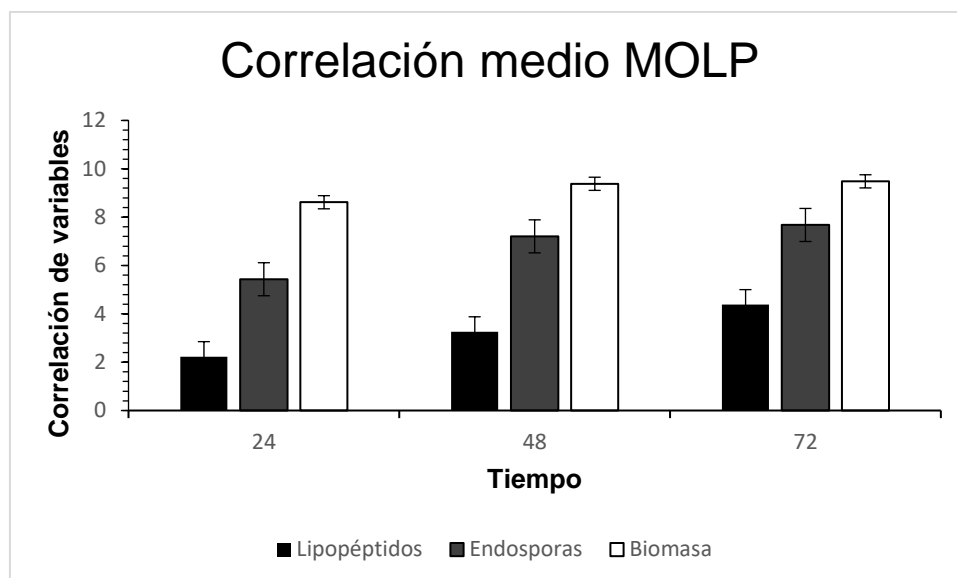


Figura 30. Correlación endosporas, biomasa, lipopéptidos respecto al tiempo en medio MOLP. Líneas verticales negras representan la concentración de lipopéptidos en  $\text{mg mL}^{-1}$ , líneas verticales grises  $\text{Log UFC mL}^{-1}$  de endosporas. Líneas verticales blancas  $\text{Log UFC mL}^{-1}$  de células totales. La desviación estándar de los resultados con un margen de error de (+/- 1).

Tabla 5. Análisis estadístico Multivariante en STATGRAPHICS de lipopéptidos, biomasa, y endosporas producidas en el biorreactor de medio MOLP.

	Biomasa	Endosporas	Lipopéptidos	Tiempo
<b>Biomasa</b>		0,7950	0,7551	0,7954
		0,0104	0,0186	0,0104
<b>Endosporas</b>	0,7950		0,9047	0,9232
	0,0104		0,0008	0,0004
<b>Lipopéptidos</b>	0,7551	0,9047		0,9783
	0,0186	0,0008		0,0000
<b>Tiempo</b>	0,7954	0,9232	0,9783	
	0,0104	0,0004	0,0000	

El análisis multivariante respecto a la producción de endosporas y biomasa demostró que existe una correlación en el medio de bajo costo al compararse contra la cantidad de lipopéptidos producidos. Se observó que en el medio HS40-MOLP 2 la producción de lipopéptidos está relacionada en su mayoría a la producción de endosporas y que aumenta con respecto al tiempo (Figura 31). A las 24 horas la cantidad de biomasa es menor en comparación a las 48 y 72 horas, pero se observó una disminución de biomasa, pero no se afecta la producción de lipopéptidos (Tabla 6)

Las Iturinas y Fengicinas son factores importantes para la inhibición de hongos y se ha demostrado que son los metabolitos principales de *Bacillus* implicados en el antagonismo contra diversos tipos de hongos. Las Surfactinas son liberadas masivamente por todas las cepas productoras de lipopéptidos, pero están poco involucradas en el antagonismo de los patógenos, sus características surfactantes han demostrado actuar de manera sinérgica en la producción de otros compuestos lipopeptídicos como Fengicinas e Iturinas (Yáñez-Mendizábal, Viñas, Usall, Vicente, et al., 2012). Los estudios realizados sobre estos lipopéptidos han demostrado que la actividad antifúngica de las Surfactinas es menor en comparación con las Fengicinas e Iturina, además la secreción de las surfactinas al medio se sabe que está relacionado con la colonización bacteriana en la rizósfera y tejidos radiculares, favoreciendo la liberación de Fengicinas e Iturinas como antifúngicos (Cawoy et al., 2015; Falardeau et al., 2013; Ongena et al., 2007). Por esta razón al tener la presencia de surfactinas en el medio se observa conjuntamente la presencia del resto de familias de lipopéptidos.

