



# EVALUACIÓN DE SUSTANCIAS ACTIVAS DE MICROORGANISMOS MARINOS PARA EL TRATAMIENTO DE ANTRACNOSIS EN FRUTOS DE MANGO

**Laura Cristina Holguín Sterling**

**Universidad del Magdalena**

Facultad de Ingeniería

Maestría en Ciencias Agrarias

**Instituto de investigaciones marinas y costeras "José Benito**

**Vives de Andrés"- INVEMAR**

Santa Marta, Colombia

2021



# **EVALUACIÓN DE SUSTANCIAS ACTIVAS DE MICROORGANISMOS MARINOS PARA EL TRATAMIENTO DE ANTRACNOSIS EN FRUTOS DE MANGO**

Enmarcado en el proyecto:

“Evaluación de sustancias activas de microorganismos marinos para la  
formulación de agentes antisépticos”

Convenio de cooperación académica No. 011-19

**Laura C. Holguín Sterling**

Trabajo presentado como requisito parcial para optar al título de:

**Magíster en Ciencias Agrarias**

Directora:

Lina M. Blandón García M.Sc. Ph.D Ingeniería de Bioprocesos y Biotecnología. Jefe del  
Laboratorio de Bioprospección Marina – INVEMAR

Codirector:

Alberto R. Páez Redondo M.Sc. Fitopatología, PhD (c) Ciencias Agrarias. Docente TC  
Ingeniería Agronómica – Universidad del Magdalena

Línea de Investigación:

Producción Sostenible de Cultivos

Grupo de Investigación:

INVEMAR- Bioprospección Marina

Universidad del Magdalena

Facultad de Ingeniería

Maestría en Ciencias Agrarias

Santa Marta, Colombia

2021

# Nota de aceptación:

Aprobado por el Consejo de Programa en cumplimiento de los requisitos exigidos por el Acuerdo Superior N° 11 de 2017 y Acuerdo Académico N° 41 de 2017 para optar al título de Magister en Ciencias Agrarias

---

**Jurado**

---

**Jurado**

Santa Marta, \_\_\_\_ de \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

*"I don't want to believe. I want to know"*

*Carl Sagan*

---

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi gratitud a mis padres, mi esposo y mi hija por su gran apoyo y paciencia cada día.

A la Dra. Lina Blándon Jefe del Laboratorio de Bioprospección Marina del INVEMAR y al Dr. Alberto Páez Docente de la Universidad del Magdalena, por su valiosa orientación y acompañamiento constante.

Al Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras José Benito Vives de Andrés - INVEMAR, por facilitar los recursos financieros dentro de proyecto “Evaluación de sustancias activas de microorganismos marinos para la formulación de agentes antisépticos”, para que este trabajo de grado se llevara a cabo, por abrirme las puertas y permitir esta oportunidad de formación, en especial al equipo del Laboratorio de Biospección Marina, en el que tuve la fortuna de aprender, aportar y encontrar en cada uno de ellos apoyo durante todo el proceso.

A la Universidad del Magdalena y profesores del programa de la Maestría en Ciencias Agrarias, por sus enseñanzas, su paciencia y por el apoyo para culminar esta etapa de formación profesional.

## Resumen

La Antracnosis es una de las enfermedades en poscosecha más importante causada por especies de *Colletotrichum* en cultivos de mango, las pérdidas se deben a daños en la superficie del fruto que deterioran la calidad, perjudicando su comercialización. El actual manejo de la enfermedad se fundamenta en la aplicación frecuente de fungicidas de origen químico, cuyo uso extensivo e intensivo para el control de plagas y enfermedades en campo, ha perturbado el balance ecológico de los microorganismos presentes en el hábitat, dando lugar al desarrollo de cepas patógenas resistentes, además de contaminar el medio ambiente y representar un riesgo para la salud humana debido a su toxicidad, por lo que se ha hecho necesario desarrollar estrategias alternativas, como el control biológico. Los microorganismos marinos representan una fuente de nuevas sustancias antimicrobianas, debido a que su supervivencia en ambientes extremos ha conllevado a desarrollar mecanismos para competir por el espacio y acceder a los nutrientes. En este sentido, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de metabolitos producidos por seis bacterias marinas contra cuatro cepas de *Colletotrichum* spp. Para ello, se realizó un cribado inicial de la actividad antifúngica (*in vitro*) exponiendo cada una de las bacterias a la presencia de cuatro cepas de *Collectotrichum* spp., donde *Bacillus velezensis* INV FIR 31, *Bacillus* sp. INV FIR48 y *Bacillus safensis* INV FIR26, presentaron los mejores porcentajes de inhibición micelial con valores de 40, 34 y 21%, respectivamente. Posteriormente, se obtuvo el extracto BS57 de la bacteria INV FIR31, y se evaluó a una concentración de 400 ppm sobre frutos de mango var. Hilaza (*in vivo*), inoculados con las cuatro cepas morfoespecies de *Colletotrichum* spp., obteniendo porcentajes de control de la enfermedad de 42, 89, 91 y 92%; el extracto fue caracterizado químicamente con metodologías de FT-IR y CLAE-EM identificando la posible presencia del lipopéptido Bacilomicina D de la familia iturinas, como responsable de la actividad antifúngica. Finalmente, se evaluó la citotóxicidad y ecotoxicidad de dicho extracto a las concentraciones evaluadas en las pruebas *in vivo* y los resultados sugieren que son un recurso prometedor para el desarrollo de bioplaguicidas respetuosos con el medio ambiente y seguros para el consumidor.

**Palabras Claves:** Biocontrol, Metabolitos secundarios, Lipopéptidos, Bacterias Marinas, Antracnosis.

---

## ABSTRACT

Anthracnose is one of the most important postharvest diseases caused by fungi of the *Colletotrichum* spp. genus. In mango, large losses attributed to the symptoms on the surface of the fruit that deteriorate the quality are estimated, interfering with its trade. The current management of the disease consists of the frequent application of synthetic chemical fungicides, but the intensive use of chemicals to control pests and diseases in the field has disturbed the ecological balance of the microorganisms present in the habitat, giving rise to the development of resistant pathogenic strains, environmental contamination, and risks to human health associated with toxicity. According to the last, it has become necessary to develop alternative strategies, such as biological control. Marine microorganisms are currently considered a source of new antimicrobial substances because they are forced to develop mechanisms to compete for space and access nutrients in the extreme environments where they live. In this sense, the aim of this research was to evaluate metabolites produced by six marine bacteria against four strains of *Colletotrichum* spp. For this, an initial screening for the antifungal activity was made (*in vitro*) exposing each one of the marine bacteria against the four *Colletotrichum* spp. It was obtained mycelial inhibition percentages of 40, 24, and 21% in presence of the bacteria *Bacillus velezensis* INV FIR 31, *Bacillus* sp. INV FIR48, and *Bacillus safensis* INV FIR26 respectively. Later, the extract BS57 from the Bacterium INV FIR 31 was produced and exposed to mango fruits var Hilaza, which were previously inoculated with the four *Collectotrichum* strains, obtaining percentages of control disease of 42, 89, 91, and 92%. The extract was chemically characterized using FTIR and HPLC-MS techniques indicating the possible presence of Bacillomycin D, a lipopeptide of the iturin family as the responsible for the antifungal activity. Finally, was evaluated the cytotoxicity and the ecotoxicity of the extract BS57 at the same concentration evaluated *in vivo*, the results suggest it is a promising resource for the development of biopesticides effective, environmentally friendly and safe for the consumer.

**Keywords:** Biocontrol, Secondary Metabolites, Lipopeptides, Marine Bacteria, Anthracnose

# Contenido

|  | <b>Pág.</b> |
|--|-------------|
| Resumen  | 6           |
| Contenido  | 8           |
| Lista de figuras   | 9           |
| Lista de tablas  | 10          |
| Lista de símbolos y Abreviaturas   | 11          |
| Introducción   | 1           |
| 1. Evaluación de metabolitos secundarios provenientes de bacterias marinas para el control biológico de <i>Colletotrichum</i> spp. causante de Antracnosis en mango. | 6           |
| 2. Producción y caracterización química parcial de metabolitos de la bacteria de origen marino <i>Bacillus velezensis</i> INV FIR31                                  | 38          |
| 3. Evaluación de la toxicidad del extracto BS57 obtenido de la bacteria marina <i>Bacillus velezensis</i> INV FIR31  | 60          |
| Conclusiones   | 72          |
| Anexo A: Descripción de los microorganismos evaluados.   | 74          |
| Anexo B: Evaluación de Viabilidad bacteriana usando el extracto de la bacteria marina <i>Bacillus velezensis</i> INV FIR31   | 81          |
| Anexo C: Consentimiento informado ensayo de citotoxicidad (Prueba de hemólisis)  | 85          |
| Anexo D: Análisis estadísticos.  | 88          |

---

## Lista de figuras

**Figura 1.** Screening antifúngico de seis bacterias marinas frente a cuatro especies del hongo fitopatógeno *Colletotrichum spp.*

**Figura 2.** Actividad antifúngica de la bacteria de origen marino *Bacillus velezensis* (INV FIR31) . A. *Colletotrichum tropicale* (C003), B. *Colletotrichum gloeosporioides* (C004), C. *Colletotrichum karstii* (C013), D. *Colletotrichum asianum* (C021)

**Figura 3.** A. Frutos de mango variedad Hilaza, usados para la evaluación de patogenicidad. B. Extracto BS57. .

**Figura 4.** Porcentajes de control de antracnosis con DMSO1% y BS57 en frutos de mango variedad Hilaza .

**Figura 5.** Desarrollo de antracnosis en frutos de mango variedad Hilaza inoculados con cuatros especies diferentes de *Colletotrichum spp.* con dos tratamientos. Dimetilsulfóxido (DMSO 1%) y extracto de la bacteria marina *Bacillus Velezensis* (BS57)

**Figura 6.** Espectroscopía Infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) en modalidad ATR del extracto BS57

**Figura 7.** Cromatograma (TIC) del extracto BS57, por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (CLAE-EM)

**Figura 8.** Análisis SIM (Select Ion Monitoring) del ion m/z 1059,57 del extracto BS57 obtenido de la bacteria marina *Bacillus velezensis* INV FIR31.

**Figura 9.** Análisis termogravimétrico del extracto BS57.

**Figura 10.** Procedimiento del ensayo de ecotoxicidad. A. Nauplios de *Artemia franciscana*. B. Conteo de nauplios bajo esteromicroscopio.

# Lista de tablas

**Tabla 1.** Bacterias de origen marino \*Museo de Historia Natural Marina de Colombia- Makuriwa

**Tabla 2.** Hongos asociados a antracnosis y virulencia de cada aislamiento.

**Tabla 3.** Bacterias de origen marino del género *Bacillus* spp.

**Tabla 4.** Identificación de principales grupos de genes de biosíntesis de metabolitos secundarios presentes en cuatro bacterias del género *Bacillus* spp.

**Tabla 5.** Compuestos identificados del extracto BS-57 con la plataforma Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS).

**Tabla 6.** Rangos de toxicidad

**Tabla 7.** Hemólisis del extracto BS57

---

## Lista de símbolos y Abreviaturas

| Símbolo | Significado  |
|---------|--|
| ADE     | Agua Destilada Estéril   |
| ARN     | Ácido ribonucleico   |
| BH      | Bushnell Haas / Medio de cultivo   |
| BBCH    | Biologische Bundesan- talt, Bundessortenamt und Chemische Industrie / Agencia Federal de Biología, Oficina Federal de Variedades Vegetales e industria química |
| CDPS    | Cyclodipeptides Synthases/ Ciclodipeptidos Sintetasas dependientes de ARN  |
| CLAE-EM | Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia- Espectrometría de Masas  |
| CLP     | Lipopéptidos cíclicos  |
| cm      | centímetro   |
| DKPs    | Diketopiperazine/ Diketopiperazinas  |
| DL50    | Dosis Letal media  |
| DMSO    | Dimetilsulfóxido   |
| EA      | Electro aspersion  |
| ESI-MS  | Electrospray ionization mass spectrometry/ espectrometría de masas por ionización por electropulverización   |
| FAO     | Food and Agriculture Organization of the United Nations / La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura                         |
| FT-IR   | Fourier-transform infrared spectroscopy / Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier  |
| GNPS    | Global Natural Products Social Molecular Networking / Base de datos y plataforma para análisis de datos obtenidos de CLAE                                      |
| h       | horas  |

|        |  |
|--------|--|
| HCL    | Ácido clorhídrico  |
| ISR    | Induced Systemic Resistance/ resistencia sistémica inducida  |
| kV     | kilovoltio   |
| LC-MS  | Cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masas   |
| LPs    | Lipopéptidos   |
| M      | Molar  |
| m/z    | relación masa carga es una magnitud física usada en la electrodinámica de las partículas cargadas. |
| mg     | miligramo  |
| MHNMC  | Museo de Historia Natural Marina de Colombia – Makuriwa  |
| min    | minutos  |
| MIP    | Manejo Integrado de Plagas   |
| ml     | mililitro  |
| mm     | milímetro  |
| MS     | Metabolitos Secundarios  |
| NCBI   | National Center for Biotechnology Information  |
| nm     | nanómetro  |
| NRPS   | Non Ribosomal Peptide Synthetases/ Sintetasas peptídicas no ribosomales                            |
| °C     | Grados Centígrados   |
| ORF    | Open Reading Frame / Marcos abierto de lectura   |
| PBS    | Phosphate Buffered Saline /Tampón fosfato salino   |
| PDA    | Papa dextrosa Agar/ Agar papa dextrosa   |
| PGPR   | Plant Growth Promoting Rhizobacteria/ Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal             |
| pH     | potencial de hidrógeno   |
| PKS    | Polyketide Synthase/ Policétido sintasa  |
| ppm    | partes por millón  |
| ppt    | Partes por mil   |
| Refseq | The Reference Sequence /Base de datos de secuencias de referencia                                  |
| RFC    | Relative Centrifugal Force / Fuerza centrífuga relativa  |

---

|              |  |
|--------------|--|
| rpm          | revoluciones por minuto  |
| RT           | Retention Time/ Tiempo de retención  |
| SIM          | Select Ion Monitoring / monitoreo de ion seleccionado                          |
| skf          | Sporulation Killer Factor/ Factor de muerte por esporulación                   |
| T1PKS        | Polyketide Synthase Type 1/ Policétido sintasa Tipo 1                          |
| T2PKS        | Polyketide Synthase Type 2/ Policétido sintasa Tipo 2                          |
| T3PKS        | Polyketide Synthase Type 3/ Policétido sintasa Tipo 3                          |
| TGA          | Thermogravimetric analysis / Análisis termogravimétrico                        |
| trans-AT PKS | Ruta biosintética de PKS, caracterizada por tener un dominio acetiltransferasa |
| UFC          | Unidades Formadoras de Colonia   |
| ul           | microlitro   |
| um           | micrómetro   |
| VOCs         | Volatile Organic Compounds /Compuestos volátiles orgánicos                     |
| ZmA          | zwittermicina A  |



## Introducción

El cultivo de mango *Mangifera indica* L, originariamente de la India, es uno de los cultivos tropicales más importantes de las especies frutícolas en el mundo, está presente en al menos 90 países, es apetecido por su contenido nutricional, sus características organolépticas y la variedad de subproductos que pueden obtenerse de él, como pulpas, mermeladas, trozos deshidratados o como ingrediente principal de cócteles de frutas, yogurt y helados (Villanueva, 2016).

El Ministerio de Agricultura reportó un área 27.952 hectáreas cultivadas en Colombia a lo largo de 16 departamentos y una producción estimada de 321.000 toneladas de mango para el año 2018, siendo Cundinamarca, Tolima y Magdalena los principales departamentos productores (AGRONET, 2018). El comercio de mango colombiano tiene tres nichos definidos: Primero la exportación de producto procesado, segundo la comercialización interna de producto fresco y procesado y un tercer mercado interno en crecimiento de mango verde fresco (Asohofrucol y Corpoica 2013); todas las posibilidades de comercialización giran en torno a calidad del producto, que puede afectarse fácilmente por la presencia de patógenos que alteren el normal desarrollo de la fisiología del fruto.

Existen diversas enfermedades que afectan el cultivo de mango, pero la Antracnosis reviste mayor importancia ya que se le atribuyen pérdidas entre el 40 y 50% de la cosecha (Páez, 2003; Noriega *et al.*, 2014). Es una enfermedad que invade las inflorescencias, frutos, hojas y tallo del mango, cuyos síntomas alteran directamente la calidad del fruto y perjudican su comercialización. La Antracnosis en mango es causada por hongos del género *Colletotrichum* spp., entre ellas *C. asianum*, *C. cliviicola*, *C. cordylinicola*, *C. endophytica*, *C. fructicola*, *C. gigasporum*, *C. gloeosporioides*, *C. karstii*, *C. liaoningense*, *C. musae*, *C. scovillei*, *C. siamense*, *C. tropicale* y *C. dianesei* (Lima *et al.*, 2013; Gañan *et al.* 2015; Li *et al.*, 2019; Quintero-Mercado *et al.*, 2019). El ciclo biológico de Antracnosis incluye: i) disposición, ii) adhesión, iii) germinación, donde se desarrolla el tubo germinativo, iv) formación del apresorio, en este paso también se evidencia un engrosamiento y melanización del apresorio, v) penetración, y vi) colonización (Agrios, 2005; De Silva, *et al.*, 2017). La quiescencia es una característica importante del hongo causante de esta enfermedad, que consiste en un estado de dormancia en la que el patógeno inhibe su desarrollo por condiciones impuestas por el hospedero donde se han

identificado tres eventos que explican la quiescencia: i) la presencia de compuestos antifúngicos preformados que disminuyen en la maduración de los frutos ii) compuestos antifúngicos inducibles, y iii) la falta de activación de factores de patogenicidad fúngica durante la maduración de la fruta (Prusky et al., 2013).

Las lesiones se desarrollan inicialmente en los tejidos jóvenes pero en hojas maduras suelen cambiar a un estado asintomático, en frutos sin embargo se evidencia que pierde este estado de latencia por los cambios fenológicos (madurez) (Akem, 2006; Quintero-Mercado et al., 2019). En los frutos se desarrollan lesiones hundidas, acuosas y de color negro o café, que en estados avanzados muestran acérvulos. Las lesiones de los frutos suelen ser poco profundas y afectan solo a la piel, pero en condiciones favorables las lesiones se extienden hasta la pulpa, estos síntomas en consecuencia demeritan la calidad de los frutos. Holguer *et al.* (2015) y Nelson (2008) reportan que algunas cepas del patógeno pueden causar grietas en la epidermis del fruto que provocan el efecto de piel de cocodrilo.

El manejo integrado de la enfermedad incluye además de prácticas culturales (Holguer et al., 2015), un componente químico que se fundamenta en la aspersión programada de fungicidas sintéticos durante la etapa de producción, iniciando en floración cuando las panículas tienen varios cm de largo, antes de la apertura floral y hasta que los frutos estén pintones; esto puede significar entre 8 y 12 aspersiones (Páez, 2003), entre los compuestos más conocidos se encuentran los ditiocarbamatos, benzimidazoles, como benomil y carbendazim que brindaron un excelente control antes de que se desarrollara resistencia en el hongo por su uso excesivo en pre y poscosecha (Akem 2006), el clorotalonil, que es efectivo pero fitotóxico, los triazoles, los imidiazoles, los fungicidas basados en cobre que no son usualmente muy efectivos a menos que sean aplicados con otros fungicidas (Ploetz 2002) y las estrobilurinas que deben ser utilizadas con moderación ya que son susceptibles al desarrollo de resistencia por parte del patógeno (Akem 2006). El manejo químico de la Antracnosis, resulta costoso por el valor del producto, el número de aplicaciones, equipos y personal que realiza la labor, sus residuos son perjudiciales para el agroecosistema y para la salud humana, por ello, muchos países han adoptado normas que restringen su uso, por lo que se hace necesario implementar estrategias efectivas y de bajo impacto ambiental.

---

El control biológico incluye el uso de productos naturales que afectan el inicio o desarrollo de una enfermedad en un cultivo, actuando sobre el patógeno o induciendo resistencia sistémica en las plantas frente a los patógenos; un ejemplo de esto, es el uso reciente de recubrimientos en frutos de mango con quitosano o propóleo (Jongsri et al., 2017; Mattiuz et al., 2015). Algunas de las estrategias de control biológico presentan ventajas por su menor costo de producción en relación a productos de síntesis química e incluso podrían tener un mayor potencial fungicida que estos, como se ha comprobado con el uso de aceites esenciales contra *C. asianum*, *C. dianesei*, *C. fructicola*, *C. gloeosporioides*, *C. tropicale* y *C. karstii*, en el que el producto natural tuvo un desempeño similar que el fungicida químico tiofanato metílico y difenoconazol (Ali et al., 2018; De Oliveira et al., 2017; Rabari et al., 2018)

Por otro lado, el control biológico también hace referencia al uso de microorganismos antagonistas, los cuales están presentes en diversos ambientes y son considerados una alternativa sostenible para el manejo de las problemáticas fitosanitarias, estos son conocidos como biocontroladores y utilizan diversos mecanismos, como: 1) competencia de espacio y nutrientes, 2) producción de compuestos antimicrobianos, como enzimas y péptidos extracelulares, y 3) emisión de compuestos orgánicos volátiles antimicrobianos, que inciden directamente en los fitopatógenos (Morales-Cedeño et al., 2021). En los últimos 20 años se han realizados diversas investigaciones sobre el control biológico de Antracnosis en mango, con el fin de identificar potenciales microorganismos biocontroladores e identificar sus mecanismos de acción, siendo las bacterias el grupo más estudiado, seguido de las levaduras y en menor proporción hongos filamentosos (Díaz-Medina et al., 2019); esto podría deberse en gran parte porque las bacterias poseen la capacidad de secretar enzimas antifúngicas como quitinasas, amilasas, celulasas y proteasas, capaces de degradar componentes importantes de la pared celular de los hongos (Young-Soo et al., 2016). Las bacterias también poseen la capacidad para colonizar diferentes estructuras, atribuida a una velocidad de crecimiento mayor que la de hongos filamentosos que se traduce en una ventaja en la competencia de espacio y nutrientes; se destacan las bacterias del género *Bacillus* spp. que se han reportado como productoras de lipopéptidos antifúngicos, como surfactinas, iturinas y fengycinas (Arroyave-Toro et al., 2017; K. Chen et al., 2020; Ongena & Jacques, 2008).

Actualmente se conocen un millón de compuestos antimicrobianos naturales, 22000 son de origen marino (Manivasagan et al., 2014), siendo los microorganismos marinos una fuente promisoría de nuevas sustancias antimicrobianas, dado que, para sobrevivir en los ambientes extremos que habitan, se ven obligados a desarrollar mecanismos para competir por el espacio y acceder a los nutrientes, como lo es la producción de sustancias extracelulares antagonistas, la cual es una estrategia competitiva que puede inhibir o regular el crecimiento de otra población microbiana, generando así, una respuesta eficiente a los factores de estrés y una ventaja de supervivencia en comparación con aquellos microorganismos que no pueden producirlos (Jensen, 2016).