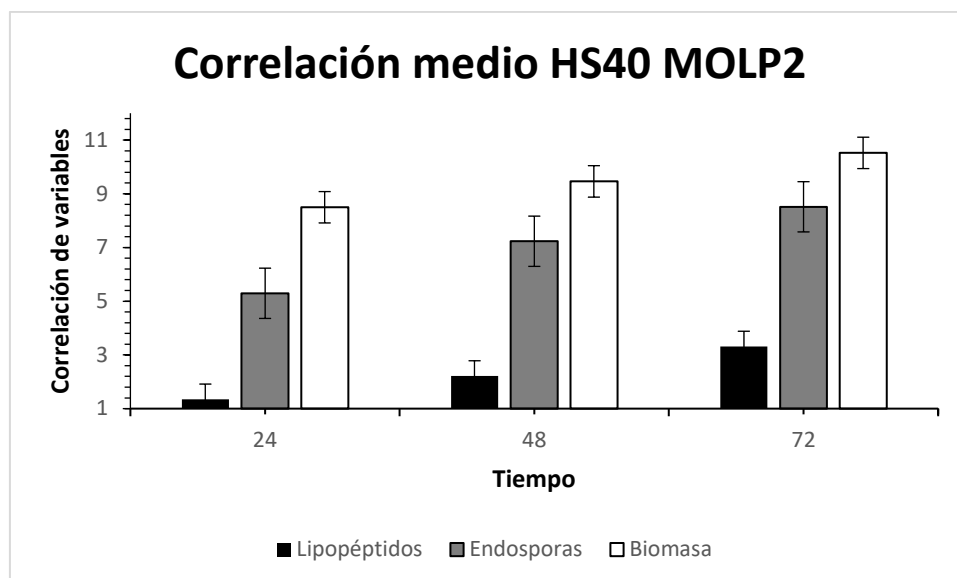


Figura 31. Correlación endosporas, biomasa, lipopéptidos respecto al tiempo en medio HS40-MOLP2. Líneas verticales negras representan la concentración de lipopéptidos en  $\text{mg mL}^{-1}$ , líneas verticales grises  $\text{Log UFC mL}^{-1}$  de endosporas. Líneas verticales blancas  $\text{Log UFC mL}^{-1}$  de células totales. La desviación estándar de los resultados con un margen de error de (+/- 1).

Tabla 6. Análisis estadístico Multivariante en STATGRAPHICS de lipopéptidos, biomasa, y endosporas producidas en biorreactor de medio MOLP.

	Biomasa	Endosporas	Lipopéptidos	Tiempo
<b>Biomasa</b>		0,9801	0,9360	0,9882
		0,0000	0,0002	0,0000
<b>Endosporas</b>	0,9801		0,9218	0,9755
	0,0000		0,0004	0,0000
<b>Lipopéptidos</b>	0,9360	0,9218		0,9498
	0,0000	0,0000		0,0001

---

<b>Tiempo</b>	0,9882	0,9755	0,9498
	0,0000	0,0000	0,0001

---

## 6. Conclusiones y Recomendaciones

### 6.1 Conclusiones

La producción de lipopéptidos antifúngicos de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 inicia en la fase exponencial y se incrementa durante la fase estacionaria en los dos medios de cultivo utilizados. Las concentraciones de extractos de lipopéptidos varían dependiendo el medio que se produzcan. La cantidad de lipopéptidos en el medio de bajo costo HS40-MOLP2 es mayor a la cantidad presente en el medio comercial MOLP. El medio de harina de soya también favoreció a la producción de endosporas y biomasa. *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 produce lipopéptidos de las familias de Fengicinas, Iturinas y Surfactinas. Los lipopéptidos presentan un alto potencial biológico contra *Colletotrichum acutatum*. Los lipopéptidos se van acumulando en el tiempo, por lo que a las 48 y 72 horas presentan una mayor actividad biológica e inhibición de crecimiento del hongo.

Los genes analizados de *B. subtilis* producen lipopéptidos de las familias de las Fengicinas, Iturinas, Surfactinas y Bacillomicinas. Dentro de la familia de Fengicinas se identificó los genes de Fengicina C, Fengicina E con capacidad de inhibición micelial. La cepa Cptx S2-1 también codificó genes de Iturina A, Iturina B Bacillomicina D, y Surfactina A, Surfactina P y Surfactina B.

Se estableció que existe una relación entre la producción de endosporas, biomasa y lipopéptidos durante el tiempo. Los lipopéptidos aumentan respecto a la cantidad de biomasa y endosporas presentes en el medio, a diferencia de las 24 y 48 horas en las cuales es evidente el incremento uniforme de los tres parámetros analizados, a las 72 horas aumenta la cantidad de endosporas y de igual manera la cantidad de lipopéptidos. A las 72 horas la cantidad de lipopéptidos es mayor por lo que es un metabolito que se acumula en el tiempo. La relación entre la cantidad de endosporas con la cantidad de lipopéptidos en el medio es mayor a la relación con la cantidad de la biomasa. En el medio de bajo

costo HS40- MOLP2 es evidente que hay un incremento de biomasa y endosporas, por esa razón aumenta la cantidad de lipopéptidos.

## 6.2 Recomendaciones

Para poder identificar todos los lipopéptidos presentes se podría realizar cromatografías de alta fidelidad partiendo de extractos puros de lipopéptidos. En las cromatografías de capa fina realizadas se pueden identificar por separado varias familias de lipopéptidos, las Fengicinas demostraron ser las únicas con capacidad antifúngica. Se puede identificar que subfamilias de lipopéptidos de mejor manera con mediante HPLC.

Se puede realizar un análisis de lipopéptidos dependiendo de su estructura y cantidad de aminoácidos mediante HPLC para identificar compuestos lipopeptídicos específicos. Se conoce que tienen una función en conjunto, pero para incrementar tanto el potencial antifúngico como su actividad de tensoactivo, es conveniente identificar la fase específica de producción que promueva tener compuestos más específicos de cada familia de lipopéptidos. La identificación de producción de lipopéptidos específicos en diferentes fases de crecimiento de *B. subtilis* puede promover la obtención de compuestos con mayor pureza.

Es necesario optimizar los parámetros de obtención de lipopéptidos puros. Las estrategias de extracción y purificación de lipopéptidos garantizan un incremento de las cantidades finales de compuestos a escala industrial. En los medios de cultivo de microorganismos pueden presentarse compuestos que representen interferencias en la purificación de antimicrobianos, por esta razón es recomendable optimizar las técnicas de purificación de manera que sean rentables a escala industrial y no sean perjudiciales para el ambiente.

## REFERENCIAS

- Abadias, M., Teixidó, N., Usall, J., Viñas, I., & Magan, N. (2000). Solute stresses affect growth patterns, endogenous water potentials and accumulation of sugars and sugar alcohols in cells of the biocontrol yeast *Candida sake*. *Journal of Applied Microbiology*, 89(6), 1009–1017. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01207.x>
- Alarcón, A., Falconi, C., & Oleas, A. (2012). Caracterización Morfológica y Molecular de *Colletotrichum* spp. Asociados a la Antracnosis de *Lupinus mutabilis* (Chocho) y *Solanum betacea* (Tomate de árbol) en Tres Provincias del Ecuador. *Laboratorio de Control Biológico*, 4–7.
- Alvarez, F., Castro, M., Príncipe, A., Borioli, G., Fischer, S., Mori, G., & Jofré, E. (2012). The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP 218 and ARP 23 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease. *Journal of Applied Microbiology*, 112(1), 159–174. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05182.x>
- Caicedo, C., & Peralta, E. (2001). El Cultivo de Chocho, 47.
- Calvo, P., & Zuñiga, D. (2010). Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizosfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología Aplicada*, 9(1), 31–39. Recuperado de [http://www.lamolina.edu.pe/ecolapl/Articulo\\_4\\_No\\_1\\_Vol\\_9.pdf](http://www.lamolina.edu.pe/ecolapl/Articulo_4_No_1_Vol_9.pdf)
- Castro-longoria, E., Trejo-guillén, K., Vilchis-nestor, A. R., & Avalos-borja, M. (2014). Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Biosynthesis of lead nanoparticles by the aquatic water fern, *Salvinia minima* Baker, when exposed to high lead concentration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 114, 277–283. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.09.050>
- Cawoy, H., Debois, D., Franzil, L., Pauw, E. De, Thonart, P., & Ongena, M. (2015). Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis* / *amyloliquefaciens*, 12.