Los compuestos bioactivos obtenidos de microorganismos marinos no solo han mostrado importancia en aplicaciones biotecnológicas y farmacéuticas, sino que también han aumentado la comprensión de la diversidad de la microbiota marina, las funciones de los ecosistemas y la biología explotable (Zhang et al., 2005). Los microbios marinos han recibido una atención cada vez mayor como fuentes de metabolitos bioactivos y tienen un gran potencial para aumentar el número de productos naturales marinos en ensayos clínicos y otras aplicaciones de tipo industrial. El suministro sostenible y económico de los ingredientes activos a menudo es más fácil de lograr para los compuestos producidos mediante enfoques de fermentación microbiana en comparación con el cultivo de macroorganismos de crecimiento más lento (Waters et al., 2010).

En este sentido, en el sector agroindustrial se han identificado microorganismos marinos como, la levadura *Rhodospiridium paludigenum* para el control del Moho gris en el tomate (Wang et al., 2008, 2011), *Debaryomyces hansenii* que reduce la incidencia y el tamaño de la lesión de Moho en limón mexicano superando el efecto de un fungicida de síntesis química (Hernández-Montiel et al., 2010), además la inhibición de producción de micotoxinas en diferentes hongos filamentosos en granos de maíz (Medina-Córdova et al., 2016) y bacterias principalmente del género *Bacillus* spp. como biocontroladores de *Aspergillus flavus*, *Fusarium graminearum*, *Mucor* sp. y *Alternaria* sp. (Radovanović et al., 2018). Sin embargo, ha sido poca la información con respecto al estudio de microorganismos aislados de ambientes marinos como agentes de control de Antracnosis en el cultivo de mango; en México principalmente se han evaluado los compuestos volátiles orgánicos (VOCs) de la bacteria *Stenotrophomonas rhizophila*, la producción de biomfilms de *B. mojavensis*, *B. firmus*, entre otros microorganismos (Hernandez Montiel et al., 2017;

---

Ortega-Morales et al., 2009; Reyes-Perez et al., 2019), y en Colombia recientemente se han estudiado los VOCs de *Paenibacillus* frente a *C. gloeosporioides* en mango (Coconubo Guio et al., 2020). Los resultados de las evaluaciones *in vitro* e *in vivo* sugieren que las cepas de levaduras y bacterias de origen marino se pueden utilizar como agentes de control biológico eficaces para la Antracnosis en el mango, sin embargo no hay información sobre la evaluación de compuestos extracelulares obtenidos de microorganismos marinos para el control de esta enfermedad en Colombia, y esto es importante teniendo en cuenta los recursos marinos del país, las posibilidades agrícolas en las que se pueden desarrollar tecnología de fácil acceso, efectivas, seguras para el consumidor y amigables con el medio ambiente.

Con base en lo anterior, este trabajo buscó resolver la siguiente pregunta de investigación: ¿Son las sustancias activas provenientes de microorganismos marinos efectivas para el manejo de Antracnosis en frutos de mango?, y se formula cómo hipótesis la posibilidad de que existen ciertas sustancias provenientes de microorganismos marinos capaces de alterar el desarrollo normal de especies del hongo *Colletotrichum* causantes de Antracnosis en frutos de mango. Para comprobar esta hipótesis se planteó como objetivo general, evaluar sustancias activas provenientes de seis bacterias aisladas de ambientes marinos *Bacillus safensis* INV FIR26, *Bacillus velezensis* INV FIR31, *Bacillus* sp. INV FIR35, *Bacillus* sp. INV FIR48, *Pseudoalteromonas* sp. INV PRT33 y *Micromonospora* sp. INV ACT5, para el control del hongo *Colletotrichum* spp. asociado a la Antracnosis en frutos de mango *Mangifera indica* L., con tres objetivos específicos: evaluar la capacidad reguladora (o controladora) de las sustancias obtenidas de microorganismos marinos contra *Colletotrichum* spp., caracterizar parcialmente las sustancias responsables de la actividad antifúngica y evaluar la toxicidad de los compuestos.

# 1. Evaluación de metabolitos secundarios provenientes de bacterias marinas para el control biológico de *Colletotrichum* spp. causante de Antracnosis en mango.

## Resumen

La Antracnosis es una de las enfermedades más importante en poscosecha en frutales tropicales; es causada por hongos del género *Colletotrichum* spp. En el cultivo de mango ocurren grandes pérdidas debido a síntomas en frutos que deterioran su calidad, y limitan su comercialización. El actual manejo de la Antracnosis incluye actividades culturales y la aplicación frecuente de fungicidas de origen químico, ocasionando problemas para el agroecosistema y la salud humana. Adicionalmente, algunas cepas del hongo han desarrollado resistencia a estos compuestos, por lo que se ha hecho necesario desarrollar estrategias alternativas, como lo es el control biológico. En este sentido, el objetivo de esta investigación fue evaluar la capacidad antifúngica de seis bacterias de origen marino contra cuatro morfoespecies de *Colletotrichum*. *Bacillus velezensis* INV FIR 31, *Bacillus* sp. INV FIR48 y *Bacillus safensis* INV FIR26, presentaron los mejores porcentajes de inhibición micelial con valores de 40%, 34% y 21%, respectivamente. Seguidamente, se obtuvo un extracto de origen extracelular a partir de la bacteria INV FIR31 y se evaluó su efectividad directamente sobre frutos de mango variedad Hilaza, que habían sido previamente inoculados con cuatro especies del hongo *Colletotrichum* spp. causante de Antracnosis, presentando porcentajes de control de la enfermedad de 42, 89, 91 y 92%; Adicionalmente se realizó un análisis de genómica comparativa para identificar de manera preliminar los posibles genes responsables de la producción de metabolitos con actividad antifúngica presentes en los géneros de bacterias evaluados.

**Palabras Claves:**

Bacterias Marinas, Poscosecha, Bioprospección, Biocontrol.

**1. Introducción**

La Antracnosis es una enfermedad causada por hongos del género *Colletotrichum* spp. en diversos frutales tropicales y es considerada una de las enfermedades en poscosecha más limitante. En el cultivo de mango se estiman pérdidas del 30 al 60% en condiciones de humedad favorables y temperaturas de 24 a 32°C (Kamble & Kumar, 2016); las pérdidas se deben a las lesiones necróticas que se desarrollan en la superficie del fruto y que deterioran la calidad, afectando directamente su comercialización, lo que hace de la enfermedad una amenaza para la competitividad del sistema productivo del país (Alvarado & Moreno, 2012; Quintero-Mercado et al., 2019). El manejo integrado de la Antracnosis se fundamenta principalmente en prácticas culturales y uso de fungicidas de origen químico para reducir el desarrollo e impacto de la enfermedad. El uso de fungicidas de origen químico es constante; los triazoles, los imidazoles, los ditiocarbamatos, benzimidazoles, los fungicidas basados en cobre y las estrobilurinas, son los más comunes, sin embargo el hongo ha desarrollado resistencia a algunos de estos compuestos, debido a su uso indiscriminado (Akem, 2006; Sharma, 2019).

El manejo químico, resulta ser costoso por el valor del producto, el número de aplicaciones, equipos y personal que realiza la labor, además, los residuos generados son perjudiciales para el agroecosistema y para la salud humana (Belenky et al., 2013; Del Puerto Rodríguez et al., 2014), por lo que muchos países han adoptado normas que restringen su uso (World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2014). Ante un nuevo enfoque de desarrollar nuevas tecnologías agrícolas orientadas hacia el establecimiento de un equilibrio entre tecnología, política, economía y consideraciones ecológicas que no comprometa la salud del consumidor, ni los recursos naturales, los microorganismos presentes en diversos ambientes son considerados una alternativa sostenible para el manejo de las problemáticas fitosanitarias y son conocidos como biocontroladores (Díaz-Medina et al., 2019; Kefialew & Ayalew, 2008). Los microorganismos usados para el control biológico pueden inhibir el crecimiento de

fitopatógenos a través de diferentes mecanismos, estos han sido aislados principalmente del suelo y actualmente hay un grupo de bacterias usadas comercialmente, siendo las bacterias del género *Bacillus* spp. el más importante de ellos (Villarreal-Delgado et al., 2018). Por otro lado, son pocos los productos comerciales de origen marino destinados para el control biológico, y ellos son una fuente promisoría de nuevas sustancias, ya que para acceder a nutrientes y/o, inhibir o regular el crecimiento de otros microorganismos en el ecosistema, producen metabolitos secundarios con actividad biológica, generando así, una respuesta eficiente a los factores de estrés y una ventaja de supervivencia (Jensen, 2016; Kim, 2013).

Se ha estudiado un amplio número de especies microbianas como agentes de control biológico de Antracnosis en mango, siendo las bacterias el grupo más importante y principalmente del filo firmicutes como *B. licheniformis*, *B. mojavensis*, *B. firmus*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. atrophaeus*, *B. velenzensis*, (Alvinda & Acda, 2015a; Govender & Korsten, 2006; Hernandez Montiel et al., 2017; Ortega-Morales et al., 2009; Rajaofera et al., 2018; Reyes-Estebanez et al., 2020; Rungjindamai, 2016; Zheng et al., 2013), señalando que el estudio de microorganismos aislados de ambientes marinos y microorganismos epífitos aislados del mismo cultivo de mango, proporcionan un enfoque novedoso para el manejo integrado de la Antracnosis (Díaz-Medina et al., 2019).

Identificar los genes involucrados en actividades biológicas de un organismo es importante para conocer el principio o mecanismo de biocontrol; por ello, las herramientas bioinformáticas representan una ventaja ya que permiten hacer observaciones *in silico* sobre los genomas bacterianos de manera rápida (Montoya Solano et al., 2006). La predicción de genes es una de las metodologías que busca a través de algoritmos, ya sea por estrategias de homología o estrategia *ab initio* construir modelos probabilísticos que identifiquen genes funcionales en las secuencias de nucleótidos a partir de marcos abiertos de lectura (ORF). antiMASH es una plataforma que integra diversos análisis para obtener resultados robustos sobre genes asociados específicamente a la producción de metabolitos secundarios (MS). Entre los tipos de genes principales se encuentran los que traducen para las poliketidos sintetasas (PKS), un complejo multienzimático que biosintetiza poliketidos que están clasificados en tres tipos T1PKS, T2PKS, T3PKS, cuya diferencia radica en la longitud de la proteína resultante. Otro cluster es el de sintetasas

peptídicas no ribosomales (NRPS), independientes del ARN mensajero. Cada sintetasa de péptidos no ribosomales es capaz de sintetizar únicamente un tipo de péptido (Schwarzer et al., 2003). Por otra parte los péptidos no ribosomales a menudo poseen una estructura cíclica y/o ramificada y pueden contener otros aminoácidos no proteinogénicos, ambos grupos son reconocidos por el amplio espectro de actividades biológicas y este análisis permite de manera rápida identificar preliminarmente los genes involucrados en la respuesta antifúngica de las bacterias evaluadas.

En este contexto el objetivo de esta investigación fue evaluar a nivel *in vitro* y sobre frutos, la actividad antifúngica de sustancias provenientes de seis bacterias aisladas de ambientes marinos contra cuatro especies del hongo *Colletotrichum*. causante de la Antracnosis en mango, e identificar por medio de herramientas bionfórmáticas los posibles metabolitos secundarios involucrados en la actividad antifúngica.

## **2. Materiales y Métodos**

### **Obtención de Cepas Microbianas**

Las cepas microbianas evaluadas fueron previamente aisladas de ambientes marinos, identificadas molecularmente y se encuentran conservadas en el museo de historia natural marina de Colombia – Makuriwa (MHNMC) ubicado en INVEMAR sede Santa Marta. En la tabla 1 se listan las seis bacterias usadas para la evaluación antifúngica y que se encuentran incluidas en el contrato de acceso a los recursos genéticos y sus productos derivados No. 123 expediente 158-6 otorgado al INVEMAR por el Ministerio Del Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible De Colombia.

Tabla 1. Bacterias de origen marino \*Museo de Historia Natural Marina de Colombia-Makuriwa

| Bacteria                     | Número Catálogo | Código GenBank |
|------------------------------|-----------------|----------------|
|                              | MHNMC*          |                |
| <i>Bacillus safensis</i>     | INV FIR26       | MG271959       |
| <i>Bacillus velezensis</i>   | INV FIR 31      | MG271962       |
| <i>Bacillus</i> sp.          | INV FIR35       | MG271968       |
| <i>Bacillus</i> sp.          | INV FIR48       | MK129309       |
| <i>Pseudoalteromonas</i> sp. | INV PRT33       | MK129336       |
| <i>Micromonospora</i> sp.    | INV ACT5        | MK129361       |

Las cepas patogénicas del hongo *Colletotrichum* fueron obtenidas de aislamientos en cultivos de mango en investigaciones anteriores del Laboratorio de Fitopatología de la Universidad del Magdalena. Estas cepas se encuentran asociadas al desarrollo de Antracnosis en mango, están caracterizadas biológicamente e identificados molecularmente (Páez, 2021, publicación en proceso) (Tabla 2).

Tabla 2. Especies de *Colletotrichum* asociadas a Antracnosis en mango y virulencia.

| Hongo                                 | Código | Virulencia |
|---------------------------------------|--------|------------|
| <i>Colletotrichum tropicale</i>       | C003   | Alta       |
| <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> | C004   | Alta       |
| <i>Colletotrichum karstii</i>         | C013   | Moderada   |
| <i>Colletotrichum asianum</i>         | C021   | Muy alta   |

## 2.1 Screening Antifúngico

Se cultivaron las diferentes cepas del hongo fitopatógeno en placas de Agar Papa Dextrosa (PDA) a  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  durante siete días. Con un sacabocados estéril se tomaron de la periferia del cultivo fúngico en crecimiento activo discos de agar de 5 mm, y se transfirieron al centro de nuevas placas con medio y se incubaron a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  hasta que la colonia del hongo alcanzó un diámetro de 5 mm. Luego se tomaron 10 uL de una suspensión de cada bacteria ajustada a una concentración 0,5 en estándar McFarland ( $1 \times 10^8$  UFC.  $\text{mL}^{-1}$ ) para ser inoculados en cuatro puntos equidistantes de la caja. Como control se usó agua destilada estéril (ADE). Estas placas se incubaron a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  y se registró el crecimiento radial de cada hongo durante siete días.

El porcentaje de inhibición del crecimiento se determinó de acuerdo a la fórmula:

$$I = ((C - T)/C) * 100$$

Donde:  $I$  corresponde al porcentaje de Inhibición del micelio,  $C$  es el crecimiento del micelio en control negativo y  $T$  es el crecimiento del micelio en el tratamiento. Cada tratamiento y control se evaluó por triplicado.

## 2.2 Obtención del extracto BS57

Se ajustó una suspensión de la bacteria *Bacillus velezensis* INV FIR31 activa metabólicamente, tomando una parte de la colonia bacteriana de la caja Petri y transfiriendo con un asa estéril al medio de cultivo Bushnell-Haas (BH) para ser homogenizado vigorosamente en vortex por 10 minutos, se midió la turbidez usando el espectrofotómetro a 600 nm y ajustando al patrón de McFarland 0.5 que corresponde aproximadamente a una suspensión de  $1.5 \times 10^8$  células bacterianas por ml.

Esta suspensión se inoculó en frascos de Erlenmeyer de 500 ml con 125 ml de caldo Bushnell-Haas con melaza de caña al 1%, adicionando 5 ml de inóculo correspondiente al 4% de la suspensión en la que se inoculó y se incubó a  $30^\circ\text{C}$  con agitación constante de 140 rpm durante 24 h, después de este tiempo el cultivo fue centrifugado a  $4^\circ\text{C}$  durante 12 min a 10824 RCF en una centrifuga marca Hettich Universal 320 R serie 0640-03-00 con el fin de obtener el sobrenadante libre de células. El cual, seguidamente se sometió a

precipitación ácida usando ácido clorhídrico (HCl 6 M), hasta alcanzar un pH 2,0 y se almacenó a 4°C, durante 24 h.

El precipitado fue recolectado por centrifugación a 4°C durante 30 min a 10824 RCF, se resuspendió en una solución HCl 0.1 M, se agitó con vórtex por 5 min y se centrifugó a 4°C durante 30 min a 10824 RCF, se retiró el sobrenadante y al pellet se le agregó agua destilada, ajustando a un pH básico (8,0), posteriormente esta suspensión se liofilizó.

Finalmente, el producto seco se disolvió en una mezcla de cloromo:metanol (65:15), se filtró usando filtro Wathman N°4 y el filtrado se concentró a presión reducida usando el rotavaporador Marca Heidolph (serie 101108307) para obtener el extracto orgánico

El Agar Bushnell Haas se preparó según la fórmula original (Bushnell & Haas, 1941). Este medio contiene todos los nutrientes excepto una fuente de carbono, así que se consideró la melaza de caña por ser un residuo agroindustrial de bajo costo y que posee una alta cantidad de sacarosa, glucosa, dextrosa y fructosa. Por otro lado el sulfato de magnesio ( $MgSO_4$ ), el cloruro cálcico ( $CaCl_2$ ) y el cloruro férrico ( $FeCl_3$ ) proveen a la bacteria de oligoelementos; el fosfato diamónico ( $(NH_4)_2HPO_4$ ) es la fuente de nitrógeno mientras que el fosfato monopotásico ( $KH_2PO_4$ ) es el tampón o buffer del medio, la metodología fue seleccionada de acuerdo a las características de los metabolitos de interés identificados en el análisis bioinformático (numeral 2.4).

### **2.3 Evaluación de capacidad biocontroladora**

Los frutos de mango variedad Hilaza fueron obtenidos del municipio de Ciénaga, en estado fenológico 709 de acuerdo a la escala BBCH, descritos como “fruto del tamaño de una variedad estándar, hombros completamente desarrollados, pulpa de color verde cremoso” (Hernández Delgado et al., 2011), fueron llevados al Laboratorio de Fitopatología de la Universidad del Magdalena en una nevera de poliestireno previamente desinfectada. Los frutos fueron lavados con abundante agua corriente, agua destilada y fueron desinfectados con alcohol etílico al 70%, y posteriormente se secaron con papel absorbente.

Se preparó el inóculo haciendo un raspado suave con agua destilada estéril y tween 80 al 1% sobre la caja Petri con medio PDA en cada uno de los hongos a los siete días de crecimiento, se filtró cada suspensión para eliminar el micelio y se ajustó a una

concentración de  $1 \times 10^5$  usando la cámara de Neubauer, equivalente a 100.000 conidios por ml de suspensión.

Se evaluaron tres tratamientos, 1) el extracto BS57 a 400 ppm, 2) DMSO al 1% (v/v) como control del solvente en el que estaba diluido el extracto y 3) Agua destilada estéril (ADE) como control positivo. En la cámara de flujo laminar se tomaron tres frutos por cada tratamiento y se sumergieron durante 30 minutos en un beaker con 300 ml de cada uno de los tratamientos, después se dejaron secar durante cinco minutos sobre una gradilla estéril y fueron inoculados depositando una microgota (10 uL) de suspensión de conidias en tres puntos equidistantes cerca al pedúnculo. Los frutos fueron transferidos a cámaras húmedas y se incubaron durante 8 días a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ .

La capacidad de biocontrol del extracto se calculó con base en el porcentaje de área afectada (lesión necrótica característica de Antracnosis) en cada fruto inoculado, para lo cual al octavo día después de la inoculación se realizó un registro fotográfico para cuantificar el área total del fruto y el área afectada. La efectividad en el control de enfermedad se estimó según la fórmula de Abbott (Abbott, 1925):

$$\begin{aligned} & \text{Control de la enfermedad (\%)} \\ & = \left[ \frac{(\% \text{ área afectada del control positivo} - \% \text{ área afectada del tratamiento})}{\% \text{ área afectada del control positivo}} \right] * 100 \end{aligned}$$

Las fotografías fueron procesadas por el programa de licencia libre Image J versión 1.52p.

#### **2.4 Análisis de predicción de genes en bacterias**

Se realizó una búsqueda de secuencias de genomas completos de bacterias del género *Bacillus* en Refseq (Reference Sequence), una base de datos curada de nucleótidos mantenida por el NCBI, ya que de acuerdo al screening inicial, este género presentó producción de metabolitos extracelulares antifúngicos y usando la plataforma antiSMASH (versión 5.1.2) se identificaron, mediante anotación funcional, genes biosintéticos relacionados con la producción de metabolitos secundarios (evaluación *in silico*).

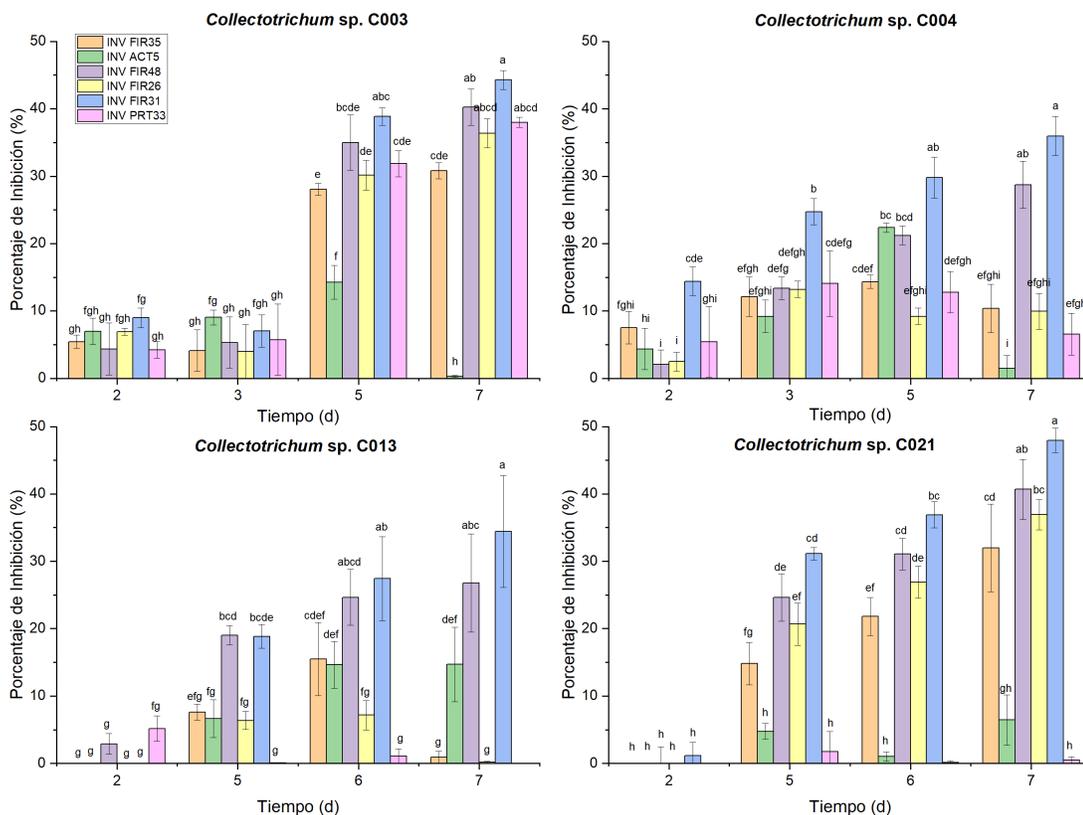
#### **2.5 Análisis estadístico**

Todos los resultados se expresaron como los valores promedio de los datos obtenidos en cada réplica. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de la Prueba Post Hoc Tukey para determinar las diferencias entre las medias de los tratamientos empleando el programa R (R version 4.0.3 (2020-10-10), R Foundation for statistical computing) para realizar las figuras se empleó el programa Origin (Origin, Version 2021. OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA)..