<https://doi.org/10.1111/1751-7915.12238>

- Chen, W. C., Juang, R. S., & Wei, Y. H. (2015a). Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*, *103*, 158–169. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.07.009>
- Chen, W. C., Juang, R. S., & Wei, Y. H. (2015b). Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*, *103*, 158–169. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.07.009>
- Chen, Zhang, Y., Fu, X., Li, Y., & Wang, Q. (2016). Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* PG12 for the biological control of apple ring rot. *Postharvest Biology and Technology*, *115*, 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.12.021>
- Chtioui, O., Dimitrov, K., Gancel, F., Dhulster, P., & Nikov, I. (2014). Selective fengycin production in a modified rotating discs bioreactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *37*(2), 107–114. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-0964-9>
- Claudio, D. (2016). Biotechnology Efecto de c illu spp. aislados de suelos agrícolas de la provincia de Cotopaxi para el control de Antracnosis (*Colletotrichum acutatum*) del chocho andino (*Lupinus mutabilis* ).
- Dunlap, C. A., Schisler, D. A., Bowman, M. J., & Rooney, A. P. (2015). Genomic analysis of *Bacillus subtilis* OH 131.1 and co-culturing with *Cryptococcus flavescens* for control of *Fusarium* head blight. *Plant Gene*, *2*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2015.03.002>
- Errington, J. (2003). Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology*, *1*(2), 117–126. <https://doi.org/10.1038/nrmicro750>
- Falardeau, J., Wise, C., Novitsky, L., & Avis, T. J. (2013). Ecological and Mechanistic Insights Into the Direct and Indirect Antimicrobial Properties of *Bacillus subtilis* Lipopeptides on Plant Pathogens. *Journal of Chemical Ecology*, *39*(7), 869–878. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0319-7>



- Falconí, & Yáñez-Mendizábal, V. (2017). Efficacy of UV-C radiation to reduce seedborne anthracnose ( *Colletotrichum acutatum* ) from Andean lupin ( *Lupinus mutabilis* ). *Plant Pathology*, 1–8. <https://doi.org/10.1111/ppa.12793>
- Falconí, & Yáñez–Mendizábal. (2016). Dry heat treatment of Andean lupin seed to reduce anthracnose infection. *Crop Protection*, 89, 178–183. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.07.021>
- Farace, G., Fernandez, O., Jacquens, L., Coutte, F., Krier, F., Jacques, P., ... Dorey, S. (2015). Cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* activate distinct patterns of defence responses in grapevine. *Molecular Plant Pathology*, 16(2), 177–187. <https://doi.org/10.1111/mpp.12170>
- Gond, S. K., Bergen, M. S., Torres, M. S., & White, J. F. (2015). Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. *Microbiological Research*, 172, 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.11.004>
- Grijalva, C. (UDLA). (2015). Evaluación de *Bacillus subtilis* spp. y sus metabolitos en el control biológico de *Ovularia* y *Fusarium* en chocho (*Lupinus mutabilis* sweet).
- Guo, Q., Dong, W., Li, S., Lu, X., Wang, P., Zhang, X., ... Ma, P. (2014). Fengycin produced by *Bacillus subtilis* NCD-2 plays a major role in biocontrol of cotton seedling damping-off disease. *Microbiological Research*, 169(7–8), 533–540. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.12.001>
- Hamburger, M. O., & Cordell, G. A. (1987). A Direct bioautographic TLC Assay for compounds possessing antibacterial activity. *Journal of Natural Products*, 50(1), 19–22. <https://doi.org/10.1021/np50049a003>
- Hamley, I. W. (2015). Lipopeptides: from self-assembly to bioactivity. *Chem. Commun.*, 51(41), 8574–8583. <https://doi.org/10.1039/C5CC01535A>
- Jacques, P. (2011). *Biosurfactants* (Vol. 20). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-14490-5>
- Jacques, P., Hbid, C., Destain, J., Razafindralambo, H., Paquot, M., De Pauw, E., & Thonart, P. (1999). Optimization of Biosurfactant Lipopeptide Production from *Bacillus subtilis* S499 by Plackett-Burman Design.

- Applied Biochemistry and Biotechnology*, 77(1–3), 223–234.  
<https://doi.org/10.1385/ABAB:77:1-3:223>
- Jin, H., Li, K., Niu, Y., Guo, M., Hu, C., Chen, S., & Huang, F. (2015). Continuous enhancement of iturin A production by *Bacillus subtilis* with a stepwise two-stage glucose feeding strategy. *BMC Biotechnology*, 15(1), 53.  
<https://doi.org/10.1186/s12896-015-0172-6>
- Lawrance, A., Balakrishnan, M., Cheriath, T., Palaiya, D., Nambali, V., Gopal, D., & Ramalingam, K. (2014). Functional and molecular characterization of a lipopeptide surfactant from the marine sponge-associated eubacteria *Bacillus licheniformis* NIOT-AMKV06 of Andaman and Nicobar Islands, India. *Marine Pollution Bulletin*, 82(1–2), 76–85.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.03.018>
- Li, Y., Han, L. R., Zhang, Y., Fu, X., Chen, X., Zhang, L., ... Wang, Q. (2013). Biological control of apple ring rot on fruit by *Bacillus amyloliquefaciens* 9001. *Plant Pathology Journal*, 29(2), 168–173.  
<https://doi.org/10.5423/PPJ.SI.08.2012.0125>
- Life technologies. (2013). PureLink® Genomic DNA Kits For purification of genomic DNA. *PureLink Genomic DNA Kits For Purification of Genomic DNA*, (25), 1–48.
- Meng, X., Yu, J., Yu, M., Yin, X., & Liu, Y. (2015). Dry flowable formulations of antagonistic *Bacillus subtilis* strain T429 by spray drying to control rice blast disease. *Biological Control*, 85, 46–51.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.03.004>
- Mnif, I., & Dhouha, G. (2015). Lipopeptide surfactants: Production, recovery and pore forming capacity. *Peptides*, 71, 100–112.  
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.07.006>
- Oliva, C. (UDLA). (2015). *Caracterización del potencial biológico de bacillus spp. Y sus metabolitos para el control de colletotrichum acutatum causante de la antracnosis del chocho andino (lupinus mutabilis) en las provincias de chimborazo y cotopaxi.*
- Ongena, M., & Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16(3), 115–125.

<https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>

- Ongena, M., Jacques, P., Touré, Y., Destain, J., Jabrane, A., & Thonart, P. (2005). Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *69*(1), 29–38. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1940-3>
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., ... Thonart, P. (2007). Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*, *9*(4), 1084–1090. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x>
- Pathak, K. V., Keharia, H., Gupta, K., Thakur, S. S., & Balaram, P. (2012). Lipopeptides from the banyan endophyte, *Bacillus subtilis* K1: Mass spectrometric characterization of a library of fengycins. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, *23*(10), 1716–1728. <https://doi.org/10.1007/s13361-012-0437-4>
- Pereira, J. F. B., Gudiña, E. J., Costa, R., Vitorino, R., Teixeira, J. A., Coutinho, J. A. P., & Rodrigues, L. R. (2013). Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. *Fuel*, *111*, 259–268. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.04.040>
- Pierre, N., Ulrike, M., Etienne, D., Rochat, T., Leduc, A., Pigeonneau, N., ... Noirot, P. (2013). Condition-Dependent Transcriptome Reveals High-Level Regulatory Architecture in *Bacillus subtilis*, *1103*(2012). <https://doi.org/10.1126/science.1206848>
- Rangarajan, V., & Clarke, K. G. (2016). Towards bacterial lipopeptide products for specific applications ??? a review of appropriate downstream processing schemes. *Process Biochemistry*, *51*(12), 2176–2185. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.08.026>
- Razafindralambo, H., Paquot, M., Hbid, C., Jacques, P., Destain, J., & Thonart, P. (1993). Purification of antifungal lipopeptides by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*

- A, 639(1), 81–85. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(93\)83091-6](https://doi.org/10.1016/0021-9673(93)83091-6)
- Romero, D., Perez, A., Rivera, E., Cazorla, M., & de Vicente, A. (2004). Isolation and evaluation of antagonistic bacteria towards the cucurbit powdery mildew fungus *Podosphaera fusca*, 263–269. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1439-8>
- Romero, D., Vicente, A. De, Rakotoaly, R. H., Dufour, S. E., Arrebola, E., Cazorla, F. M., ... Pérez-garcía, A. (2007). Chapter 5.
- Romero, D., Vicente, A. De, Rakotoaly, R. H., Dufour, S. E., Veening, J., Arrebola, E., ... Pérez-garcía, A. (2007). The Iturin and Fengycin Families of Lipopeptides Are Key Factors in Antagonism of *Bacillus subtilis* Toward *Podosphaera fusca*, 20(4), 430–440.
- Romero, D., Vicente, A. De, Zeriuoh, H., Cazorla, F. M., & Fernández-ortuño, D. (2007). Evaluation of biological control agents for managing cucurbit powdery mildew on greenhouse-grown melon, 976–986. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01684.x>
- Samaniego, G. (UDLA). (2016). *Optimización del proceso de Producción de Bacillus subtilis CTPXS2-1 y sus metabolitos, para el control de Antracnosis*.
- Seyed, H. S., Jamshid, A., & Marzieh, L. (2015). Applications of *Bacillus subtilis* as an important bacterium in medical sciences and human life. *Tropical Journal of Medical Research*, 18(1), 1. <https://doi.org/10.4103/1119-0388.152530>
- Thomas, G. J., & Adcock, K. G. (2004). Exposure to dry heat reduces anthracnose infection of lupin seed. *Australasian Plant Pathology*, 33(4), 537–540. <https://doi.org/10.1071/AP04057>
- Thomas, G. J., & Sweetingham, M. W. (2003). Fungicide seed treatments reduce seed transmission and severity of lupin anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Australasian Plant Pathology*, 32(1), 39–46. <https://doi.org/10.1071/AP02059>
- Touré, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guiro, A., & Thonart, P. (2004). Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *Journal of Applied*