### **3. Resultados**

#### **3.1 Screening Antifúngico**

Los resultados del screening mostraron que a los 7 días, las bacterias INV ACT5, INV PRT33, INV FIR35 presentaron menor capacidad inhibitoria sobre las cepas del hongo, con porcentajes promedio de 4, 12 y 19% respectivamente (Figura 1). Por el contrario, las bacterias INV FIR31, INV FIR48 e INV FIR26 presentaron las mejores actividades de inhibición de crecimiento micelial en el día siete de evaluación con porcentajes promedio de 40, 34 y 21% respectivamente.



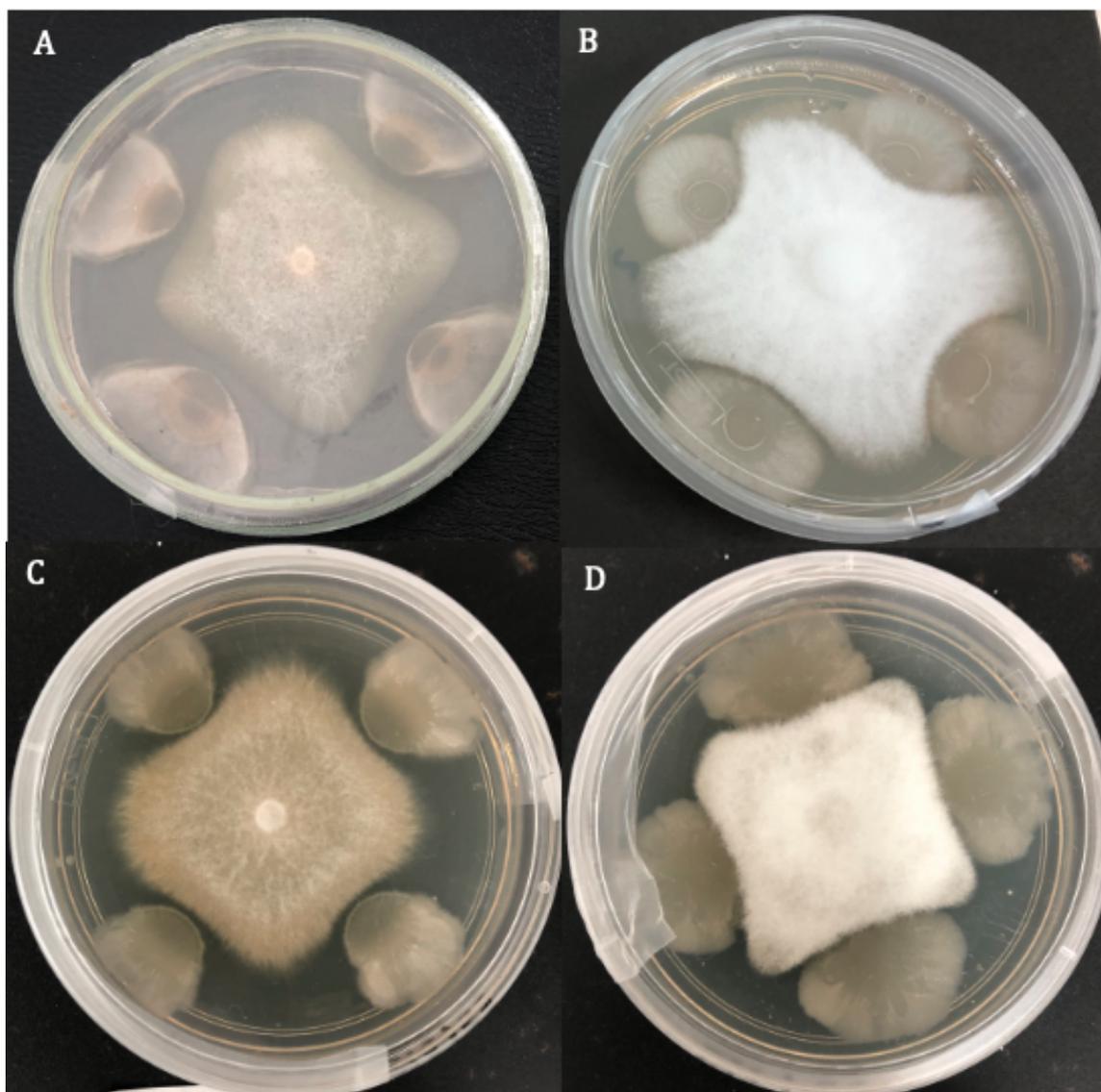
**Figura 1.** Screening antifúngico de seis bacterias marinas frente a cuatro especies del hongo fitopatógeno *Colletotrichum* spp.

La inhibición de crecimiento radial es notable desde el segundo día de crecimiento para las especies del hongo C003 y C004. En el día 7 de evaluación, la cepa C003 presentó sensibilidad a cinco de las bacterias marinas evaluadas, a excepción de la bacteria INV ACT5 que sólo inhibió 0,31%. La cepa C004 fue sensible a las bacterias, pero con valores de inhibición de 1,48, 6,56, 9,96 y 10,38% para las bacterias INV ACT5, INV PRT33, INV FIR26 y INV FIR35, respectivamente. En el caso de la cepa C013, se presentaron valores de inhibición inferiores al 1% en las bacterias INV FIR35, INV FIR26 e INV PRT33. La cepa C021 también fue sensible a cinco de las especies de bacterias; sin embargo, en el caso de INV PRT33 e INV ACT 5 la inhibición en el crecimiento micelial fue de 0,85 y 7,53% respectivamente; las bacterias INV FIR35 e INV FIR 26 inhibieron el crecimiento micelial

de la cepa en 31,97 y 36,92%, respectivamente. Las bacterias INV FIR48 e INV FIR31 fueron estadísticamente superiores a las demás cepas bacterianas para todas las especies de *Colletotrichum*; en el caso de la bacteria INV FIR48 el porcentaje de inhibición fue de 40,24, 28,74, 26,77 y 40,67% para las cepas C003, C004, C013 y C021, respectivamente (Anexo D: Análisis estadísticos), mientras que con la bacteria INV FIR31 se obtuvieron porcentajes de inhibición de 44,29, 35,97, 34,43 y 47,97% para las cepas C003, C004, C013 y C021, en el mismo orden (Figura 1). Los resultados mostraron una susceptibilidad mayor en los primeros dos días de evaluación de las cepas C003 y C004 a todas las bacterias evaluadas en comparación con las cepas C013 y C021, aunque para el día 7 la inhibición fue mayor en las cepas C003 y C021; Cabe destacar, que un estudio desarrollado en la Universidad del Magdalena de la caracterización biológica de las cuatro cepas patógenas de los hongos, logró determinar la virulencia de cada uno, clasificando la cepa C013 como moderada, la cepa C003 y C004 como alta y C021 como muy alta (Páez, 2021, en proceso de publicación), pero no es claro establecer una relación entre virulencia del hongo y la respuesta a los metabolitos antifúngicos producidos por las bacterias de origen marino.

El grupo de las seis bacterias evaluadas fue seleccionado por haber mostrado actividad antimicrobiana frente a patógenos humanos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* y *Pseudomonas aeruginosa* con resultados superiores al 90% de inhibición (Quintero et al., 2018). Sin embargo, en esta evaluación ningún porcentaje superó el 50% de inhibición, lo que plantea mecanismos de interacción diferentes de acuerdo a la naturaleza del blanco biológico.

A pesar de que estadísticamente no hubo diferencias estadísticas en el desempeño biocontrolador entre INV FIR 31 e INV FIR 48, se seleccionó INV FIR 31 identificada molecularmente como *Bacillus velezensis* para continuar con los ensayos posteriores, tomando como criterio el valor numérico más alto en el promedio de los porcentajes de inhibición, además evidenció en la placa un halo de inhibición en la colonia de crecimiento y esto podría significar que los compuestos extracelulares que la bacteria libera al medio estarían impidiendo el crecimiento del hongo (Figura 2).



**Figura 2.** Actividad antifúngica de la bacteria de origen marino *Bacillus velezensis* INV FIR31 . A. *Colletotrichum tropicale* C003, B. *Colletotrichum gloeosporioides* C004, C. *Colletotrichum karstii* C013, D. *Colletotrichum asianum* C021

### 3.2 Obtención del extracto BS57

Se realizaron seis ciclos de cultivo con producto sólido total de 827,2 mg, el extracto de la bacteria INV FIR (BS57) presentó color dorado y de tipo oleoso (Figura 3.B). Para la

realización de los ensayos *in vivo*, el extracto fue disuelto en dimetilsulfoxido (DMSO) al 1%.

### 3.3 Capacidad biocontroladora de extractos de bacteria marina

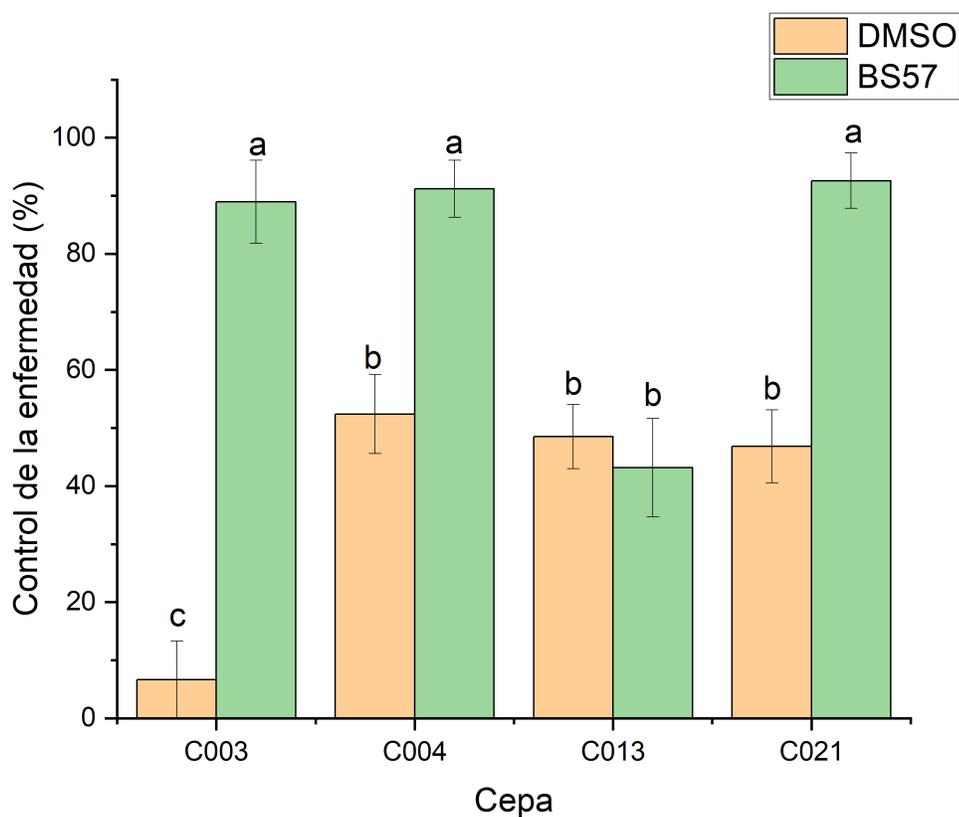
Los frutos recolectados fueron examinados para evitar que tuvieran lesiones ocasionadas por daños mecánicos, insectos u otras enfermedades, se seleccionaron los que cumplieron las características de color, tamaño y peso correspondientes a las descritas para la variedad Hilaza (Asohofrucol & Corpoica, 2013) y la escala fenológica seleccionada (Hernández Delgado et al., 2011) (Figura 3A).



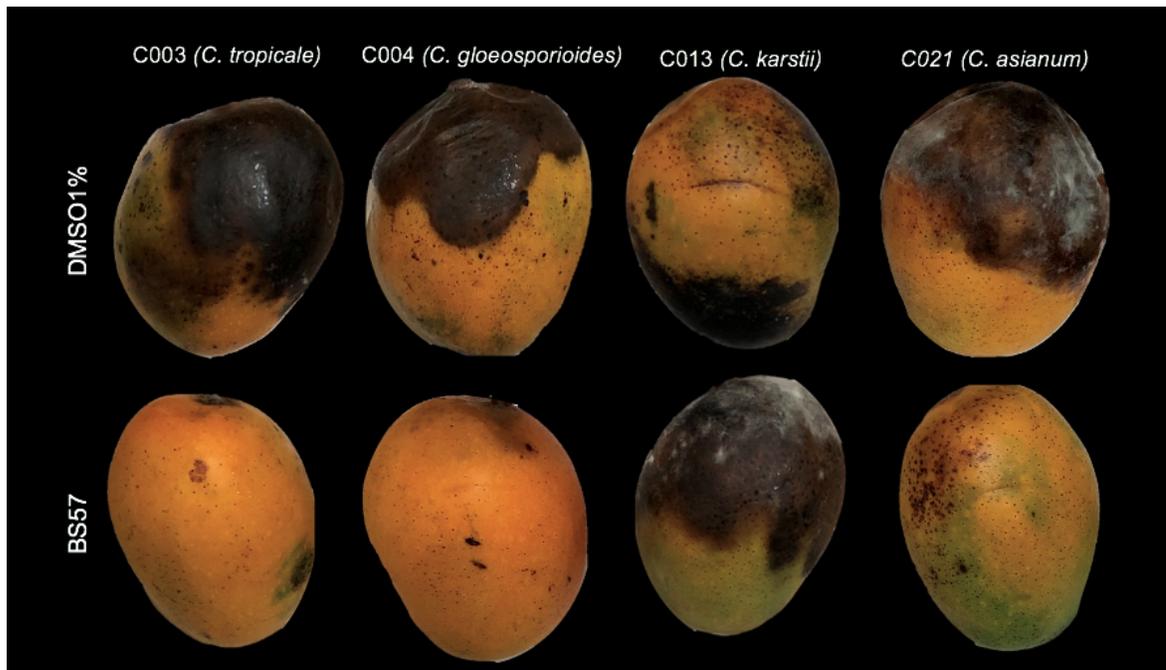
**Figura 3.** A. Frutos de mango variedad Hilaza, usados para la evaluación de patogenicidad. B. Extracto BS57 obtenido a partir de la bacteria *Bacillus velezensis* INV FIR31.

Los resultados *in vivo* evidenciaron que el extracto BS57 presentó porcentajes de control de la enfermedad de 88, 91 y 92%, cuando se asoció a las cepas C003, C004, C021 al día 8 de evaluación respectivamente; para la cepa C013 se obtuvo un porcentaje de control del 43%, siendo estadísticamente similar a lo obtenido con DMSO 1% (48% de control de la enfermedad), que fue evaluado como control del solvente. Con el solvente DMSO 1% Para las cepas C003, C004 y C021 el control de la enfermedad fue de 6, 52 y 46%, respectivamente, siendo estadísticamente diferente a lo obtenido con el extracto BS57 (Figura 4). En el caso de la cepa C013 identificada como *C. karstii* no hay resultados concluyentes sobre el efecto antifúngico que pueda ejercer el extracto BS57, por otra parte,

para las cepas C003 identificadas como, *C. tropicale*, C004 como *C. gloeosporioides* y C021 como *C. asianum* si hay un efecto significativo en el control de la enfermedad, reflejado en menor área con lesiones necróticas a los ocho días después de aplicar el tratamiento con el extracto BS57 (Figura 4).



**Figura 4.** Porcentajes de control de antracnosis obtenidos con DMSO al 1% y el biosurfactante BS57 en frutos de mango variedad Hilaza a una concentración 400 ppm.



**Figura 5.** Desarrollo de antracnosis en frutos de mango variedad Hilaza inoculados con cuatro especies diferentes de *Colletotrichum* spp. con dos tratamientos. Dimetilsulfóxido (DMSO 1%) y extracto de la bacteria marina *Bacillus Velezensis* INV FIR31 a una concentración de 400 ppm (BS57)

### 3.4 Análisis de predicción de genes en bacterias

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se seleccionaron las cuatro bacterias del género *Bacillus* spp. aisladas de ambientes marinos para realizar una búsqueda de las secuencias de genomas completos publicados en bacterias del mismo género en Refseq (Reference Sequence), una base de datos curada de nucleótidos mantenida por el NCBI, se identificó el código de acceso de cada secuencia, el tamaño del genoma y los genes identificados (Tabla 3).

Tabla 3. Bacterias de origen marino del género *Bacillus* spp.

| Cepa de estudio                            | Genoma de referencia                                      | Código de Acceso | Tamaño de genoma (bp*) | Genes |
|--|---|------------------|------------------------|-------|
| <i>Bacillus velezensis</i><br>INV FIR 31   | <i>Bacillus velezensis</i><br>strain CBMB205              | NZ_CP011937.1    | 3929792                | 3,881 |
| <i>Bacillus cf. subtilis</i><br>INV FIR 48 | <i>Bacillus subtilis</i><br>subsp. Subtilis<br>strain 168 | NC_000964.3      | 4215606                | 4,536 |
| <i>Bacillus safensis</i> INV<br>FIR 26     | <i>Bacillus safensis</i><br>strain KCTC                   | NZ_CP018197.1    | 3935874                | 4,067 |
| <i>Bacillus</i> sp.<br>INV FIR 35          | <i>Bacillus pumilus</i><br>strain SH-B9                   | NZ_CP011007.1    | 3787586                | 3,989 |

### 3.2.1 NZ\_CP011937.1 (*Bacillus velezensis*)

El análisis bioinformático identificó 12 regiones con diversos grupos de genes responsables de sintetizar metabolitos secundarios de tipo Bacilicina-bacA (100%), metabolito que también ha sido reportado en la especie *B. amyloquefaciens* y evaluado para el control biológico de bacterias fitopatógenas como *Erwinia amylovora* (Chen et al., 2009) y *Xanthomonas Oryzae* (Wu et al., 2015); un tipo de bacteriocina en el que se reporta el cluster bacilobactina (100%), gen que ha sido asociado a la especie *B. subtilis* (Barbe et al., 2009); tipo policétidos como difcidina (100% de similitud), bacillaeno (100%) y macrolactina H (100%); tipo péptidos no ribosomales (NRPS) como fengicina-fen (100%) y surfactina-srf (82%), ambos metabolitos reportados en *B. amiloquefaciens* y evaluados contra hongos fitopatógenos en los que se evidenció sinergia entre los compuestos para inhibir el crecimiento fúngico (Koumoutsi et al., 2004) de tipo lantipéptidos y tipo terpenos en los que no hay metabolitos aún identificados, de acuerdo a la base de datos usada por la plataforma.

### 3.2.2 NC\_000964.3 (*Bacillus subtilis*)

El análisis identificó 12 agrupaciones de genes capaces de sintetizar metabolitos secundarios de tipo sactipéptidos, como factor de muerte por esporulación-skf-1 (100%) y subtilisina A (100%) ambos reportados en la especie *B. subtilis* (Stein et al., 2004); tipo péptidos no ribosomales como surfactina (82%), fengicina (100%) y bacilobactina (100%); tipo policétido como bacilaeno (100%); tipo glicocina como sublancina 168 (100%) un compuesto antimicrobiano clasificado como lantibiótico (Paik et al., 1998); tipo no clasificado en la región 12, como bacilicina (100%) y agrupaciones de genes de tipo terpeno y ciclodipeptídico sintetas dependientes de tRNA (CDPS) que son una nueva familia de enzimas que usan aminoacil-tRNAs (aa-tRNAs) como sustratos para la biosíntesis de varios ciclodipeptidos precursores de dicetopiperazinas – DKPs (Gondry et al., 2018), una gran clase de productos naturales con actividades biológicas notables entre la antiviral, la antibacteriana y la antifúngica al ser capaz de interactuar y modificar la estructura de la quitina, componente esencial y estructural de la membrana de los hongos (Borthwick, 2012).

### 3.2.3 NZ\_CP018197.1 (*Bacillus safensis*)

El análisis identificó 10 regiones con distintas agrupaciones de genes capaces de sintetizar metabolitos secundarios de tipo sactipéptido como factor de muerte por esporulación (85%); tipo péptido no ribosomales como liquenicina (85%), gen reportado en la bacteria *B. licheniformis* (Veith et al., 2004) y posiblemente heme D(1) (17%) una molécula única de tetrapirrol que sirve como grupo protésico de citocromo cd (1), que reduce el nitrito a óxido nítrico durante el proceso de desnitrificación y cuyo gen asociado fue reportado en la bacteria *Heliobacillus mobilis* (Xiong et al., 2007) grupo híbrido de policétidos de tipo 1 y péptido no ribosomal responsable de metabolizar posiblemente compuestos como zwittermicina A -ZmA (11%) caracterizada en bacterias de *B. cereus* con gran actividad biológica por ser capaz de suprimir fitopatógenos (Kevany et al., 2009); tipo terpeno como carotenoides (50%) cluster reportado en la bacteria *Halobacillus halophilus* (Köcher et al., 2009); tipo belalactona, como fengicina (53%) y otro tipo del cluster bacilobactina (85%).

### 3.2.4 NZ\_CP011007.1 (*Bacillus pumilus*)

El análisis identificó 10 regiones en el genoma con diferentes agrupaciones de genes, de tipo péptido no ribosomal como liquenisina (85%) que es un lipopéptido producido por *B. licheniformis* similar estructuralmente a la surfactina (Veith et al., 2004), pero la diferencia es la presencia de un residuo de glutamilo en la posición 1 de la secuencia de péptidos en lugar de ácido glutámico en la surfactina, esta variable hace de la liquenisina una molécula de mayor poder tensioactivo (Grangemard et al., 2001). Bacilobactina (53%) y zwittermicina A (18%); tipo terpeno, como carotenoide (50%); tipo betalactona como fengicina (53%); tipo bacteriocina con cluster no identificado y otro tipo no clasificado identificado como bacilicina (85%).