- Microbiology*, 96(5), 1151–1160. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02252.x>
- Vanittanakom, N., & Loeffler, W. (1986). Fengycin - a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *The Journal of Antibiotics*, XXXIX(7), 888–901. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.39.888>
- Vlamakis, H., Chai, Y., Beaugard, P., Losick, R., & Kolter, R. (2013). Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nature Reviews Microbiology*, 11(3), 157–168. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2960>
- Yáñez-Mendizábal, Usall, J., Viñas, I., Casals, C., Marín, S., Solsona, C., & N, T. (2011). Potential of a new strain of *Bacillus subtilis* CPA-8 to control the major postharvest diseases of fruit Potential of a new strain of *Bacillus subtilis* CPA-8 to control the major postharvest diseases of fruit, (932789201). <https://doi.org/10.1080/09583157.2010.541554>
- Yáñez-Mendizábal, Viñas, I., Usall, J., Torres, R., Solsona, C., Abadias, M., & Teixidó, N. (2012). Formulation development of the biocontrol agent *Bacillus subtilis* strain CPA-8 by spray-drying. *Journal of Applied Microbiology*, 112(5), 954–965. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05258.x>
- Yáñez-Mendizábal, Viñas, I., Usall, J., Torres, R., Solsona, C., & Teixido, N. (2012). Producción del agente de biocontrol *Bacillus subtilis* CPA-8 usando productos comerciales y subproductos de bajo coste.
- Yáñez-Mendizábal, Viñas, I., Usall, J., Torres, R., Solsona, C., & Teixidó, N. (2012). Production of the postharvest biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8 using low cost commercial products and by-products. *Biological Control*, 60(3), 280–289. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.12.001>
- Yáñez-Mendizábal, Viñas, I., Usall, J., Vicente, A. De, & Pérez-garcía, A. (2012). Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin- like lipopeptides, 132(4), 609–619. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9905-0>
- Yáñez–Mendizábal. (2012). Potencial de la cepa CPA–8 de *Bacillus subtilis* como

agente de biocontrol de enfermedades de postcosecha de fruta.  
*Medical Microbiology*. <https://doi.org/10.1073/pnas.17103711114>

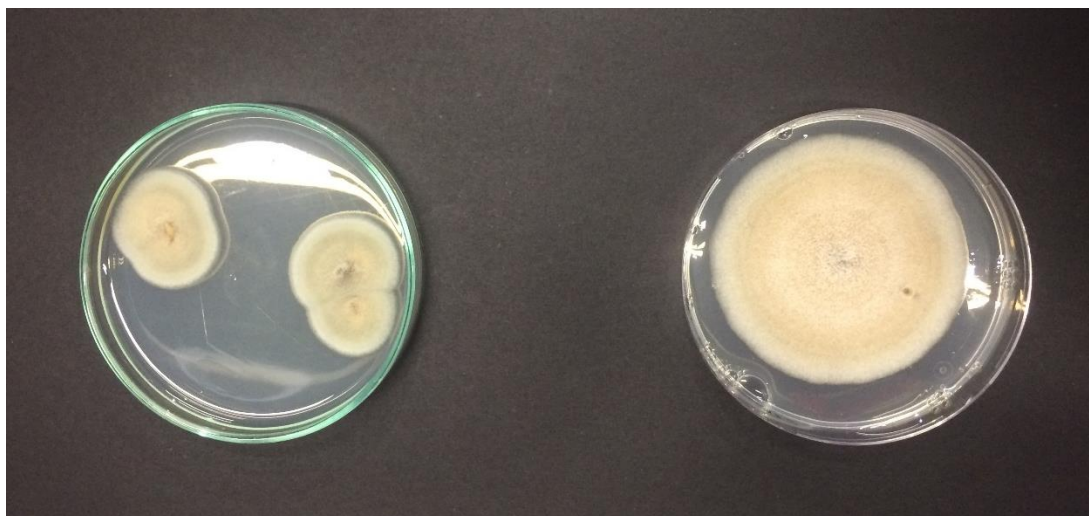
Yáñez–Mendizábal, V., Falconí, C., & Grijalva, C. (2015). *Bacillus* spp. evaluation to control anthracnose infection on Andean lupin seed (*Lupinus mutabilis* Sweet), *105*(12986696), S4. 153.