Al agrupar los resultados de los principales tipos de genes reconocidos en la plataforma antiMASH por ser responsables de sintetizar metabolitos secundarios, se puede evidenciar cuatro grupos presentes en el genoma de las cuatro bacterias analizadas (Tabla 4), como Sintetasas peptídicas no ribosomales (NPRS), policétido sintasa tipo 3 (T3PKS), Betalactonas y terpenos.

Los metabolitos secundarios producidos por el grupo de sintetasas peptídicas no ribosómicas con actividad antifúngica principalmente corresponden a lipopéptidos cíclicos (CLP). Se ha reportado que las cepas en el grupo *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. velezensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. glycinifermentans* producen fengicina, surfactina y otros lipopéptidos de la familia de la iturina (Dunlap et al., 2013; Karim et al., 2019; Knight et al., 2018), estos difieren en el tipo de ciclación, sustitución de residuos de aminoácidos, longitud y composición de la cadena de ácidos grasos (Falardeau et al., 2013). La fengicina es un antimicótico, la surfactina es uno de los biosurfactantes más potentes y las iturinas producen muchos isómeros con actividad antifúngica potente y de amplio espectro (Ruiz-Sánchez et al., 2016). Se sabe que los bioplaguicidas derivados de especies de *Bacillus* son eficaces contra una amplia gama de fitopatógenos (Fravel, 2005). Por esta razón la actividad antifúngica evidenciada en el screening puede estar atribuida principalmente por metabolitos de tipo lipopéptido.

Tabla 4. Identificación de principales grupos de genes responsables de la síntesis de metabolitos secundarios presentes en cuatro bacterias del género *Bacillus* spp. \*Non Ribosomal Peptide Synthetases/ Sintetasas peptídicas no ribosomales. \*\* Polyketide Synthase Type 3/ Policétido sintasa Tipo 3

| Cluster                    | NRPS* | T3PKS** | Betalactone | Terpene |
|----------------------------|-------|---------|-------------|---------|
| <i>Bacillus velezensis</i> | x     | x       | x           | x       |
| <i>Bacillus subtilis</i>   | x     | x       | x           | x       |
| <i>Bacillus safensis</i>   | x     | x       | x           | x       |
| <i>Bacillus pumilus</i>    | x     | x       | x           | x       |

#### 4. Discusión

Bacterias del género *Bacillus* spp. ofrecen potencialidad como biocontroladores de fitopatógenos, debido a compuestos lipopéptidos como surfactinas, fengicinas, iturinas y bacilomicinas responsables de antibiosis en hongos fitopatógenos (Adeniji et al., 2019; Jin et al., 2020; Luna-Bulbarela et al., 2018; Radovanović et al., 2018), lo que coincide con lo evidenciado en este estudio, donde se pudo observar que hay una interacción de tipo antagonista que restringe el crecimiento de las cuatro cepas de *Colletotrichum* spp. ante la presencia de *B. velezensis* INV FIR31, *B. subtilis* INV FIR48, *B. safensis* INV FIR26 y *Bacillus* sp INV FIR35 bajo condiciones *in vitro*. Los porcentajes de inhibición obtenidos en esta evaluación son similares a los obtenidos por Ortega et al (2009) cuando evaluó especies de *B. mojavensis* y *B. firmus* aislados de ambientes marinos frente a dos especies del hongo *C. gloeosporioides* y *C. fragariae* en PDA registrando porcentajes promedio de inhibición del 30% en diferentes tiempos de inoculación (Ortega-Morales et al., 2009). La respuesta antifúngica también fue similar a lo evaluado por Coconubo Guio et al. (2020) al estudiar el efecto de los VOCs de la bacteria marina del género *Paenibacillus* sp. frente al hongo *C. gloeosporioides* con porcentajes de 33% de inhibición de crecimiento radial al sexto día de evaluación. Radovanović et al., (2018) por su parte también identificaron una especie marina de *Bacillus* sp. filogenéticamente cercana a *B. velezensis* y evaluaron su efecto contra importantes hongos fitopatógenos señalando que la actividad antifúngica era mayor cuando se evaluaba el medio libre de células en comparación a la actividad

---

antifúngica obtenida evaluando las bacterias directamente, lo que destaca la importancia de identificar y aislar los compuestos extracelulares involucrados en la actividad biológica. Devi et al., (2019) señalaron que *B. velezensis* también posee actividad antagónica contra patógenos humanos y otros hongos fitopatógenos; realizando una comparación genómica con la cepa *B. amyloquefaciens*, usada comercialmente para control biológico, evidenció una gran similitud en su capacidad para producir metabolitos secundarios de tipo lipopéptido responsables principalmente de la actividad antifúngica. Estudios genómicos han mostrado que *B. velezensis* es capaz de producir metabolitos antifúngicos y antibacterianos como surfactina, iturina, fengycina, bacilibactina, bacilicina, amilociclicina, ericina, macrolactina, bacilaeno y difficidina (Palazzini et al., 2016). En otro estudio se demostró que producen predominantemente iturina y bacilomicina D (Dunlap et al., 2019), lo que respalda lo observado en el análisis bioinformático de predicción de genes llevado a cabo con la plataforma antiMash, ya que estos péptidos son sintetizados por sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPS) un grupo de enzimas que sintetizan los metabolitos de forma modular pudiendo alcanzar una diversidad y complejidad estructural enorme que los hace muy interesantes a la hora de estudiar nuevas moléculas con actividad biológica (Du & Lou, 2010). Otros estudios señalan la importancia de aplicar metodologías bioinformáticas como la descrita en este estudio para novedosos análisis genómicos sobre el potencial biotecnológico en los microorganismos (Guo et al., 2021; Hifnawy et al., 2020; Majer et al., 2021).

Algunos autores sugieren que la aplicación directa de lipopéptidos presentes en el sobrenadante libre de células podría inhibir completamente la incidencia de Antracnosis en tomate de árbol, mientras que la aplicación de las bacterias alcanza limitar la incidencia de la enfermedad solo en un 76%, (Arroyave-Toro et al., 2017; Fira et al., 2018). En este sentido se evaluó el efecto del extracto obtenido de la bacteria marina *B. velezensis* INV FIR31 sobre frutos de mango variedad Hilaza obteniendo resultados del 88, 91 y 92% en el control de Antracnosis asociada a los aislamientos *C. karstii* C003, *C. gloeosporioides* C004 y *C. asianum* C021 respectivamente, resultados superiores a lo obtenido cuando se utilizó el extracto de la bacteria *B. amyloliquefaciens* para el control de *C. gloeosporioides* en frutos de mango (86%) y naranja (78%), y al obtenido con Mancozeb en mango (85%), un fungicida químico usado para el control de Antracnosis en este cultivo (Alvindhia & Acda, 2015b; Arrebola et al., 2010); en ambos casos se informó que *B. amyloliquefaciens*

produce lipopéptidos de tipo iturina A, a la cual se le atribuyó la actividad antifúngica. En frutos de mango también se ha evaluado el efecto de *B. pumilus* y *B. thuringiensis*, mostrando porcentajes de inhibición de 94 y 87%, respectivamente, atribuido principalmente a compuestos volátiles orgánicos antifúngicos, como 2-nonanona, 2-decanona y  $\beta$ -bencenetanamina (Zheng et al., 2013).

El único estudio reportado para el control biológico de Antracnosis en mango con *B. velezensis* fue realizado en México con resultados del 58% en el control de la enfermedad en condiciones semicomerciales (Reyes-Estebanez et al., 2020), aplicando las bacterias en frutos; sin embargo, las investigaciones mencionadas anteriormente resalta que el efecto antifúngico es superior al utilizar el sobrenadante libre de células ya que allí están presentes los compuestos responsables de inhibir el crecimiento del hongo, como se confirmó en la presente investigación, con valores de control entre 88 y 92%; los resultados de la presente investigación plantean la necesidad de recurrir a técnicas químicas para caracterizar y aislar los compuestos responsables de la actividad antifúngica, para el desarrollo de futuros biofungicidas.

### **Conclusión**

El screening antifúngico con las seis bacterias marinas evaluadas presentó porcentajes de inhibición entre el 4 y 40%, los porcentajes de inhibición de crecimiento observados de la bacteria *B. velezensis* y *B. subtilis* fueron los más altos, presentando un promedio entre el 40% y el 34%.

La evaluación del extracto BS57 producido por la bacteria *B. velezensis* INV FIR31 sobre frutos de mango variedad Hilaza, inoculados con cuatro especies del hongo *Colletotrichum* spp. causante de Antracnosis presentó porcentajes en el control de la enfermedad entre 42 y 92%. Estos resultados constituyen el primer reporte de biocontrol de especies de tres especies de *Colletotrichum* asociadas a cultivos de mango en el departamento del Magdalena.

Las herramientas bioinformáticas permitieron identificar de manera preliminar los genes responsables de la producción de metabolitos secundarios principalmente de tipo

---

lipopéptidos como los responsables de la actividad antifúngica, por esta razón se asumió que dicha actividad se debe a la presencia de estos compuestos.

### Referencias

- Abbott, W. S. (1925). *A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide*. *Journal of Economic Entomology*, 18(2), 265–267. <http://dx.doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>
- Adeniji, A. A., Loots, D. T., & Babalola, O. O. (2019). *Bacillus velezensis*: Phylogeny, useful applications, and avenues for exploitation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(9), 3669-3682. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09710-5>
- AGRONET (2018). Evaluaciones Agropecuarias del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia. Recuperado el 30 de mayo del 2021, de <https://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx?cod=1>
- Akem, C. (2006). Mango Anthracnose Disease: Present Status and Future Research Priorities. *Plant Pathology Journal*, 5(3), 266-273. <https://doi.org/10.3923/ppj.2006.266.273>
- Alvarado, J. R., Moreno, L. A., (2012). Acuerdo de competitividad cadena productiva del mango en colombia. Recuperado el 09 de junio del 2021, de: <https://sioc.minagricultura.gov.co/Mango/Normatividad/004%20-%20D.C.%20-%20Acuerdo%20Competitividad%20Cadena%20Mango.pdf>
- Alvindia, D. G., & Acda, M. A. (2015). The antagonistic effect and mechanisms of *Bacillus amyloliquefaciens* DGA14 against anthracnose in mango cv. 'Carabao'. *Biocontrol Science and Technology*, 25(5), 560-572. <https://doi.org/10.1080/09583157.2014.996738>

- Arroyave-Toro, J. J., Mosquera, S., & Villegas-Escobar, V. (2017). Biocontrol activity of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 cells and lipopeptides against postharvest fungal pathogens. *Biological Control*, 114, 195-200.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.08.014>
- Asohofrucol y Corpoica. (2013). *Modelo Tecnológico para el cultivo del mango en el Valle del alto Magdalena en el Departamento del Tolima*. Recuperado el 31 de mayo del 2021, de <https://sioc.minagricultura.gov.co/DocumentosContexto/S1462-MANGO%20ASOHOFrucOL%20ICA%20CORPOICA.pdf>
- Barbe, V., Cruveiller, S., Kunst, F., Lenoble, P., Meurice, G., Sekowska, A., Vallenet, D., Wang, T., Moszer, I., Médigue, C., & Danchin, A. (2009). From a consortium sequence to a unified sequence: the *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later. *Microbiology (Reading, England)*, 155(Pt 6), 1758–1775.  
<https://doi.org/10.1099/mic.0.027839-0>
- Belenky, P., Camacho, D., & Collins, J. J. (2013). Fungicidal Drugs Induce a Common Oxidative-Damage Cellular Death Pathway. *Cell Reports*, 3(2), 350-358.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.12.021>
- Borthwick, A. D. (2012). 2,5-Diketopiperazines: Synthesis, Reactions, Medicinal Chemistry, and Bioactive Natural Products. *Chemical Reviews*, 112(7), 3641-3716.  
<https://doi.org/10.1021/cr200398y>
- Bushnell, L. D., & Haas, H. F. (1941). The Utilization of Certain Hydrocarbons by Microorganisms. *Journal of bacteriology*, 41(5), 653–673.  
<https://doi.org/10.1128/jb.41.5.653-673.1941>
- Chen, X. H., Scholz, R., Borriss, M., Junge, H., Mögel, G., Kunz, S., & Borriss, R. (2009). Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are

---

efficient in controlling fire blight disease. *Journal of Biotechnology*, 140(1-2), 38-44.  
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.10.015>

Coconubo Guio, L. C., Sinuco León, D. C., & Castellanos Hernández, L. (2020). Fungicidal activity of volatile organic compounds from *Paenibacillus* bacteria against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista Colombiana de Química*, 49(1), 20-25.  
<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v1n49.81996>

Del Puerto Rodríguez, A. M., Suárez Tamayo, S., & Palacio Estrada, D. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52(3). Recuperado el 31 de mayo del 2021, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1561-30032014000300010&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032014000300010&lng=es&tlng=es).

Devi, S., Kiese-walter, H. T., Kovács, R., Frisvad, J. C., Weber, T., Larsen, T. O., Kovács, Á. T., & Ding, L. (2019). Depiction of secondary metabolites and antifungal activity of *Bacillus velezensis* DTU001. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 4(3), 142-149. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2019.08.002>

Díaz-Medina, A. R., Arboleda-Zapata, T., & Ríos-Osorio, L. A. (2019). Estrategias de control biológico utilizadas para el manejo de la antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides* en frutos de mango: Una revisión sistemática. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 22, 595-611. Recuperado el 31 de mayo del 2021, de <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKewj-pNbguvXwAhUdGFkFHcFsCykQFjAAegQIAxAD&url=https%3A%2F%2Fwww.revista.ccba.uady.mx%2Ffojs%2Findex.php%2Ftasa%2Farticle%2Fdownload%2F2699%2F1315&usq=AOvVaw30KDq68AmMBECJSu0EUZDC>

- Du, L., & Lou, L. (2010). PKS and NRPS release mechanisms. *Nat. Prod. Rep.*, 27(2), 255-278. <https://doi.org/10.1039/B912037H>
- Dunlap, C. A., Bowman, M. J., & Rooney, A. P. (2019). Iturinic Lipopeptide Diversity in the *Bacillus subtilis* Species Group – Important Antifungals for Plant Disease Biocontrol Applications. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1794. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01794>
- Dunlap, C. A., Bowman, M. J., & Schisler, D. A. (2013). Genomic analysis and secondary metabolite production in *Bacillus amyloliquefaciens* AS 43.3: A biocontrol antagonist of Fusarium head blight. *Biological Control*, 64(2), 166-175. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.11.002>
- 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>
- Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., & Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*, 285, 44-55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>
- Fravel, D. R. (2005). Commercialization and Implementation of Biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, 43(1), 337-359. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.032904.092924>
- Gondry, M., Jacques, I. B., Thai, R., Babin, M., Canu, N., Seguin, J., Belin, P., Pernodet, J.-L., & Moutiez, M. (2018). A Comprehensive Overview of the Cyclodipeptide Synthase Family Enriched with the Characterization of 32 New Enzymes. *Frontiers in Microbiology*, 9, 46. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00046>

- 
- Govender, V., & Korsten, L. (2006). Evaluation of different formulations of *Bacillus licheniformis* in mango pack house trials. *Biological Control*, 37(2), 237-242. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.11.012>
- Grangemard, I., Wallach, J., Maget-Dana, R., & Peypoux, F. (2001). Lichenysin: A More Efficient Cation Chelator Than Surfactin. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 90(3), 199-210. <https://doi.org/10.1385/ABAB:90:3:199>
- Guo, W., Li, F., Xia, J., & Wang, W. (2021). Complete genome sequence of a marine-derived bacterium *Pseudomonas* sp. SXM-1 and characterization of its siderophore through antiSMASH analysis and with mass spectroscopic method. *Marine Genomics*, 55, 100802. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2020.100802>
- Hernández Delgado, P. M., Aranguren, M., Reig, C., Fernández Galván, D., Mesejo, C., Martínez Fuentes, A., Galán Saúco, V., & Agustí, M. (2011). Phenological growth stages of mango (*Mangifera indica* L.) according to the BBCH scale. *Scientia Horticulturae*, 130(3), 536-540. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.07.027>
- Hernandez Montiel, L. G., Zulueta Rodriguez, R., Angulo, C., Rueda Puente, E. O., Quiñonez Aguilar, E. E., & Galicia, R. (2017). Marine yeasts and bacteria as biological control agents against anthracnose on mango. *Journal of Phytopathology*, 165(11-12), 833-840. <https://doi.org/10.1111/jph.12623>
- Hifnawy, M. S., Fouda, M. M., Sayed, A. M., Mohammed, R., Hassan, H. M., AbouZid, S. F., Rateb, M. E., Keller, A., Adamek, M., Ziemert, N., & Abdelmohsen, U. R. (2020). The genus *Micromonospora* as a model microorganism for bioactive natural product discovery. *RSC Advances*, 10(35), 20939-20959. <https://doi.org/10.1039/D0RA04025H>
- Jensen, P. R. (2016). Natural Products and the Gene Cluster Revolution. *Trends in Microbiology*, 24(12), 968-977. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.07.006>

- Jin, P., Wang, H., Tan, Z., Xuan, Z., Dahar, G. Y., Li, Q. X., Miao, W., & Liu, W. (2020). Antifungal mechanism of bacillomycin D from *Bacillus velezensis* HN-2 against *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 163, 102-107. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.11.004>
- Kamble, M., & Kumar, P. (Eds.). (2016). *Colletotrichum gloeosporioides*: Pathogen of Anthracnose Disease in Mango (*Mangifera indica* L.). En *Current Trends in Plant Disease Diagnostics and Management Practices* (pp. 207-219). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-27312-9\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-27312-9_9)
- Karim, A., Poirot, O., Khatoon, A., & Aurongzeb, M. (2019). Draft genome sequence of a novel *Bacillus* glycinifermentans strain having antifungal and antibacterial properties. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 19, 308-310. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.10.011>
- Kefialew, Y., & Ayalew, A. (2008). Postharvest biological control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) on mango (*Mangifera indica*). *Postharvest Biology and Technology*, 50(1), 8-11. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.03.007>
- Kevany, B. M., Rasko, D. A., & Thomas, M. G. (2009). Characterization of the Complete Zwittermicin A Biosynthesis Gene Cluster from *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(4), 1144-1155. <https://doi.org/10.1128/AEM.02518-08>
- Kim, S.-K. (Ed.). (2013). *Marine Microbiology*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <https://doi.org/10.1002/9783527665259>
- Knight, C. A., Bowman, M. J., Frederick, L., Day, A., Lee, C., & Dunlap, C. A. (2018). The first report of antifungal lipopeptide production by a *Bacillus subtilis* subsp. *Inaquosorum* strain. *Microbiological Research*, 216, 40-46. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.08.001>

- 
- Köcher, S., Breitenbach, J., Müller, V., & Sandmann, G. (2009). Structure, function and biosynthesis of carotenoids in the moderately halophilic bacterium *Halobacillus halophilus*. *Archives of Microbiology*, 191(2), 95-104. <https://doi.org/10.1007/s00203-008-0431-1>
- Koumoutsi, A., Chen, X.-H., Henne, A., Liesegang, H., Hitzeroth, G., Franke, P., Vater, J., & Borriss, R. (2004). Structural and Functional Characterization of Gene Clusters Directing Nonribosomal Synthesis of Bioactive Cyclic Lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* Strain FZB42. *Journal of Bacteriology*, 186(4), 1084-1096. <https://doi.org/10.1128/JB.186.4.1084-1096.2004>
- Luna-Bulbarela, A., Tinoco-Valencia, R., Corzo, G., Kazuma, K., Konno, K., Galindo, E., & Serrano-Carreón, L. (2018). Effects of bacillomycin D homologues produced by *Bacillus amyloliquefaciens* 83 on growth and viability of *Colletotrichum gloeosporioides* at different physiological stages. *Biological Control*, 127, 145-154. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.08.004>
- Majer, H. M., Ehrlich, R. L., Ahmed, A., Earl, J. P., Ehrlich, G. D., & Beld, J. (2021). Whole genome sequencing of *Streptomyces actuosus* ISP-5337, *Streptomyces sioyaensis* B-5408, and *Actinospica acidiphila* B-2296 reveals secondary metabolomes with antibiotic potential. *Biotechnology Reports*, 29, e00596. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00596>
- Montoya Solano, J. D., Suárez Moreno, Z. R., Montoya Castaño, D., & Aristizábal Gutiérrez, F. A. (2006). Análisis bioinformático y predicción de genes en secuencias genómicas de *Clostridium* sp. IBUN22A. *Revista Colombiana de Biotecnología*, VIII(1),57-64. Recuperado el 31 de Mayo de 2021, de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77680106>

- Ortega-Morales, B. O., Ortega-Morales, F. N., Lara-Reyna, J., De la Rosa-García, S. C., Martínez-Hernández, A., & Montero-M., J. (2009). Antagonism of *Bacillus* spp. Isolated from Marine Biofilms Against Terrestrial Phytopathogenic Fungi. *Marine Biotechnology*, 11(3), 375-383. <https://doi.org/10.1007/s10126-008-9152-3>
- Paik, S. H., Chakicherla, A., & Hansen, J. N. (1998). Identification and Characterization of the Structural and Transporter Genes for, and the Chemical and Biological Properties of, Sublancin 168, a Novel Lantibiotic Produced by *Bacillus subtilis* 168. *Journal of Biological Chemistry*, 273(36), 23134-23142. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.36.23134>
- Palazzini, J. M., Dunlap, C. A., Bowman, M. J., & Chulze, S. N. (2016). *Bacillus velezensis* RC 218 as a biocontrol agent to reduce Fusarium head blight and deoxynivalenol accumulation: Genome sequencing and secondary metabolite cluster profiles. *Microbiological Research*, 192, 30-36. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.06.002>
- Parra, L. (2008). *Relación entre infecciones quiescentes de colletotrichum gloeosporioides (Penz) y los diferentes estados fenológicos del fruto de mango (mangifera indica L) variedad hilacha*. Recuperado el 31 de mayo del 2021, de <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8311/tesis120.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Quintero, M., Velásquez, A., Jutinico, L. M., Jiménez-Vergara, E., Blandón, L. M., Martínez, K., Lee, H. S., & Gómez-León, J. (2018). Bioprospecting from marine coastal sediments of Colombian Caribbean: Screening and study of antimicrobial activity. *Journal of Applied Microbiology*, 125(3), 753-765. <https://doi.org/10.1111/jam.13926>
- Quintero-Mercado, A., Dangon-Bernier, F., & Páez-Redondo, A. (2019). Aislamientos endofíticos de *Colletotrichum* spp. A partir de hojas y ramas de mango (*Mangifera*

- indica L.) cultivar Azúcar en el municipio de Ciénaga, Magdalena, Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 43(166), 65. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.788>
- Radovanović, N., Milutinović, M., Mihajlovski, K., Jović, J., Nastasijević, B., Rajilić-Stojanović, M., & Dimitrijević-Branković, S. (2018). Biocontrol and plant stimulating potential of novel strain *Bacillus* sp. PPM3 isolated from marine sediment. *Microbial Pathogenesis*, 120, 71-78. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.04.056>
- Rajaofera, M. J. N., Jin, P. F., Fan, Y. M., Sun, Q. Q., Huang, W. K., Wang, W. B., Shen, H. Y., Zhang, S., Lin, C. H., Liu, W. B., Zheng, F. C., & Miao, W. G. (2018). Antifungal activity of the bioactive substance from *Bacillus atrophaeus* strain HAB-5 and its toxicity assessment on *Danio rerio*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 147, 153-161. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.06.006>
- Reyes-Estebanez, M., Sanmartín, P., Camacho-Chab, J. C., De la Rosa-García, S. C., Chan-Bacab, M. J., Águila-Ramírez, R. N., Carrillo-Villanueva, F., De la Rosa-Escalante, E., Arteaga-Garma, J. L., Serrano, M., & Ortega-Morales, B. O. (2020). Characterization of a native *Bacillus velezensis*-like strain for the potential biocontrol of tropical fruit pathogens. *Biological Control*, 141, 104127. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104127>
- Ruiz-Sánchez, E., Mejía-Bautista, M. A., Serrato-Díaz, A., Reyes-Ramírez, A., Estrada-Girón, Y., & Valencia-Botín, A. (2016). Antifungal activity and molecular identification of native strains of *Bacillus subtilis*. *Agrociencia*, 50(2). Recuperado el 31 de mayo de 2021, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-31952016000200133&lng=es&tlng=en](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952016000200133&lng=es&tlng=en).

- Rungjindamai, N. (2016). Isolation and evaluation of biocontrol agents in controlling anthracnose disease of mango in Thailand. *Journal of Plant Protection Research*, 56(3), 306-311. <https://doi.org/10.1515/jppr-2016-0034>
- Schwarzer, D., Finking, R., & Marahiel, M. A. (2003). Nonribosomal peptides: From genes to products. *Natural Product Reports*, 20(3), 275. <https://doi.org/10.1039/b111145k>
- Sharma, R. (2019). Analytical Concept of Fungicide Resistance: A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8(12), 1672-1684. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.812.201>
- Stein, T., Düsterhus, S., Stroh, A., & Entian, K.-D. (2004). Subtilosin Production by Two *Bacillus subtilis* Subspecies and Variance of the sbo-alb Cluster. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4), 2349-2353. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.2349-2353.2004>
- Veith, B., Herzberg, C., Steckel, S., Feesche, J., Maurer, K. H., Ehrenreich, P., Bäumer, S., Henne, A., Liesegang, H., Merkl, R., Ehrenreich, A., & Gottschalk, G. (2004). The Complete Genome Sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an Organism with Great Industrial Potential. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 7(4), 204-211. <https://doi.org/10.1159/000079829>
- Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & De los Santos-Villalobos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(1). <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1706-5>
- World Health Organization, & Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2014). *International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides*. Recuperado el 31 de mayo del 2021, de

---

[http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests\\_Pesticides/CODE\\_2014Sep\\_ENG.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/CODE_2014Sep_ENG.pdf)

- Wu, L., Wu, H., Chen, L., Yu, X., Borriss, R., & Gao, X. (2015). Difficidin and bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 have antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* rice pathogens. *Scientific Reports*, 5(1), 12975. <https://doi.org/10.1038/srep12975>
- Xiong, J., Bauer, C. E., & Pancholy, A. (2007). Insight into the haem d 1 biosynthesis pathway in heliobacteria through bioinformatics analysis. *Microbiology*, 153(10), 3548-3562. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/007930-0>
- Zheng, M., Shi, J., Shi, J., Wang, Q., & Li, Y. (2013). Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic *Bacillus* strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangos. *Biological Control*, 65(2), 200-206. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.02.004>

## 2. Producción y caracterización química parcial de metabolitos de la bacteria de origen marino *Bacillus velezensis* INV FIR31

### Resumen

El uso extensivo e intensivo de productos de origen químico para el control de plagas y enfermedades en el campo agrícola, ha perturbado el balance ecológico de los microorganismos presentes en el hábitat dando lugar al desarrollo de cepas patógenas resistentes, contaminación del medio ambiente y riesgos para la salud humana. Los extractos antimicrobianos producidos por bacterias marinas representan una posible solución a esta problemática que además de ser efectivos contra los fitopatógenos representan una baja toxicidad siendo menos nocivos para el ambiente y los seres vivos, entre ellos los lipopéptidos son considerados los más importantes y son producidos principalmente por bacterias del género *Bacillus*. En este estudio, se caracterizó parcialmente el extracto BS57 producido por la bacteria marina *Bacillus velezensis* INV FIR31, el cual presentó alta capacidad biocontroladora contra especies de *Colletotrichum* asociadas a Antracnosis en mango. Mediante la técnica de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR), cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (CLAE-EM) y un análisis termogravimétrico (TGA), se identificó la presencia del lipopéptido Bacilomicina D de la familia iturinas. Por otro lado, el extracto sólido presentó estabilidad térmica hasta los 140°C, característica importante para el desarrollo de productos aplicables en campo, ya que puede inferirse que su actividad biológica no tendría cambios sustanciales en condiciones ambientales adversas.

### Palabras Claves

Metabolitos secundarios, *Bacillus* spp, Lipopéptidos, Biofungicida

## 1. Introducción

El uso extensivo e intensivo de químicos sintéticos para el control de plagas y enfermedades en campo, ha perturbado el balance ecológico de los microorganismos presentes en el hábitat dando lugar al desarrollo de cepas patógenas resistentes, contaminación del medio ambiente y riesgos para la salud humana asociados a la toxicidad. Uno de los desafíos más grandes en los últimos años es el desarrollo de alternativas que no representen una amenaza para el agroecosistema, además, el continuo incremento de bacterias multiresistentes a antibióticos también ha acelerado la necesidad de encontrar nuevas moléculas antimicrobianas, por lo que para el 2003 la FAO autorizó el uso del primer lipopéptido de tipo antibiótico con fines farmacéuticos (Nakhate et al., 2013; Schneider et al., 2014), estos lipopéptidos (LPs) son metabolitos secundarios producidos por bacterias que actualmente son consideradas biofábricas para la producción a gran escala de este tipo de moléculas con interesantes actividades biológicas.

La investigación de LPs ha estado dirigida a la aplicación industrial en la decoloración y descontaminación de efluentes, biorremediación, pretratamiento de material lignocelulítico (residuos agroindustriales) y producción de biosurfactantes. En la industria farmacéutica se estudia la actividad anticancerígena, antiparasitaria y péptidos constituyentes de nuevos antibióticos y adyuvantes de vacunas, además de la aplicación de prebióticos en la acuicultura, aditivos para alimentos de consumo humano (Drakontis & Amin, 2020; Meena & Kanwar, 2015), y en la agricultura se ha evaluado el potencial agrícola como biofertilizantes y controladores biológicos de fitopatógenos. En este contexto los lipopéptidos representan un grupo de moléculas versátiles y diversas que revisten un gran interés biotecnológico (Meena & Kanwar, 2015).

Los lipopéptidos son metabolitos secundarios que estructuralmente están constituidos por un ácido graso en combinación con un resto peptídico. Pueden diferenciarse por la composición del resto peptídico, la longitud de la cadena de ácidos grasos y el enlace entre las dos partes, y de acuerdo a estas características se pueden clasificar en tres familias: Iturinas, fengycinas y surfactinas (Inès & Dhouha, 2015). Las bacterias del género *Bacillus* spp. han sido reportadas como las principales productoras, su síntesis se ha reportado en especies como *B. amyloliquefaciens*, *B. brevis*, *B. licheniformis*, *B. mojavensis*, *B. mycoides*, *B. pumilus*, *B. siamensis*, *B. subtilis* y aislamientos marinos como *B.*

*stratosphericus*, *B. marinus* y *B. velezensis* (Hentati et al., 2019; Sharma et al., 2020). Aunque también han sido identificados en bacterias del género *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Arthrobacter*, *Halomonas*, debido a la diversidad y el fácil cultivo *in vitro*, se sigue explorando principalmente la producción en especies de *Bacillus* sp. (Cheffi et al., 2021; Raddadi et al., 2012; Yang et al., 2015; Zhao et al., 2017).

Para realizar una caracterización química, y así dilucidar la estructura de los lipopéptidos existen diversas metodologías, pero entre las más usadas se encuentra la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier FT-IR (Nasir & Besson, 2012a). Esta es una técnica por la cual la interacción de una radiación con la materia de la muestra hace vibrar los enlaces moleculares de un modo característico para cada grupo funcional, lo que se traduce en un espectro o huella dactilar que permite, por comparación, identificarlos estructuralmente en términos de intensidad y posición (frecuencia). La transformación de Fourier es el método matemático para el desarrollo de la curva obtenida (interferograma). La transformada está constituida por el sumatorio de senos y cosenos de las distintas frecuencias ópticas que componen la radiación.

El espectrofotómetro FTIR tiene varias ventajas importantes: Su sensibilidad es mejor debido a que mide todas las frecuencias de manera simultánea en lugar de escanear las frecuencias individuales. Se necesita menos energía de la fuente y se requiere menos tiempo (por lo regular de 1 a 2 segundos) para un escaneo. Pueden completarse varios escaneos en unos cuantos segundos y promediarse para mejorar la señal (Wade, 2013)

Por otro lado, la cromatografía es el nombre que se le da al grupo de técnicas utilizadas en la determinación de la identidad, cuantificación y separación de sustancias en una mezcla. La cromatografía líquida comprende todas las técnicas cromatográficas que usan una fase móvil líquida, entre las cuales están la cromatografía de papel, la cromatografía en capa fina, la cromatografía en columna y la cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) (Talero-Pérez *et al.*, 2013).

La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (CLAE-EM) es una técnica robusta, sensible y selectiva, y proporciona un análisis cuantitativo y cualitativo de los componentes presentes en una determinada mezcla (Yoshida *et al.*, 2009). En

comparación con otras técnicas CLAE-EM es una alternativa que requiere menos complejidad en los análisis, dado que otras técnicas requieren de pretratamiento de la muestra y derivatización del analito. Por otro lado, los análisis termogravimétricos (TGA) permiten determinar algunos parámetros físicos de materiales sólidos, en estos, la pérdida de masa de una muestra se mide en un periodo de tiempo como función del aumento en la temperatura permitiendo así, conocer información sobre la humedad y estabilidad de la muestra con respecto a la temperatura, características importantes para determinar la estabilidad de un material, crucial para el desarrollo, evaluación en condiciones de campo y aplicación de un producto comercial (Sharma et al., 2018).

El objetivo de esta investigación fue caracterizar el extracto obtenido de la bacteria de origen marino *Bacillus velezensis* INV FIR31 para identificar putativamente las moléculas involucradas en la actividad antifúngica evaluada previamente.

## **2. Materiales y Métodos**

El extracto BS57, fue obtenido de la bacteria *Bacillus velezensis* INV FIR31 a través de la metodología de precipitación ácida como se detalla en el Capítulo 1 (Ver: Metodología 2.3, Capítulo 1). La bacteria se inoculó en medio Bushnell-Haas con melaza de caña al 1% y se incubó a 30°C con agitación constante de 140 rpm durante 24 h, el cultivo fue centrifugado con el fin de obtener el sobrenadante libre de células, seguidamente, se sometió a acidificación usando ácido clorhídrico (HCl 6 M), hasta alcanzar un pH 2,0 y se almacenó a 4°C, durante 24 h, después de este tiempo el precipitado fue recolectado por centrifugación y se resuspendió en una solución HCl 0.1 M, posteriormente se centrifugó y se retiró el sobrenadante, el pellet resultante se resuspendió en agua destilada y se liofilizó. Finalmente, el producto seco se disolvió en una mezcla de cloroformo:metanol (65:15), se filtró usando filtro Wathman N°4 y el filtrado se concentró a presión reducida usando el rotavaporador Marca Heidolph (serie 101108307). El extracto orgánico fue almacenado a temperatura ambiente (25°C).

### **2.1 Espectroscopía Infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)**

Los análisis espectrales fueron realizados a una temperatura aproximada de 20°C, en el infrarrojo medio (400-4000  $\text{cm}^{-1}$ ), usando el equipo IR Tracer-100 (Shimadzu), con un detector DLATS y un accesorio de reflexión horizontal ATR (ATR - MIRacle™ PIKE). La muestra fue puesta en contacto con el cristal de diamante que se encuentra en el accesorio ATR. Cada espectro fue corrido con un promedio de 64 barridos y con una resolución de 8  $\text{cm}^{-1}$ . La asignación de señales se realizó teniendo en cuenta la tabla de espectroscopia infrarroja de Sigma Aldrich.

## **2.2 Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (CLAE-EM)**

La CLAE-EM se realizó en un UHPLC Thermo Dionex Ultimate 3000 junto con HRMS (Impact II, Bruker Daltonics Corporation, EE. UU.) equipado con una fuente de ionización por electroaspersión (EA). El sistema de cromatografía utilizó una columna analítica C18 (columna LC Kinetex® de tamaño de partícula de 1,7  $\mu\text{m}$ , 100 x 2,1 mm). La fase móvil fue un sistema solvente binario que consistió en A (agua, 0.1% FA) y B (ACN, 0.1% FA). Las condiciones de elución fueron gradiente "discontinuo" de la siguiente manera: 10% de B durante 5 min, 10-70% de B durante 7 min, 70% de B durante 5 min, 70-99% de B durante 4 min y 99% de B durante 6 minutos. El volumen de inyección fue de 1  $\mu\text{l}$ , el caudal de 0,4 ml/min. Las ionizaciones se adquirieron en modo positivo mediante espectrometría de masas por ionización por electropulverización (ESI-MS) con temperatura capilar, y el voltaje se ajustó a 200 ° C, 3,5 kV, respectivamente. (Peterson et al., 2009; Sudarmono et al., 2019). El escaneo varió de 50 a 1200 m/z. El extracto fue disuelto en metanol grado HPLC (Etchegaray et al., 2008).

Los datos de la CLAE-EM se procesaron con el software MZmine, que consistió en realizar la detección de los picos, eliminación de isótopos, coincidencia de picos y llenado de picos (Nunes et al., 2019). La detección de picos se realizó en tres pasos: (i) detección de masa con valor de ruido = 5000; (ii) generador de cromatogramas con un lapso mínimo = 0,01 min, altura mínima = 3000 y tolerancia m/z = 5 ppm; (iii) deconvolución con ancho de pico = 0,01– 0,5min, ruido = 5000. Los isótopos se eliminaron utilizando el mero isotópico con tolerancia m / z = 5 ppm, tolerancia de tiempo de retención = 0,1 min e intensidad estándar

mínima = 5000. Luego, se aplicó un filtro para mantener solo aquellos iones con al menos 2 picos en su patrón de isótopos. La coincidencia de picos entre las muestras se realizó usando el alineador de unión con tolerancia  $m/z = 5,0$  ppm.

### **2.3 Análisis termogravimétrico (TGA)**

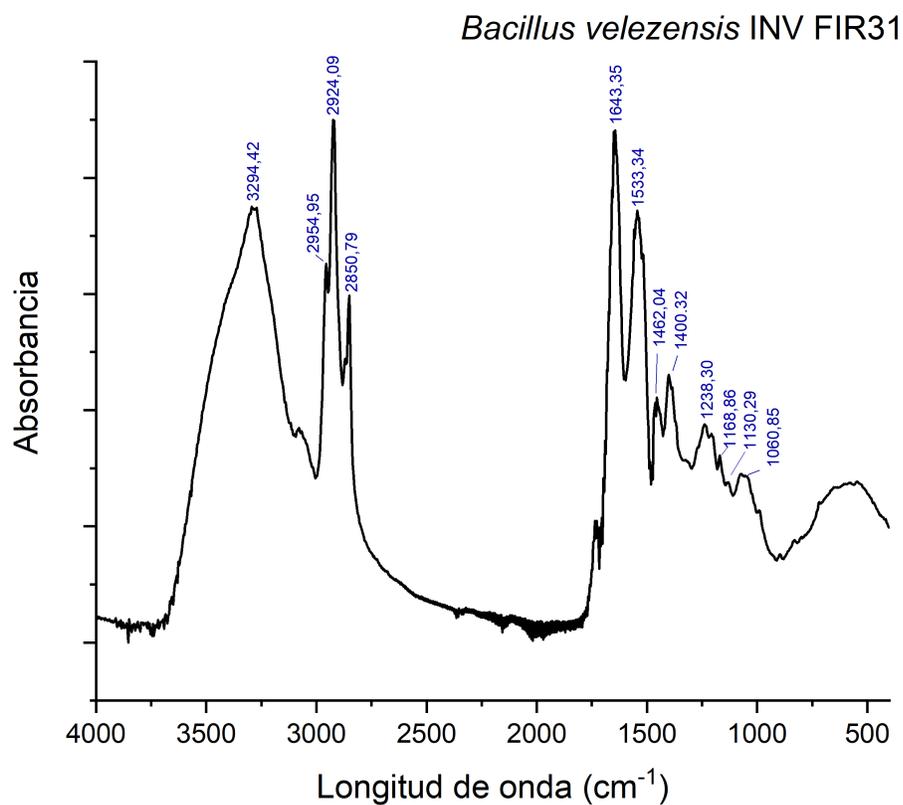
El análisis térmico del extracto se llevó a cabo con un TGA Q500 V6.7 Build 207. Se cargaron 2–5 mg de muestra en una bandeja de platino y se cuantificó la pérdida de masa en los rangos de temperatura 30–800 ° C y 30–450 ° con un gradiente de 10 ° C/min, bajo atmósfera de nitrógeno tipo 5.0 o aire seco.

## **3. Resultados**

### **3.1 Espectroscopía Infrarroja con transformada de Fourier**

El espectro infrarrojo ATR del extracto reveló la presencia de grupos peptídicos, alifáticos, amida, éster, carboxilo y carbonilos, las bandas de absorción más importantes se asignaron por comparación con los espectros obtenidos de la literatura, los cuales sugieren que se trata de una estructura de naturaleza orgánica (Figura 6). Estos grupos se asociaron a las señales del espectro, una banda fuerte a los  $3294\text{ cm}^{-1}$ , característica del estiramiento del enlace N-H y O-H, correspondiente al grupo peptídico (Ibrar & Zhang, 2020). Las señales a  $2954$ ,  $2924$  y  $2850\text{ cm}^{-1}$  sugieren estiramientos de enlaces C-H, de acuerdo a otras investigaciones estas señales son resultados consistentes para compuestos alifáticos de cadena (Hentati et al., 2019; Mani et al., 2016;).

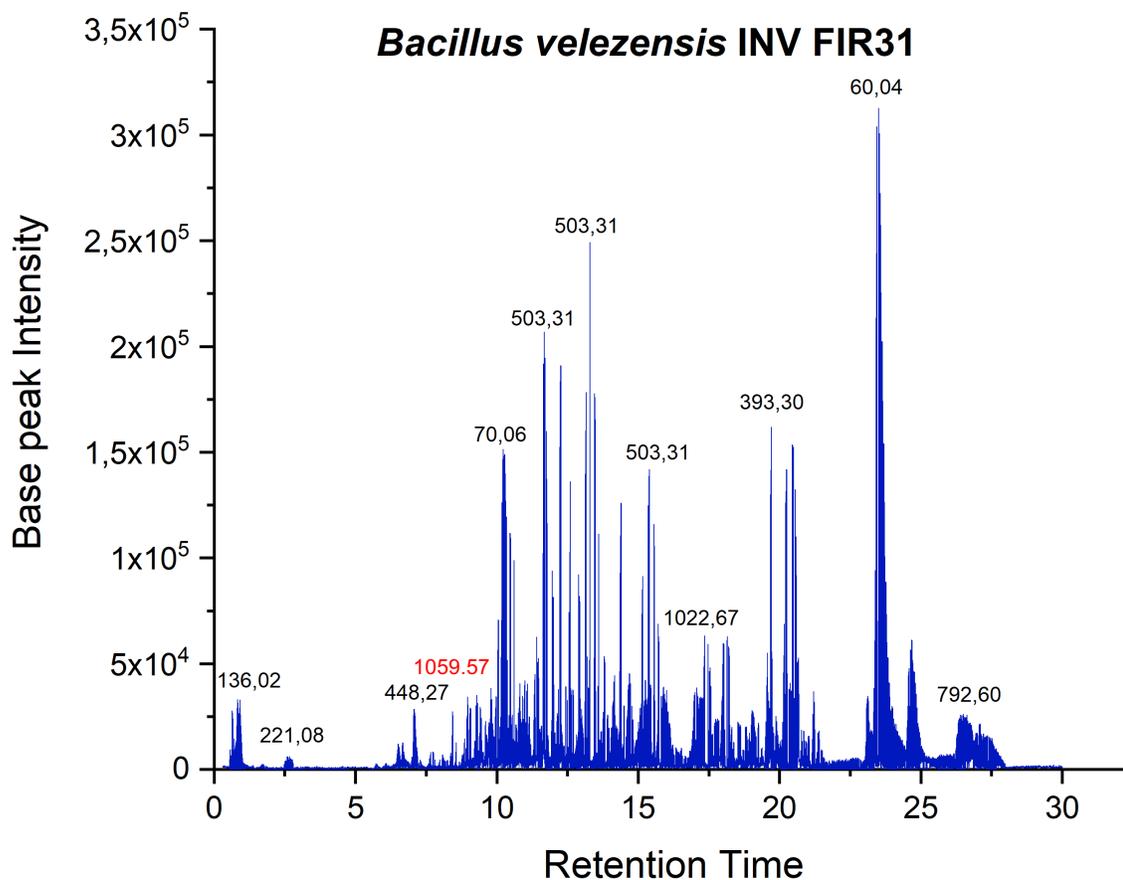
Las señales en  $1643\text{ cm}^{-1}$  corresponden a estiramientos del enlace C=O del grupo amida. Las tres señales en  $1535$ ,  $1462$  y  $1400\text{ cm}^{-1}$  corresponden a estiramiento de enlaces C=C confirmando así la presencia de insaturaciones en los compuestos analizados. Las señales de baja intensidad por debajo de  $1400\text{ cm}^{-1}$  corresponden a la huella digital, por lo que no fueron tenidas en cuenta para la identificación.



**Figura 6.** Espectroscopía Infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) en modalidad ATR del extracto BS57 obtenido de la bacteria marina *Bacillus velezensis* INV FIR31.