Yáñez–Mendizábal, Viñas, I., Usall, J., Cañamás, T., & Teixidó, N. (2012). Endospore production allows using spray-drying as a possible formulation system of the biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8, 729–735. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0834-y>

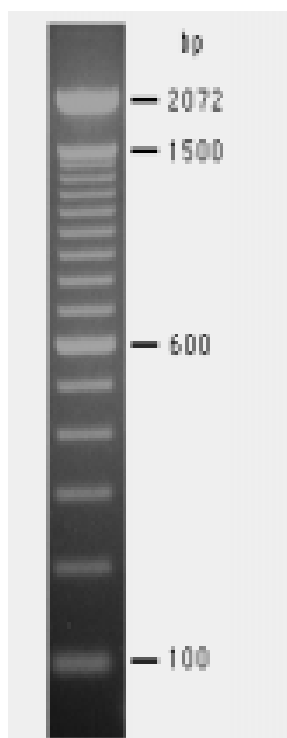
Yaseen, Y., Gancel, F., Drider, D., Béchet, M., & Jacques, P. (2016). Influence of promoters on the production of fengycin in *Bacillus* spp. *Research in Microbiology*, *167*(4), 272–281. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.01.008>

## **ANEXOS**

**Anexo 1: Hongo *Colletotrichum acutatum***



**Anexo 2: Mapa de marcador molecular TrackIt™ 100bp DNA Ladder. Ref. 10488-058**





### Anexo 3: Total repeticiones Log UFC mL<sup>-1</sup> de Biomasa en biorreactor

<b>Medio</b>	<b>Log UFC</b>	<b>Medio</b>	<b>Log UFC</b>
MOLP24	7,415	HS4024	8,522
MOLP24	7,663	HS4024	7,996
MOLP24	7,228	HS4024	7,025
MOLP24	7,294	HS4024	7,391
MOLP24	8,519	HS4024	8,294
MOLP24	8,477	HS4024	8,394
MOLP24	7,602	HS4024	8,690
MOLP24	7,699	HS4024	8,826
MOLP24	7,447	HS4024	7,279
MOLP24	7,623	HS4024	7,491
MOLP24	9,330	HS4024	9,079
MOLP24	9,093	HS4024	8,973
MOLP48	8,672	HS4048	9,328
MOLP48	8,544	HS4048	9,350
MOLP48	8,336	HS4048	8,954
MOLP48	8,312	HS4048	8,892
MOLP48	9,320	HS4048	9,033
MOLP48	9,516	HS4048	8,944
MOLP48	9,643	HS4048	9,505
MOLP48	9,362	HS4048	10,130
MOLP48	8,724	HS4048	9,820
MOLP48	8,556	HS4048	9,875
MOLP48	9,799	HS4048	9,820
MOLP48	9,778	HS4048	9,875
MOLP72	8,833	HS4072	10,255
MOLP72	8,580	HS4072	10,322
MOLP72	9,398	HS4072	9,431
MOLP72	8,591	HS4072	9,380
MOLP72	8,580	HS4072	10,401
MOLP72	8,531	HS4072	10,362

MOLP72	8,954	HS4072	10,462
MOLP72	8,477	HS4072	10,342
MOLP72	9,785	HS4072	9,792
MOLP72	8,602	HS4072	9,857
MOLP72	8,477	HS4072	11,033
MOLP72	8,954	HS4072	10,623