### 3.2 Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (CLAE-EM)

El perfilado metabólico CLAE-EM del extracto evidenció zonas de alta densidad entre 8 y 21 minutos y otra entre los 23 y 27 minutos, de acuerdo a lo reportado por Muñoz-Vasquez, (2015), estas señales podrían corresponder a zonas de retención para las iturinas (RT: 0-10 min), para fengicinas (RT: 11-17 min) y surfactinas (RT: 22-27 min), respecto a la relación masa/carga ( $m/z$ ) se observan valores de 136, 221, 448, 1059, 70, 503, 1022, 393, 60 y 792 (Figura 7).

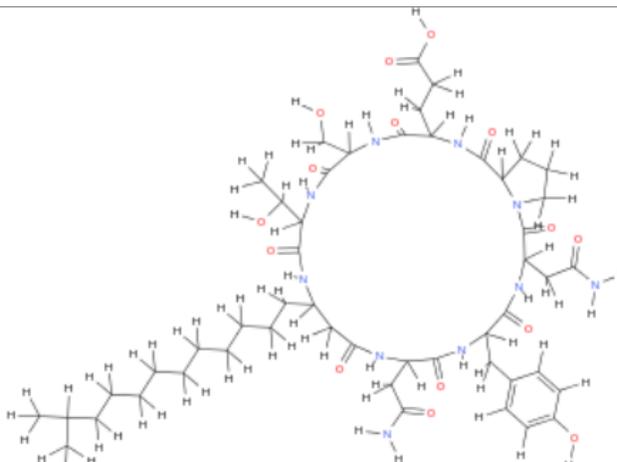


**Figura 7.** Cromatograma (TIC) del extracto BS57 obtenido de la bacteria marina *Bacillus velezensis* INV FIR31., por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (CLAE-EM)

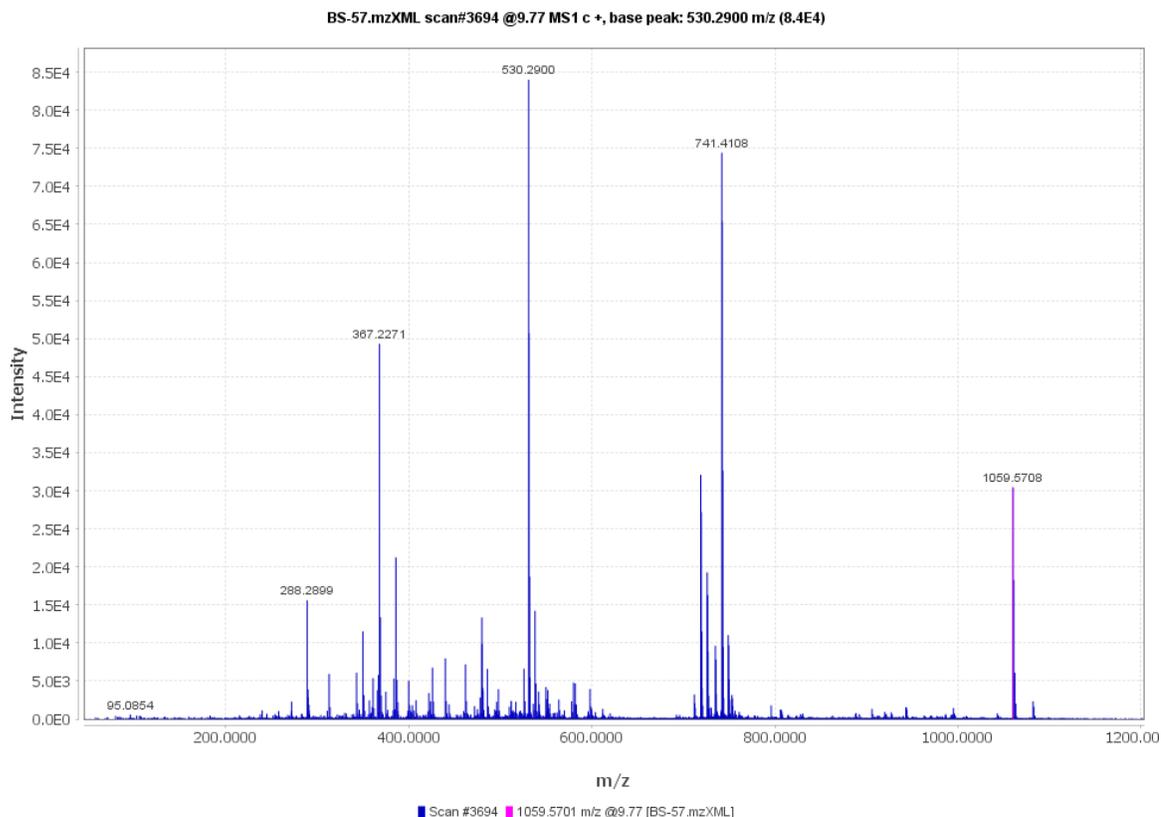
Los datos de espectrometría de masas sin procesar se trabajaron en el software MZmine con la condición descrita en la metodología, el conjunto de datos se cargó en la plataforma Global Natural Products Social Molecular Networking -GNPS (<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp>). La plataforma en línea posee una diversidad de herramientas que ayudan a la identificación de compuestos y la derreplicación. Para la derreplicación con las bases de datos cargadas en la plataforma, se consideró como identificación putativa aquellos compuestos que tenían un valor de  $\Delta$ ppm inferior a 5 y el espectro de ms/ms experimental tenía coincidencia con el reportado

por la base de datos (Mihaleva *et al.*, 2008). Bajo esos criterios se identificó putativamente un compuesto de tipo lipopeptídico, Bacilomycin D con un  $\Delta$ ppm de 0.0 (Tabla 5).

**Tabla 5.** Compuestos identificados en el extracto BS-57 con la plataforma Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS).

| Compuesto      | m/z reportado | $\Delta$ ppm | Estructura  |
|----------------|---------------|--------------|---|
| Bacillomycin D | 1059.57       | 0.0          |  |

Dado que el espectrómetro de masas recopila una gran cantidad de datos de las masas detectadas, se realizó un análisis de monitorización selectiva de los iones, en inglés, Select Ion Monitoring (SIM) del ion 1059,57 correspondiente al compuesto de interés identificado como Bacillomicina D, este análisis aumenta la sensibilidad del análisis cromatográfico, ya que permite evidenciar la ruptura o pérdidas de los enlaces péptidos que posiblemente componen la molécula, es decir, que las señales detectadas son generadas por los aminoácidos presentes en el lipopéptido. En el resultado se pudo evidenciar cuatro fragmentos con valores de m/z de 288, 367, 530, 741 (Figura 8).

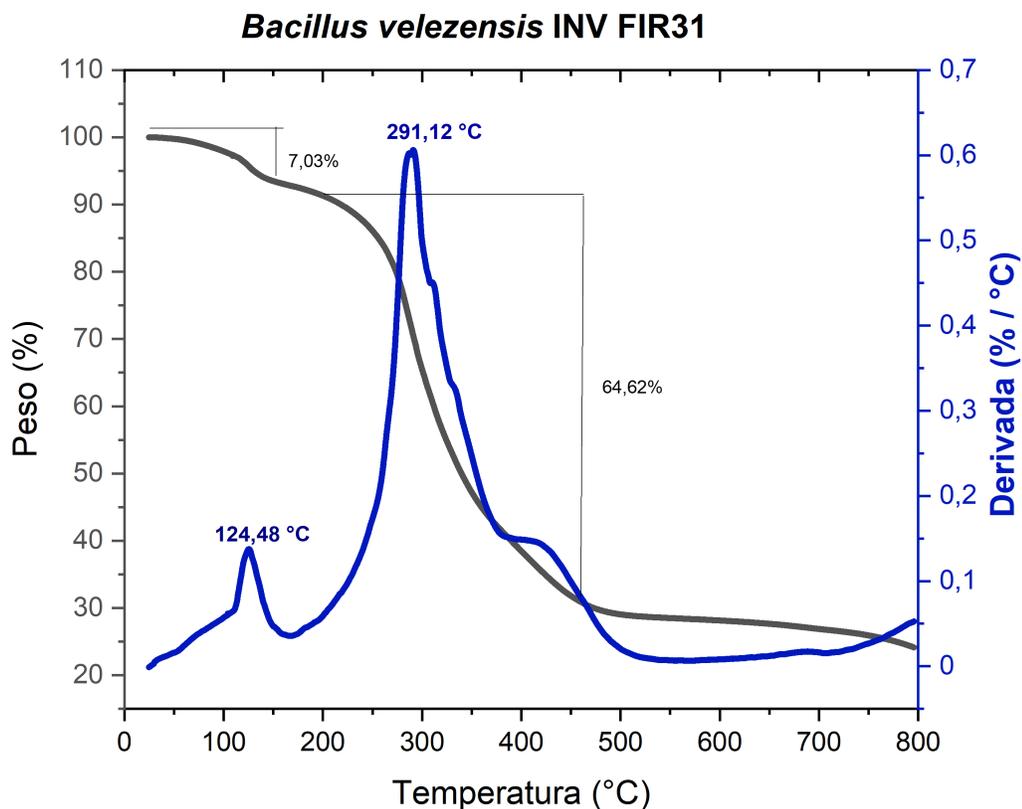


**Figura 8.** Análisis SIM (Select Ion Monitoring) del ion m/z 1059,57 del extracto BS57 obtenido de la bacteria marina *Bacillus velezensis* INV FIR31.

### 3.3 Análisis termogravimétrico

En la Figura 9 se evidenció el comportamiento del extracto BS57 y la descomposición térmica presenta 2 picos relevantes, el primer pico en un intervalo de temperatura (110-140°C) con una pérdida de peso del 7%, que podría atribuirse a la eliminación de la humedad de la muestra, el segundo pico se genera en un intervalo de (290-310°C) siendo este el pico de mayor degradación térmica con una pérdida del 64%. Por lo que se podría inferir que la estabilidad del extracto sólido se conserva en gran medida hasta los 291°C

aproximadamente.



**Figura 9.** Análisis termogravimétrico del extracto BS57 obtenido de la bacteria marina *Bacillus velezensis* INV FIR31.

#### 4. Discusión

Las metodologías usadas en este estudio permitieron identificar la naturaleza química y posible estructura de los compuestos presentes en el extracto BS57 obtenido de la bacteria marina *Bacillus velezensis* INV FIR31. El FT-IR en modalidad ATR del extracto BS57, reveló la presencia de grupos peptídicos, alifáticos, amida, éster, carboxilo y carbonilos, características de moléculas orgánicas. Estos grupos se asociaron a las señales del

espectro con una banda fuerte a los  $3294\text{ cm}^{-1}$ , característica del estiramiento del enlace N-H y O-H, correspondiente al grupo peptídico (Ibrar & Zhang, 2020). Las señales a 2954, 2924 y  $2850\text{ cm}^{-1}$  sugieren estiramientos de enlaces C-H, de acuerdo a otras investigaciones estas señales son resultados consistentes para compuestos alifáticos de cadena (Hentati et al., 2019; Mani et al., 2016), además se destaca el uso de esta técnica para caracterizar los compuestos de naturaleza lipopeptídica (Cheffi et al., 2021). Los resultados obtenidos de la CLAE-EM permitieron evidenciar la ionización de diversos compuestos, sin embargo, con el tratamiento de los datos en la base de datos GNPS, se identificó la presencia del lipopéptido Bacilomicina D correspondiente el ion  $m/z$  1059,57 con un tiempo de retención de 9,6 minutos. Este resultado fue similar a lo observado por autores como Jin et al., (2018) y Luna-Bulbarela et al., (2018) al identificar lipopéptidos homólogos de la Bacilomicina D con  $m/z$  1054,50 y  $m/z$  1045,75 obtenido de la bacteria *B. amyloliquefaciens* para el control biológico de *Colletotrichum gloeosporioides*, y lo reportado por Gong et al., (2014) que identificó cuatro compuestos homólogos de Bacilomicina D con  $m/z$  de 1030, 1044, 1058 y 1072 obtenidos de *B. subtilis* capaces de inhibir el crecimiento de *Aspergillus flavus*.

La Bacilomicina D hace parte de la familia de las iturinas caracterizadas por tener una secuencia de heptapéptidos y una cadena alifática entre C14-C17 (Beltran-Gracia et al., 2017). Los miembros de esta familia presentan seis sitios de heterogeneidad: i) longitud e insaturación de la cadena de ácido graso, ii) aminoácido de la posición 1 (Asn/Asp), iii) aminoácido de la posición 4 (Ser/Pro/Gln/Glu), iv) aminoácido de la posición 5 (Glu/Gln/Pro), v) posición 6 (Ser/Asn/Asp) y vi) aminoácido de la posición 7 (Thr/Ser/Asn). La composición exacta de la secuencia de aminoácido se puede determinar de acuerdo a análisis SIM de ion  $m/z$  1059,57 asignado a la Bacilomicina D, analizando los fragmentos obtenidos, aunque, no se profundizó en la elucidación de esta estructura, sin embargo, las pérdidas y los valores obtenidos en el presente estudio, son similares a evaluaciones anteriores que han revelado que la Bacilomicina D posee una estructura esquemática de Asn-Tyr-Asn-Pro-Glu-Ser-Thr (Gong et al., 2014; Nasir & Besson, 2012b). Las iturinas se caracterizan por ser altamente fungitóxicas, sin embargo, poseen una baja actividad antibacteriana, a diferencia de las surfactinas que inhiben principalmente las bacterias (Liu et al., 2020), esto coincide con una evaluación adicional de viabilidad bacteriana realizado con el extracto BS57 en que no se evidenció daño en la membrana bacteriana de

*Staphylococcus aureus* cuando era expuesto al extracto a una concentración de 400 ppm (Ver: Anexo B). En la actualidad se conocen los mecanismos antimicrobianos de los lipopéptidos los cuales están relacionados principalmente con el daño a la membrana celular por su naturaleza anfipática, lo que les permite interactuar de manera directa con esta. Es así como las surfactinas y fengicinas producen la desestabilización y alteran la curvatura de la membrana, causando una alteración estructural de la célula (Carrillo et al., 2003; Heerklotz & Seelig, 2001), y las iturinas son capaces de formar poros en la membrana citoplasmática, lo que produce la salida de iones y la posterior fuga de macromoléculas esenciales para la supervivencia del hongo. Un informe reciente demuestra que la Bacilomicina D, puede dañar la pared y la membrana celular de las hifas y las esporas de *C. gloeosporioides*, haciendo que el citoplasma y los orgánulos de las células del hongo diana exuden, inhibiendo el crecimiento del mismo (Gong et al., 2014; Li et al., 2020). Por otra lado, se ha mencionado que la unión de los lipopéptidos cíclicos con la membrana es poco específica, por lo que su acción estaría condicionada por los siguientes parámetros: i) composición de esteroides y/o fosfolípidos de la membrana (Buchoux et al., 2008) , ii) la concentración de lipopéptidos y iii) capacidad de asociarse entre los lipopéptidos de una misma y/o distinta familia (Romero et al., 2007). Adicionalmente, se ha reportado que los lipopéptidos pueden actuar de manera indirecta en la protección del tejido vegetal. Se ha evidenciado que las surfactinas y las fengicinas son capaces de producir perturbaciones de manera transitoria en la membrana de las células vegetales produciendo la activación de cascadas de señalización mediadas por las hormonas ácido jasmónico y etileno que permiten la activación de la resistencia sistémica inducida (ISR). La respuesta de defensa inducida por los lipopéptidos produce un aumento en la síntesis de compuestos fenólicos y fitoalexinas; además, se generan modificaciones en la pared celular vegetal, tales como el engrosamiento y lignificación del tejido (Ongena & Jacques, 2008).

El análisis TGA sugiere que el compuesto sólido tiene una propiedad de estabilidad térmica hasta alcanzar una temperatura de aproximadamente 290°C , lo que coincide con un estudio en el 2014 que además evaluó la actividad antimicrobiana y el efecto del pH de los lipopéptidos producidos por *B. mojavensis* mostrando una actividad biológica muy estable después de 15 min de incubación a temperaturas de 60 a 80 °C, mientras que se observó

una leve disminución de la actividad a 90 y 100 °C. Los resultados obtenidos sugirieron que el pH entre 6 y 9 no tiene un efecto significativo sobre la variabilidad en la actividad antimicrobiana (Ben Ayed et al., 2014).

Los lipopéptidos han sido ampliamente estudiados y han demostrado ser alternativas eficientes para el manejo de enfermedades fitosanitarias, dada su variedad y versatilidad, siendo el lipopéptido Bacillomicina D identificado en este estudio, el más especializado para inhibir el crecimiento fúngico, sin embargo no se descarta la posibilidad de la presencia de otros lipopéptidos en el extracto BS57 obtenido de la bacteria *B. velezensis* INV FIR31, puesto que estudios recientes señalan que esta bacteria es capaz de sintetizar lipopéptidos del grupo de las iturinas, surfactinas y fengicinas (Devi et al., 2019; Li et al., 2020; Liu et al., 2020). Otros elementos que pueden influenciar la síntesis de un determinado lipopéptido son las condiciones de crecimiento de la bacteria, desde la cinética, los nutrientes, la temperatura y el pH que han evidenciado jugar un papel importante en el tipo de lipopéptido que la bacterias metabolizan (Mnif et al., 2012; Ongena & Jacques, 2008). El conocimiento de estos elementos además permitirá orientar la investigación a la producción de lipopéptidos de interés con mayores rendimientos y a menor costo teniendo como pilar los procesos fermentativos (Beltran-Gracia et al., 2017), ya que la distribución comercial de los lipopéptidos actualmente es limitada debido a su alto costo de producción, purificación y bajo rendimiento (Carolin C et al., 2021).

Por otra parte, se debe tener en cuenta que los lipopéptidos son sintetizados por sintetasas peptídicas no ribosomales (NRPS) como metabolitos secundarios asociados con los mecanismos de adaptación y/o protección que utilizan los microorganismos para sobrevivir en condiciones adversas. Por lo tanto, los microorganismos de hábitats desafiantes como, profundidades marinas y suelos desérticos antárticos demuestran una amplia diversidad de bacterias productoras de NRPS y son fuentes atractivas para la extracción futura de nuevos lipopéptidos (Agrawal et al., 2017). En la medida en que las nuevas tecnologías, desde la metagenómica hasta la genómica, las herramientas bioinformáticas y las simulaciones, se combinen con métodos rápidos de detección de bioactividad y técnicas de química analítica, el descubrimiento de diversos lipopéptidos, sin duda conducirá a nuevos conocimientos sobre las funciones ecológicas de estos metabolitos, en particular los producidos bajo una mirada de factores ambientales estresantes.

### Conclusión

El género *Bacillus* tiene un alto potencial biotecnológico, ya que es productor de metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas. Entre estos metabolitos, los lipopéptidos de la familia Iturina son un grupo importante que podría considerarse una alternativa para reemplazar el uso de fungicidas de origen químico.

Se determinó putativamente la presencia del compuesto Bacilomicina D en el extracto BS57 producido por la bacteria marina *Bacillus velezensis* INV FIR31 al analizarlo con las técnicas FT-IR y CLAE-EM. Sin embargo, es necesario fraccionar y purificar aún más el extracto obtenido y realizar análisis más específicos como resonancia magnética nuclear (RMN) para poder confirmar si este compuesto es el directamente responsable de la actividad biológica .

El análisis TGA del extracto BS57 mostró que el extracto es estable térmicamente hasta los 190°C, característica importante para el desarrollo de productos aplicables en campo, puesto que podría interpretarse que su actividad biológica no tendría cambios sustanciales en condiciones ambientales adversas.

### Referencias

- Agrawal, S., Acharya, D., Adholeya, A., Barrow, C. J., & Deshmukh, S. K. (2017). Nonribosomal Peptides from Marine Microbes and Their Antimicrobial and Anticancer Potential. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 828. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00828>
- Beltran-Gracia, E., Macedo-Raygoza, G., Villafaña-Rojas, J., Martinez-Rodriguez, A., Chavez-Castrillon, Y. Y., Espinosa-Escalante, F. M., Di Mascio, P., Ogura, T., & Beltran-Garcia, M. J. (2017). Production of Lipopeptides by Fermentation Processes: Endophytic Bacteria, Fermentation Strategies and Easy Methods for

- 
- Bacterial Selection. En A. F. Jozala (Ed.), *Fermentation Processes*. InTech.  
<https://doi.org/10.5772/64236>
- Ben Ayed, H., Hmidet, N., Béchet, M., Chollet, M., Chataigné, G., Leclère, V., Jacques, P., & Nasri, M. (2014). Identification and biochemical characteristics of lipopeptides from *Bacillus mojavensis* A21. *Process Biochemistry*, 49(10), 1699-1707.  
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.07.001>
- Buchoux, S., Lai-Kee-Him, J., Garnier, M., Tsan, P., Besson, F., Brisson, A., & Dufourc, E. J. (2008). Surfactin-Triggered Small Vesicle Formation of Negatively Charged Membranes: A Novel Membrane-Lysis Mechanism. *Biophysical Journal*, 95(8), 3840-3849. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.128322>
- Carrillo, C., Teruel, J. A., Aranda, F. J., & Ortiz, A. (2003). Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1611(1-2), 91-97.  
[https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(03\)00029-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(03)00029-4)
- Carolin C, F., Kumar, P. S., & Ngueagni, P. T. (2021). A Review on New Aspects of Lipopeptide Biosurfactant: Types, Production, Properties and its Application in the Bioremediation Process. *Journal of Hazardous Materials*, 124827.  
<https://doi:10.1016/j.jhazmat.2020.124827>
- Cheffi, M., Maalej, A., Mahmoudi, A., Hentati, D., Marques, A. M., Sayadi, S., & Chamkha, M. (2021). Lipopeptides production by a newly *Halomonas venusta* strain: Characterization and biotechnological properties. *Bioorganic Chemistry*, 109, 104724. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104724>
- Devi, S., Kiese-walter, H. T., Kovács, R., Frisvad, J. C., Weber, T., Larsen, T. O., Kovács, Á. T., & Ding, L. (2019). Depiction of secondary metabolites and antifungal activity

- of *Bacillus velezensis* DTU001. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 4(3), 142-149. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2019.08.002>
- Drakontis, C. E., & Amin, S. (2020). Biosurfactants: Formulations, properties, and applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 48, 77-90. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2020.03.013>
- Etchegaray, A., de Castro Bueno, C., de Melo, I. S., Tsai, S. M., Fiore, M. de F., Silva-Stenico, M. E., de Moraes, L. A. B., & Teschke, O. (2008). Effect of a highly concentrated lipopeptide extract of *Bacillus subtilis* on fungal and bacterial cells. *Archives of Microbiology*, 190(6), 611-622. <https://doi.org/10.1007/s00203-008-0409-z>
- Gong, Q., Zhang, C., Lu, F., Zhao, H., Bie, X., & Lu, Z. (2014). Identification of bacillomycin D from *Bacillus subtilis* fmbJ and its inhibition effects against *Aspergillus flavus*. *Food Control*, 36(1), 8-14. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.07.034>
- Heerklotz, H., & Seelig, J. (2001). Detergent-Like Action of the Antibiotic Peptide Surfactin on Lipid Membranes. *Biophysical Journal*, 81(3), 1547-1554. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)75808-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75808-0)
- Hentati, D., Chebbi, A., Hadrich, F., Frikha, I., Rabanal, F., Sayadi, S., Manresa, A., & Chamkha, M. (2019). Production, characterization and biotechnological potential of lipopeptide biosurfactants from a novel marine *Bacillus stratosphericus* strain FLU5. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 167, 441-449. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.036>
- Ibrar, M., & Zhang, H. (2020). Construction of a hydrocarbon-degrading consortium and characterization of two new lipopeptides biosurfactants. *Science of The Total Environment*, 714, 136400. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136400>