#### Anexo 4: Total repeticiones Log UFC mL<sup>-1</sup> de endosporas en biorreactor

Medio	Log UFC	Medio	Log UFC
MOLP24	4,90308999	HS4024	5,69897
MOLP24	4,83250891	HS4024	5,74036269
MOLP24	5,60205999	HS4024	5,12057393
MOLP24	4,77085201	HS4024	4,80617997
MOLP24	5,54406804	HS4024	5,29446623
MOLP24	5,69897	HS4024	5,18184359
MOLP24	5,47712125	HS4024	6,45939249
MOLP24	5,79239169	HS4024	6,40483372
MOLP24	5,64345268	HS4024	5,62324929
MOLP24	5,11394335	HS4024	5,17609126
MOLP24	5,60205999	HS4024	6,02938378
MOLP24	6,1931246	HS4024	6
MOLP48	6,17897695	HS4048	6,24797327
MOLP48	6,33645973	HS4048	6,12057393
MOLP48	6,90308999	HS4048	6,69897
MOLP48	6,91907809	HS4048	6,75739603
MOLP48	6,69897	HS4048	6,70586371
MOLP48	6,82085799	HS4048	6,63548375
MOLP48	6,67209786	HS4048	6,92941893
MOLP48	6,49136169	HS4048	6,90308999
MOLP48	7,20139712	HS4048	7,51851394
MOLP48	7,34242268	HS4048	7,4440448

MOLP48	7,46089784	HS4048	7,47712125
MOLP48	7,42488164	HS4048	7,35024802
MOLP72	7,08990511	HS4072	7,98227123
MOLP72	6,94939001	HS4072	7,99122608
MOLP72	7,69897	HS4072	7,75587486
MOLP72	7,60205999	HS4072	7,56820172
MOLP72	6,53147892	HS4072	8,48287358
MOLP72	6,69019608	HS4072	8,5797836
MOLP72	7,51851394	HS4072	8,50514998
MOLP72	7,5797836	HS4072	8,65321251
MOLP72	8,05690485	HS4072	8,98677173
MOLP72	8,2380461	HS4072	9,03342376
MOLP72	6,95424251	HS4072	9,23044892
MOLP72	7,20411998	HS4072	9,39794001

---

<b>Medio</b>	<b>mg/mL</b>
MOLP24	1,203
MOLP24	1,52
MOLP24	2,327
MOLP48	1,262
MOLP48	1,573
MOLP48	4,306
MOLP72	1,111
MOLP72	1,646
MOLP72	3,009
HS4024	1,156
HS4024	0,147
HS4024	0,738
HS4048	1,17
HS4048	0,252
HS4048	1,217
HS4072	0,806
HS4072	1,024

**Anexo 5 Análisis estadístico Univariante de Biomasa en SAS**

Means with the same letter are not significantly different.					
SNK Grouping		Mean	N	Medio	
	A	10.1886	3	HS4072	
	A				
B	A	9.4606	3	HS4048	
B	A				
B	A	9.0470	3	MOLP48	
B					
B		8.8136	3	MOLP72	
B					
B		8.1635	3	HS4024	
		7.9492	3	MOLP24	

**Anexo 6 Análisis estadístico Univariante de Endosporas en SAS**

Means with the same letter are not significantly different.			
SNK Grouping	Mean	N	Medio
A	8.5139	3	HS4072
B	7.3428	3	MOLP72
B			
B	6.8991	3	HS4048
B			
B	6.8709	3	MOLP48
C	5.6279	3	HS4024
C			
C	5.4311	3	MOLP24

## Anexo 7 Análisis estadístico Univariante de Lipopéptidos en SAS

Means with the same letter are not significantly different.			
SNK Grouping	Mean	N	Medio
A	2.3803	3	MOLP48
A			
A	1.9220	3	MOLP72
A			
A	1.6833	3	MOLP24
A			
A	0.9793	3	HS4072
A			
A	0.8797	3	HS4048
A			
A	0.6803	3	HS4024

## Anexo 8 Análisis estadístico Multivariante de Biomasa en STATGRAPHICS medio MOLP

### Resumen Estadístico

	<i>BIOMASA</i>	<i>ENDOSPORAS</i>	<i>LIPOPEPTIDOS</i>	<i>TIEMPO</i>
Recuento	9	9	9	9
Promedio	9,19922	6,7705	3,28767	48,0
Desviación Estándar	0,536605	1,05297	0,952943	20,7846
Coefficiente de Variación	5,83316%	15,5523%	28,9854%	43,3013%

## Anexo 9 Análisis estadístico Multivariante de Biomasa en STATGRAPHICS medio HS40-MOLP2.

### Resumen Estadístico

	<i>BIOMASA</i>	<i>ENDOSPORAS</i>	<i>LIPOPEPTIDOS</i>	<i>TIEMPO</i>
Recuento	9	9	9	9
Promedio	9,49322	7,01366	2,29089	48,0
Desviación Estándar	0,88736	1,42908	0,896131	20,7846
Coefficiente de Variación	9,3473%	20,3757%	39,1172%	43,3013%