- 
- Inès, M., & 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>
- Jin, P., Wang, H., Liu, W., Fan, Y., & Miao, W. (2018). A new cyclic lipopeptide isolated from *Bacillus amyloliquefaciens* HAB-2 and safety evaluation. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 147, 40-45.  
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.08.015>
- Li, F.-Z., Zeng, Y.-J., Zong, M.-H., Yang, J.-G., & Lou, W.-Y. (2020). Bioprospecting of a novel endophytic *Bacillus velezensis* FZ06 from leaves of *Camellia assamica*: Production of three groups of lipopeptides and the inhibition against food spoilage microorganisms. *Journal of Biotechnology*, 323, 42-53.  
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.07.021>
- Liu, Y., Teng, K., Wang, T., Dong, E., Zhang, M., Tao, Y., & Zhong, J. (2020). Antimicrobial *Bacillus velezensis* HC6: Production of three kinds of lipopeptides and biocontrol potential in maize. *Journal of Applied Microbiology*, 128(1), 242-254.  
<https://doi.org/10.1111/jam.14459>
- Luna-Bulbarela, A., Tinoco-Valencia, R., Corzo, G., Kazuma, K., Konno, K., Galindo, E., & Serrano-Carreón, L. (2018). Effects of bacillomycin D homologues produced by *Bacillus amyloliquefaciens* 83 on growth and viability of *Colletotrichum gloeosporioides* at different physiological stages. *Biological Control*, 127, 145-154.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.08.004>
- Mani, P., Sivakumar, P., & Balan, S. S. (2016). Economic Production and Oil Recovery Efficiency of a Lipopeptide Biosurfactant from a Novel Marine Bacterium *Bacillus simplex*. *Achievements in the Life Sciences*, 10(1), 102-110.  
<https://doi.org/10.1016/j.als.2016.05.010>

- Meena, K. R., & Kanwar, S. S. (2015). Lipopeptides as the Antifungal and Antibacterial Agents: Applications in Food Safety and Therapeutics. *BioMed Research International*, 2015, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2015/473050>
- Mihaleva, V. V., Vorst, O., Maliepaard, C., Verhoeven, H. A., de Vos, R. C. H., Hall, R. D., & van Ham, R. C. H. J. (2008). Accurate mass error correction in liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry based metabolomics. *Metabolomics*, 4(2), 171-182. <https://doi.org/10.1007/s11306-008-0108-4>
- Mnif, I., Chaabouni-Ellouze, S., & Ghribi, D. (2012). Optimization of the Nutritional Parameters for Enhanced Production of *B. subtilis* SPB1 Biosurfactant in Submerged Culture Using Response Surface Methodology. *Biotechnology Research International*, 2012, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2012/795430>
- Muñoz-Vasquez, C. M. (2015). Caracterización de cepas bacterianas silvestres con actividad fungicida como potenciales agentes para el control biológico del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*. Universidad de Chile. Recuperado el 31 de mayo del 2021, de <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/138513/Caracterizacion-de-cepas-bacterianas-silvestres-con-actividad-fungicida-como-potenciales-agentes-para-el%20control-biologico.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Nakhate, P. H., Yadav, V. K., & Pathak, A. N. (2013). A Review on Daptomycin; the first US-FDA approved Lipopeptide antibiotics. *Journal of Scientific and Innovative Research*, 2(5), 970-980.
- Nasir, M. N., & Besson, F. (2012a). Conformational analyses of bacillomycin D, a natural antimicrobial lipopeptide, alone or in interaction with lipid monolayers at the air–water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 387(1), 187-193. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.07.091>

- 
- Nasir, M. N., & Besson, F. (2012b). Conformational analyses of bacillomycin D, a natural antimicrobial lipopeptide, alone or in interaction with lipid monolayers at the air–water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 387(1), 187-193. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.07.091>
- Nunes, J., Charneira, C., Nunes, C., Gouveia-Fernandes, S., Serpa, J., Morello, J., & Antunes, A. M. M. (2019). A Metabolomics-Inspired Strategy for the Identification of Protein Covalent Modifications. *Frontiers in Chemistry*, 7, 532. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00532>
- 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>
- Peterson, A., Hohmann, L., Huang, L., Kim, B., Eng, J. K., & Martin, D. B. (2009). Analysis of RP-HPLC loading conditions for maximizing peptide identifications in shotgun proteomics. *Journal of proteome research*, 8(8), 4161-4168. <https://doi.org/10.1021/pr9001417>
- Raddadi, N., Crotti, E., Rolli, E., Marasco, R., Fava, F., & Daffonchio, D. (2012). The Most Important *Bacillus* Species in Biotechnology. En E. Sansinenea (Ed.), *Bacillus thuringiensis Biotechnology* (pp. 329-345). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-3021-2\\_17](https://doi.org/10.1007/978-94-007-3021-2_17)
- Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R. H., Dufour, S. E., Veening, J.-W., Arrebola, E., Cazorla, F. M., Kuipers, O. P., Paquot, M., & Pérez-García, A. (2007). The Iturin and Fengycin Families of Lipopeptides Are Key Factors in Antagonism of *Bacillus subtilis* Toward *Podosphaera fusca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 20(4), 430-440. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-4-0430>

- Schneider, T., Müller, A., Miess, H., & Gross, H. (2014). Cyclic lipopeptides as antibacterial agents – Potent antibiotic activity mediated by intriguing mode of actions. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(1), 37-43. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.08.009>
- Sharma, R., Singh, J., & Verma, N. (2018). Production, characterization and environmental applications of biosurfactants from *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 132-139. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.07.028>
- Sharma, R., Singh, J., & Verma, N. (2020). Statistical optimization and comparative study of lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* SAS-1 and *Bacillus subtilis* BR-15. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 25, 101575. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101575>
- Sudarmono, P., Wibisana, A., Listriyani, L. W., & Sungkar, S. (2019). *Characterization and Synergistic Antimicrobial Evaluation of Lipopeptides from Bacillus amyloliquefaciens Isolated from Oil-Contaminated Soil* [Research Article]. *International Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1155/2019/3704198>
- Talero-Pérez, Y. V., Medina, O. J., & Rozo-Núñez, W. (2013). Técnicas analíticas contemporáneas para la identificación de residuos de sulfonamidas, quinolonas y cloranfenicol. *Universitas Scientiarum*, 19(1), 11-28. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC19-1.taci>
- Wade, L. G. (2013). *Química orgánica*. Pearson Educación. Vol. 1. Recuperado el 31 de mayo del 2021, de [https://www.academia.edu/37365645/Quimica\\_Orgánica\\_L\\_G\\_Wade\\_Vol](https://www.academia.edu/37365645/Quimica_Orgánica_L_G_Wade_Vol)

- Yang, H., Li, X., Li, X., Yu, H., & Shen, Z. (2015). Identification of lipopeptide isoforms by MALDI-TOF-MS/MS based on the simultaneous purification of iturin, fengycin, and surfactin by RP-HPLC. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(9), 2529-2542. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8486-8>
- Yoshida, H., Yamazaki, J., Ozawa, S., Mizukoshi, T., & Miyano, H. (2009). Advantage of LC-MS Metabolomics Methodology Targeting Hydrophilic Compounds in the Studies of Fermented Food Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4), 1119-1126. <https://doi.org/10.1021/jf803235m>
- Zhao, H., Shao, D., Jiang, C., Shi, J., Li, Q., Huang, Q., Rajoka, M. S. R., Yang, H., & Jin, M. (2017). Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(15), 5951-5960. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8396-0>

# **3. Evaluación de la toxicidad del extracto BS57 obtenido de la bacteria marina *Bacillus velezensis* INV FIR31**

## **Resumen**

El uso indiscriminado de pesticidas de origen químico en la agroindustria ha dado lugar a problemáticas de tipo ambiental y de salud pública, actualmente se investigan alternativas como el uso de metabolitos antimicrobianos para el control de patógenos en campo pero se requiere un proceso de registro riguroso y exhaustivo para evitar cualquier efecto tóxico no deseado en los otros elementos del medio ambiente. Por lo anterior, se estudió la citotóxicidad (ensayo hemólisis) a 33, 50, 66, 83, 100, 200, 300 y 400 ppm y la ecotoxicidad (sobre nauplios de *Artemia Franciscana*) del extracto BS57, obtenido de la bacteria marina *Bacillus Velezensis* INV FIR31 a una concentración de 33, 66, 200 y 400 ppm. El mayor porcentaje de hemólisis registrado fue 2,11% correspondiente a la mayor concentración evaluada de 400 ppm y el menor porcentaje de hemólisis registrado 0,05 % corresponde a la menor concentración evaluada de 33 ppm. Los resultados de ecotoxicidad evidenciaron un efecto moderadamente tóxico del extracto a concentraciones de 400 y 200 ppm con porcentajes de mortalidad de 40,47 y 25,35% respectivamente. Estos resultados permiten considerar la concentración ideal para la aplicación en campo de un producto empleando como componente activo el extracto evaluado sin daños futuros a los seres vivos y el medio ambiente.

## **Palabras Claves**

Hemólisis, Ecotoxicidad, Bioplaguicida. Lipopéptido

## **1. Introducción**

El uso indiscriminado de pesticidas de origen químico en la agroindustria ha dado lugar a problemáticas de tipo ambiental y de salud pública. La Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y Agricultura (FAO), en los últimos años través de documentos

como El Código internacional de conducta para el manejo de plaguicidas, ha mostrado una alta preocupación por el uso cotidiano de estos químicos ya que contribuyen a la crisis de la agricultura que dificulta la preservación de los ecosistemas, los recursos naturales, y afecta la salud de las comunidades rurales y de los consumidores urbanos (Del puerto *et al.* 2014; Organización Mundial de la Salud, 2014), por lo que muchos países han adoptado lineamientos estrictos para el uso de ellos, de allí surge la necesidad de buscar estrategias biológicas para el manejo fitosanitario de cultivos, de bajo impacto ambiental y seguras para la población, así que cualquier extracto, fracción o compuesto con actividad antimicrobiana, con potencial agroindustrial debe ser evaluado en laboratorio para conocer su grado de toxicidad. Los bioplaguicidas están incluidos, como herramienta de protección de cultivos, en las prácticas de Manejo Integrado de Plagas (MIP) que hoy en día están ganando cada vez más aceptación en el mundo (Chandler *et al.*, 2011). Entre los agentes de control biológico, se destacan las bacterias aeróbicas formadoras de esporas, debido a sus propiedades insecticidas, antimicrobianas y capacidad para estimular las defensas en las plantas (Raddadi *et al.*, 2012). Es por esto que las bacterias del género *Bacillus* constituyen la clase más importante de productos microbianos utilizados comercialmente en todo el mundo para protección de cultivos (Pérez-García *et al.*, 2011).

El uso de metabolitos antimicrobianos para el control de patógenos en campo requiere un proceso de registro riguroso y exhaustivo para evitar cualquier efecto no deseado en los otros elementos del medio ambiente. En este sentido, los riesgos asociados con metabolitos microbianos antagonistas a menudo se evalúan de manera similar a los fungicidas de molécula única. Dada la diversidad de los metabolitos y los diferentes modos de acción, esta información es necesaria para el nuevo registro de agentes microbianos como biopesticidas (Malviya *et al.*, 2020).

El ensayo de hemólisis es una de las pruebas más usadas y de gran utilidad para determinar el grado de citotoxicidad de un compuesto, fracción o sustancia candidata a fármaco, ya que la sangre es una de las fronteras de transporte de las moléculas. (Aloisio *et al.*, 2018; Pagliara & Caroppo, 2011)

Los bioensayos de toxicidad permiten evaluar el grado de afectación en organismos vivos y éstos pueden ser agudos o crónicos. Las pruebas agudas cuantifican las concentraciones letales de un xenobiótico a una especie en particular (Corpus Sjogreen, 2010). La

estimación de la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) corresponde a la concentración de un xenobiótico que causa la muerte al 50 % de la población experimental, sin embargo, en los modelos usados, los costos, la mano de obra y los requerimientos éticos, ha llevado a los investigadores a plantear diversos métodos en laboratorio para estimar la  $DL_{50}$ , entre ellos el estudio de ecotoxicidad usando organismos modelos como *Blepharisma*, organismo unicelular de estanque, *Daphnia* o pulgas de agua y diferentes especies de *Artemia* conocidos como camarones de salmuera, los cuales representan una ventaja a la hora de evaluar y descubrir productos naturales bioactivos (Lieberman, 1999; Nunes *et al.* 2006 ).

De acuerdo a lo anterior, el objetivo de esta evaluación es determinar la citotoxicidad y ecotoxicidad del extracto BS57 obtenido de la bacteria marina *Bacillus velezensis* INV FIR31, para identificar los posibles efectos secundarios asociados al uso del mismo como bioplaguicida .

## **2. Materiales y Métodos**

El extracto BS57, fue obtenido de la bacteria *Bacillus velezensis* INV FIR31 a través de la metodología de precipitación ácida como se detalla en el Capítulo 1 (Ver: Metodología 2.3, Capítulo 1). La bacteria se inoculó en medio Bushnell-Haas con melaza de caña al 1% y se incubó a 30°C con agitación constante de 140 rpm durante 24 h, el cultivo fue centrifugado con el fin de obtener el sobrenadante libre de células, seguidamente, se sometió a acidificación usando ácido clorhídrico (HCl 6 M), hasta alcanzar un pH 2,0 y se almacenó a 4°C, durante 24 h, después de este tiempo el precipitado fue recolectado por centrifugación y se resuspendió en una solución HCl 0.1 M, posteriormente se centrifugó y se retiró el sobrenadante, el pellet resultante se resuspendió en agua destilada y se liofilizó. Finalmente, el producto seco se disolvió en una mezcla de cloroformo:metanol (65:15), se filtró usando filtro Wathman N°4 y el filtrado se concentró a presión reducida usando el rotavaporador Marca Heidolph (serie 101108307). El extracto orgánico fue almacenado a temperatura ambiente (25°C).

### **2.1 Ensayo de hemólisis**

Se colectó la sangre a partir de un donante sano (Ver Anexo C: Consentimiento informado), usando heparina sódica, se centrifugó por 5 min a 2706 RCF a 20°C, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron los hematocritos con tampón fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés), se repitió el paso anterior tres veces con el propósito de concentrar los hematocritos y se ajustó a relación 1:10 ( $5 \cdot 10^8$  g/ml).

En tubos ependdorf se adicionaron 300 ul de la solución de hematocritos y cada una de las concentraciones de los extractos a evaluar hasta conseguir un volumen final de 600 ul, se evaluaron 8 concentraciones: 400, 300, 200, 100, 83, 66,6, 50 y 33,3 ppm; como controles negativos se emplearon, la solución de hematocrito, el Buffer PBS al 1% y el solvente (DMSO 1%); como controles negativos se empleó TritónX100 1% y agua desionizada. Los tratamientos y controles se incubaron por 60 min a 37°C y se centrifugaron por 10 mins a 676 RFC finalmente se midió la absorbancia en un espectofotómetro Multiskan GO marca Thermoscientific.

El cálculo del porcentaje de hemólisis se obtuvo a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Hemólisis } I = \left( \frac{\text{Absorbancia muestra} - \text{Absorbancia blanco}}{\text{Absorbancia control positivo}} \right) * 100$$

El control positivo usado para la ecuación fue Tritón X100 al 1%. Se realizaron tres repeticiones independientes.

## **2.2 Ensayo de ecotoxicidad sobre nauplios de *Artemia franciscana***

Para la obtención de nauplios, los quistes secos fueron hidratados con agua dulce por dos horas con aireación e iluminación continua, transcurrido este tiempo se transfirieron a un recipiente con agua de mar artificial filtrada a 15 ppt de salinidad y se incubaron a temperatura entre 25-30 °C por 24 h con aireación ( $<5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) e iluminación continua de 2000 LUX para el proceso de eclosión. Para colectar los nauplios se suspendió la aireación y se dejó reposar por 15 min, se pasaron por un tamiz de 90 um para eliminar los quistes y se re-suspendieron los nauplios en agua de mar artificial filtrada.

En una placa de 96 pozos se transfirieron 10 nauplios en cada pozo y se añadieron los extractos hasta conseguir un volumen de 200 ul, se evaluaron 4 concentraciones 400, 200,

66 y 33 ppm. Como control del solvente se evaluó DMSO 1%, como control negativo agua de mar artificial filtrada y como control positivo de referencia sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) a 16 mg/L (Libralato *et al.*, 2016). La placa se incubó por 24 h a temperatura entre 25-30 °C e iluminación de 2000 LUX.

Transcurrido el tiempo de incubación se contaron los nauplios sobrevivientes en cada pocillo usando el estereomicroscopio CARL ZEISS Discovery.V8. Se realizaron tres repeticiones independientes y se calculó la  $DL_{50}$  usando el análisis Probit (Finney, 1952)

El cálculo de porcentaje de letalidad se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de letalidad} = \left( \frac{\text{No. de nauplios muerto}}{\text{control positivo}} \right) * 100$$

Los rangos de toxicidad se establecieron de acuerdo a Borroto *et al.*, (2011) (Tabla 6)

Tabla 6. Rangos de toxicidad

| Rango   | Clasificación         |
|---------|-----------------------|
| 0-10%   | No tóxico             |
| 11-50%  | Moderadamente tóxico  |
| 51-90%  | Altamente tóxico      |
| 91-100% | Extremadamente tóxico |

### 3. Resultados

#### 3.1 Ensayo de hemólisis

Las ocho diferentes concentraciones del extracto BS57 evaluadas presentaron un bajo porcentaje de hemólisis en comparación al control positivo TritónX100, el cual presentó un porcentaje de hemólisis del 98%. El mayor porcentaje de hemólisis registrado fue 2,11% correspondiente a la mayor concentración evaluada de 400 ppm y el menor porcentaje de hemólisis registrado 0,05% correspondiente a la menor concentración evaluada de 33 ppm (Tabla 7). Se pudo observar una relación

entre el incremento en la actividad hemolítica asociado al incremento de la concentración

Los porcentajes de hemólisis obtenidos en algunas concentraciones del extracto son cercanos e incluso menores a los obtenidos con los controles, Los hematocritos presentaron 0,26% de hemólisis, el control del solvente DMSO 1% tuvo 0,43% de hemólisis y el agua destilada 1,21 %.

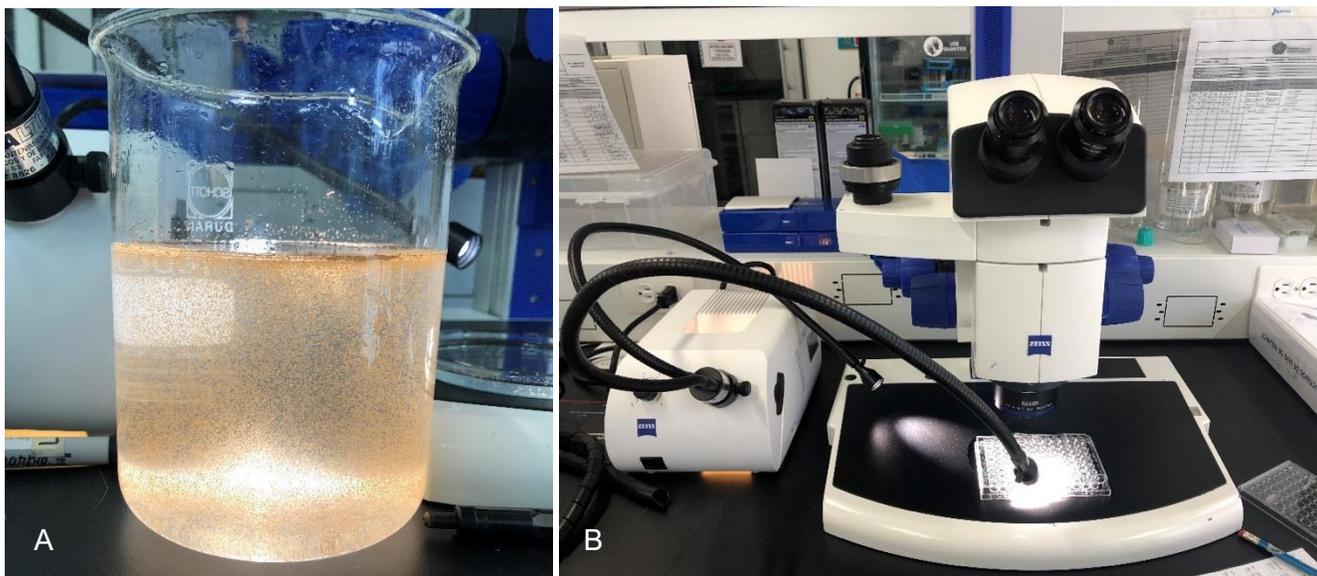
Las ocho concentraciones evaluadas, presentaron un bajo porcentaje de hemólisis en comparación al control positivo usado TRITON X100 y esto podría indicar que su uso puede ser seguro en términos de citotoxicidad hasta concentraciones de 400 ppm (199ul/L).

Tabla 7. Hemólisis del extracto BS57.

|                     |   |   |   |   |   |   |   |   |
|---------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Concentración (ppm) | 33  | 50  | 66  | 83  | 100   | 200   | 300   | 400   |
| Hemólisis (%)       | 0,08<br>±0,001  | 0,05<br>±0,001  | 0,11<br>±0,001  | 0,24<br>±0,004  | 0,18<br>±0,001  | 1,12<br>±0,001  | 1,95<br>±0,001  | 2,11<br>±0,002  |
|                     |  |  |  |    |   |  |  |  |
| Hematocritos        | <b>PBS 1X</b>   |   | <b>DMSO 1%</b>  |   | <b>TRITONX100</b>   |   | <b>H<sub>2</sub>O Desionizada</b>   |   |
|                     | 0,26 ±0,002   |   | 0,00 ±0,001   |   | 0,43 ±0,002   |   | 98,60 ±0,084  |   |
|                     |  |  |  |  |  |  |   |   |

### 3.2 Ensayo de ecotoxicidad sobre nauplios de *Artemia franciscana*

La obtención de nauplios se realizó de acuerdo a la metodología del LabBIM (PT-LABBIM-10 Versión 01), se obtuvieron 400 ml de nauplios (Figura 10A) y se realizó el conteo en la placa de 96 pozos. (Figura 10B)



**Figura 10.** Procedimiento del ensayo de ecotoxicidad. A. Fotografía de nauplios de *Artemia franciscana* eclosionados. B. Fotografía del Conteo de nauplios bajo esteromicroscopio.

Los resultados evidenciaron un efecto moderadamente tóxico del extracto BS57 a concentraciones de 400 y 200 ppm con porcentajes de mortalidad de 40,47 y 25,35% respectivamente, mientras que las concentraciones de 66 y 33 ppm, presentaron porcentajes de 4,54 y 3,78 respectivamente considerándose no tóxico, similar al resultado obtenido con DMSO 1% usado como solvente de los extractos, lo que podría sugerir algún efecto tóxico atribuible al solvente usado y no al extracto. El cálculo probit se extrapoló de la curva, debido a que los resultados obtenidos determinó que la Dosis letal media es de 864,92 ppm a las 24 horas de exposición (Ver Anexo E: Análisis Probit). Esta concentración es superior a las evaluadas en este ensayo, por lo que este resultado es tomado como una aproximación.

#### 4. Discusión

En esta investigación se realizaron diferentes evaluaciones de toxicidad (en las concentraciones 33, 50, 66, 83,100, 200, 300 y 400 ppm) del extracto obtenido de la bacteria marina *Bacillus velezensis* INV FIR31, en el cual se identificaron con anterioridad metabolitos secundarios de tipo lipopéptidos como bacilomicina D. Los resultados sugieren que el extracto no debe considerarse como tóxico, al no provocar la lisis de los hematocritos con las concentraciones evaluadas, esto contrasta con diferentes investigaciones que señalan que los lipopéptidos de la misma familia obtenidos de la bacteria *B. subtilis* son capaces de provocar la hemólisis de los glóbulos rojos humanos por un mecanismo coloide-osmótico, lo que indica que la acción del lipopéptido sobre la membrana de los eritrocitos no se debe a la rotura o solubilización de la membrana (Aranda et al., 2005; Nasir & Besson, 2012a; Thimon et al., 1992).

La evaluación de ecotoxicidad evidenció que las dos concentraciones más altas tuvieron un efecto moderadamente tóxico, mientras que en las concentraciones bajas (66 y 33 ppm), el poco efecto que se evidenció puede estar atribuido al DMSO 1% en que se estaban disueltos los extractos, sin embargo en el 2013 un estudio evaluó el efecto de diferentes solventes utilizados en este tipo de ensayos como metanol, DMSO, Tween 20 y etanol, se determinó la DL<sub>50</sub> siendo, 8.5% para DMSO, 6.4% metanol, 3.4% etanol y 2.5% para Tween 20 y se concluyó que el DMSO era el solvente más seguro en cuanto a la poca interferencia que realiza en la letalidad de las artemias (Thong *et al.*, 2013). Adicionalmente, el análisis probit permitió estimar que la dosis letal media del extracto BS-57 es de 864,92 ppm de exposición a las 24 horas (DL<sub>50</sub> (24 h) > 864 ug/ml); estudios similares se han llevado a cabo sobre el modelo del pez cebra (*Danio rerio*) con el propósito de evaluar el efecto de un lipopéptido obtenido de *B. amyloliquefaciens* y de acuerdo a los resultados y según la clasificación de la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de EE. UU., se evidenció una ligera toxicidad del lipopéptido en los embriones del pez cebra (Jin et al., 2018).

Los rangos de toxicidad de un pesticida según la EPA están definidos en tres categorías, altamente tóxica (0.1 µg / mL <DL<sub>50</sub> <1 µg / mL), moderadamente tóxica (1 µg / mL <DL<sub>50</sub> <10 µg / mL) o ligeramente tóxica. (10 µg / mL <DL<sub>50</sub> <100 µg / mL) y el definir este parámetro es fundamental para identificar los riesgos asociados al posible uso en campo de un compuesto (Relyea, 2011). Cabe mencionar, que en el extracto BS57, los

lipopéptidos de interés no se encuentran purificados y es posible que el efecto tóxico varíe de acuerdo a las características de cada lipopéptido de la mezcla. Por otra parte en el 2017, los lipopéptidos con actividad antifúngica derivados de la bacteria *B. marinus* fueron evaluados en roedores para determinar la toxicidad aguda sistémica y de acuerdo a la categoría toxicológica usada en el estudio, los resultados sugirieron que los lipopéptidos se identificaran como sustancias de baja toxicidad y que cumplían con los estrictos requisitos del registro de plaguicidas en China (Gu et al., 2017), en este sentido todos los estudios mencionados coinciden en afirmar que los lipopéptidos de la familia de las iturinas posee una toxicidad ligera o baja, y son considerados una alternativa amigable con el medio ambiente a las concentraciones requeridas para que presenten un efecto antagonista contra un fitopatógeno como el hongo causante de Antracnosis, sin embargo, se sugieren la importancia de evaluar el efecto del extracto antifúngico sobre la fisiología vegetal e insectos.

### **Conclusión**

Los lipopéptidos presentes en el extracto BS57, presentaron una baja citotoxicidad y ecotoxicidad moderada hasta las 400 ppm, sin embargo, la concentración debe ser un factor para tener en cuenta al momento de considerarse para la aplicación en campo. Estos resultados, indican que los lipopéptidos producidos por bacterias del género *Bacillus* spp. son un recurso prometedor para el desarrollo de bioplaguicidas respetuosos con el medio ambiente y seguros para el consumidor.

### **Referencias**

- Aloisio, E., Carnevale, A., Pasqualetti, S., Birindelli, S., Dolci, A., & Panteghini, M. (2018). Random uncertainty of photometric determination of hemolysis index on the Abbott Architect c16000 platform. *Clinical Biochemistry*, 57, 62-64. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.01.009>

- 
- Aranda, F. J., Teruel, J. A., & Ortiz, A. (2005). Further aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin A. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1713(1), 51-56. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.05.003>
- Borroto, J., Reinaldo Trujillo, Yael C. de la Torre, Noemí Waksman, Martha Hernández, & Ricardo Salazar. (2011). Actividad antimicrobiana y toxicidad frente a *Artemia salina* del extracto diclorometánico de raíces de *Morinda royoc* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 16(1), 34-42. Recuperado el 29 de mayo del 2021, de <https://www.medigraphic.com/pdfs/revcubplamed/cpm-2011/cpm111d.pdf>
- Chandler, D., Bailey, A. S., Tatchell, G. M., Davidson, G., Greaves, J., & Grant, W. P. (2011). The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1573), 1987-1998. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0390>
- Corpus Sjogreen, A. M. (2010). Determinación de la concentración letal media (CL50-96) del aluminio mediante pruebas toxicológicas utilizando alevinos de *Oncorhynchus mykiss* (Trucha arco iris). Universidad de la Salle. Recuperado el 30 de mayo del 2021, de [https://ciencia.lasalle.edu.co/ing\\_ambiental\\_sanitaria/511](https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_ambiental_sanitaria/511)
- Finney, D. J. (1952). Probit Analysis (2nd Ed). *Journal of the Institute of Actuaries*, 78(3), 388-390. <https://doi.org/10.1002/jps.3030411125>
- Gu, K., Zhang, D., Guan, C., Xu, J., Li, S., Shen, G., Luo, Y., & Li, Y. (2017). Safe antifungal lipopeptides derived from *Bacillus marinus* B-9987 against grey mold caused by *Botrytis cinerea*. *Journal of Integrative Agriculture*, 16(9), 1999-2008. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(16\)61616-7](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61616-7)
- Jin, P., Wang, H., Liu, W., Fan, Y., & Miao, W. (2018). A new cyclic lipopeptide isolated from *Bacillus amyloliquefaciens* HAB-2 and safety evaluation. *Pesticide*

*Biochemistry and Physiology*, 147, 40-45.

<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.08.015>

Libralato, G., Prato, E., Migliore, L., Cicero, A. M., & Manfra, L. (2016). A review of toxicity testing protocols and endpoints with *Artemia* spp. *Ecological Indicators*, 69, 35-49.

<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.04.017>

Lieberman, M. (1999). A Brine Shrimp Bioassay for Measuring Toxicity and Remediation of Chemicals. *Journal of Chemical Education*, 76(12), 1689.

<https://doi.org/10.1021/ed076p1689>

Malviya, D., Sahu, P. K., Singh, U. B., Paul, S., Gupta, A., Gupta, A. R., Singh, S., Kumar, M., Paul, D., Rai, J. P., Singh, H. V., & Brahmaprakash, G. P. (2020). Lesson from Ecotoxicity: Revisiting the Microbial Lipopeptides for the Management of Emerging Diseases for Crop Protection. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(4), 1434. <https://doi.org/10.3390/ijerph17041434>

Nasir, M. N., & Besson, F. (2012). Conformational analyses of bacillomycin D, a natural antimicrobial lipopeptide, alone or in interaction with lipid monolayers at the air–water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 387(1), 187-193.

<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.07.091>

Nunes, B. S., Carvalho, F. D., Guilhermino, L. M., & Van Stappen, G. (2006). Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environmental Pollution*, 144(2), 453–462.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.12.037>

Organización Mundial de la Salud. (2014). *Código Internacional de Conducta para la Gestión de Plaguicidas*. Recuperado el 30 de mayo del 2021, de <http://www.fao.org/3/a-i3604s.pdf>

- 
- Pagliara, P., & Caroppo, C. (2011). Cytotoxic and antimetabolic activities in aqueous extracts of eight cyanobacterial strains isolated from the marine sponge *Petrosia ficiformis*. *Toxicon*, 57(6), 889-896. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.03.006>
- Pérez-García, A., Romero, D., & de Vicente, A. (2011). Plant protection and growth stimulation by microorganisms: Biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2), 187-193. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.12.003>
- Raddadi, N., Crotti, E., Rolli, E., Marasco, R., Fava, F., & Daffonchio, D. (2012). The Most Important Bacillus Species in Biotechnology. En E. Sansinenea (Ed.), *Bacillus thuringiensis Biotechnology* (pp. 329-345). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-3021-2\\_17](https://doi.org/10.1007/978-94-007-3021-2_17)
- Relyea, R. A. (2011). Chapter 9. Amphibians Are Not Ready for Roundup®. En *Wildlife Ecotoxicology: Forensic Approaches, Emerging Topics in Ecotoxicology* (pp. 267-300). Springer Science. Recuperado el 29 de mayo del 2021, de <https://www.biology.pitt.edu/sites/default/files/facilities-images/Relyea%20286.pdf>
- Thimon, L., Peypoux, F., Maget-Dana, R., Roux, B., & Michel, G. (1992). Interactions of bioactive lipopeptides, iturin A and surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 16(2), 144-151.
- Thong, O., Chiew, S., Geethaa, S., & Thavamany, P. (2013). Interference from ordinarily used solvents in the outcomes of *Artemia salina* lethality test. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 4(4), 179. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.121411>

# Conclusiones

El screening antifúngico con las bacterias marinas *Micromonospora* spp. INV ACT5, *Pseudoalteromonas* spp. INV PRT33, *Bacillus* sp. INV FIR35, *Bacillus* sp. INF FIR48, *B. safensis* INV FIR26, *B. velezensis* INV FIR31, presentó porcentajes de inhibición de crecimiento micelial entre 4 y 40%, siendo *B. velezensis* INV FIR 31 y *Bacillus* sp. INV FIR48 las bacterias con los más altos con porcentajes promedio de 40% y 34%.

La evaluación del extracto producido por la bacteria *B. velezensis* INV FIR31, denominado BS57 fue evaluado sobre frutos de mango var. Hilaza, inoculados con cuatro especies del hongo *Colletotrichum* spp. *C. tropicale* C003, *C. gloeosporioides* C004, *C. karstii* C013, *C. asianum* C021, causantes de Antracnosis, encontrando porcentajes en el control de la enfermedad de 42, 89, 91 y 92%. Resultado que demuestra que las bacterias de origen marino representan una fuente promisoría de compuestos antifúngicos que podrían ser aplicados al sector agroindustrial, siendo el género *Bacillus* spp. uno de los grupos más estudiados para el control biológico.

Las herramientas bioinformáticas permitieron identificar preliminarmente, la presencia de genes capaces de sintetizar metabolitos secundarios de tipo lipopéptidos en genomas reportados de estos mismos géneros, como posibles responsables de la actividad antifúngica, estos resultados fueron corroborados, a través del análisis químico del extracto BS57 empleando espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier y cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas, evidenciando que la bacteria *Bacillus velezensis* INV FIR31 es capaz de sintetizar el lipopéptido Bacilomicina D, sin embargo, no se descarta la presencia de otros metabolitos involucrados en la actividad antifúngica ya que se evaluó un extracto crudo en el que puede haber presencia de otros compuestos.

El análisis TGA del extracto BS57 también sugiere que el extracto sólido tiene una propiedad de estabilidad térmica hasta los 190°C aproximadamente, una característica importante para el futuro desarrollo de productos aplicables en campo que contenga dicho extracto como componente activo. Además, dicho extracto BS57, presentó una baja citotoxicidad y una ecotoxicidad moderada hasta una concentración máxima de 400 ppm.

Se concluye que los lipopéptidos producidos por la bacteria *B. velezensis* INV FIR, principalmente del grupo iturina, son un recurso prometedor para el desarrollo de biofúngidas respetuosos con el medio ambiente, seguros para el consumidor y eficaces para el control biológico de Antracnosis en frutos de mango.

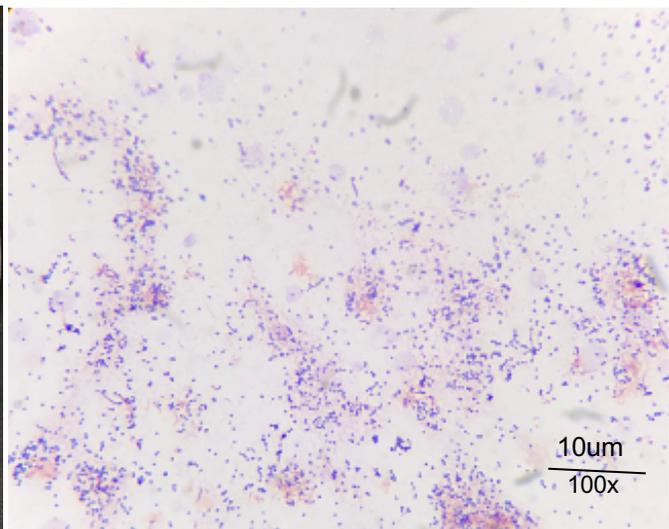
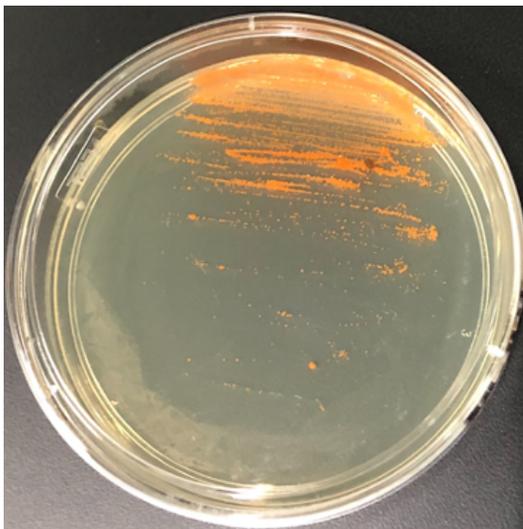
Las bacterias de origen marino representan una fuente promisoría de compuestos antifúngicos que podrían ser usados por el sector agroindustrial, siendo el género *Bacillus* spp. el grupo más estudiado para control biológico, por tal motivo lo evidenciado es este estudio representa un enfoque novedoso para abordar problemáticas fitosanitarias en el país desde la bioprospección y el futuro desarrollo de bioplaguicidas.

# Anexo A: Descripción de los microorganismos evaluados.

## A.1 Bacterias de Origen Marino.

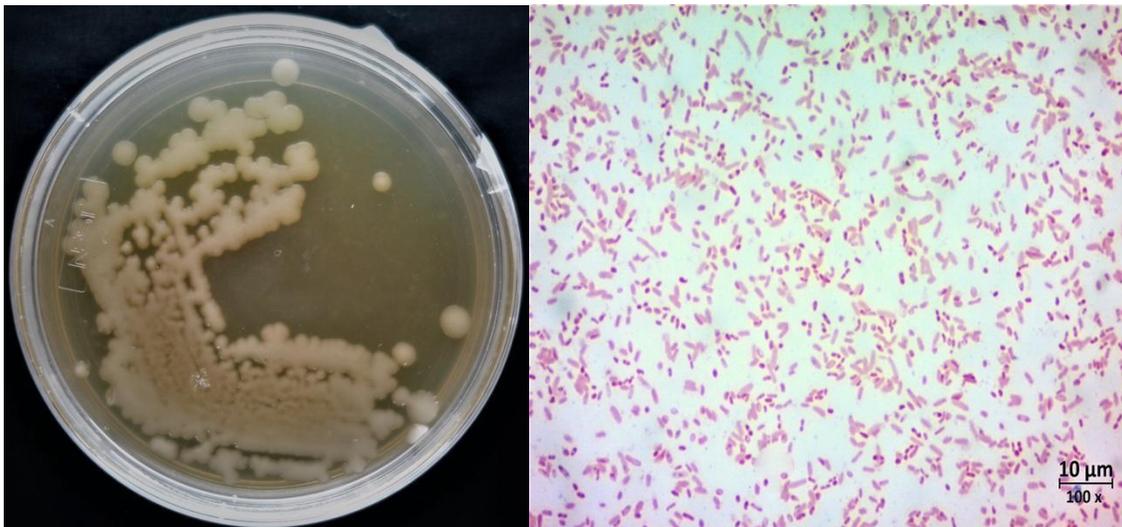
### *Micromonospora* sp. INV ACT5

Dominio: Bacteria  
Filo: Actinobacteria  
Clase: Actinobacteria  
Orden: Actinomycetales  
Suborden: Micromonosporineae  
Familia: Micromonosporaceae  
Género: *Micromonospora*



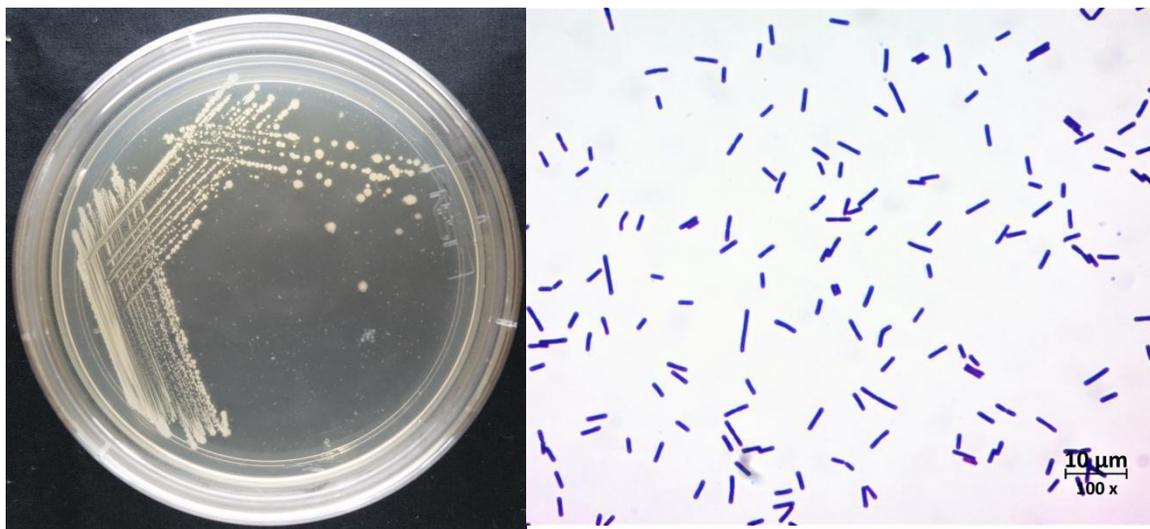
### *Pseudoalteromonas* PRT INV3

Dominio: Bacteria  
Filo: Proteobacteria  
Clase: Proteobacteria Gamma  
Orden: Alteromonadales  
Familia: Pseudoalteromonadaceae  
Género: *Pseudoalteromonas*



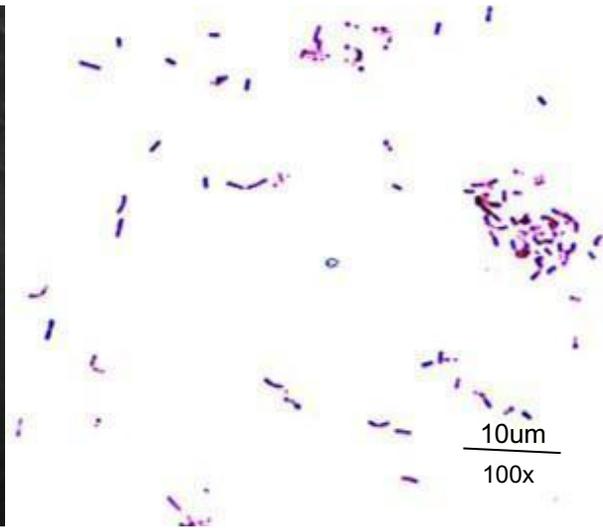
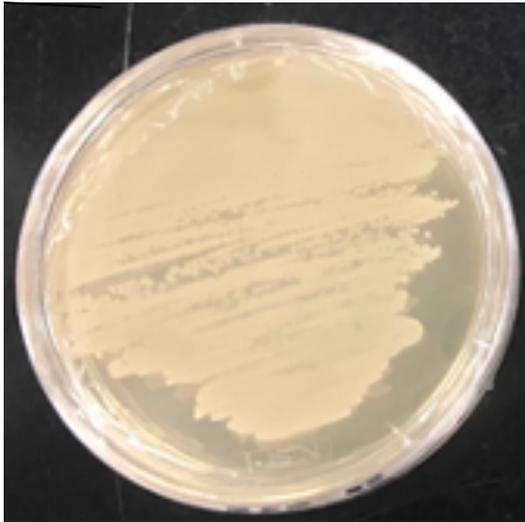
***Bacillus subtilis* INV FIR48**

Dominio: Bacteria  
Filo: Firmicutes  
Clase: Bacilli  
Orden: Bacillales  
Familia: Bacillaceae  
Género: *Bacillus*  
Especie: *Bacillus cf. subtilis*



***Bacillus safensis* INV FIR26**

Dominio: Bacteria  
Filo: Firmicutes  
Clase: Bacilli  
Orden: Bacillales  
Familia: Bacillaceae  
Género: *Bacillus*  
Especie: *Bacillus safensis*

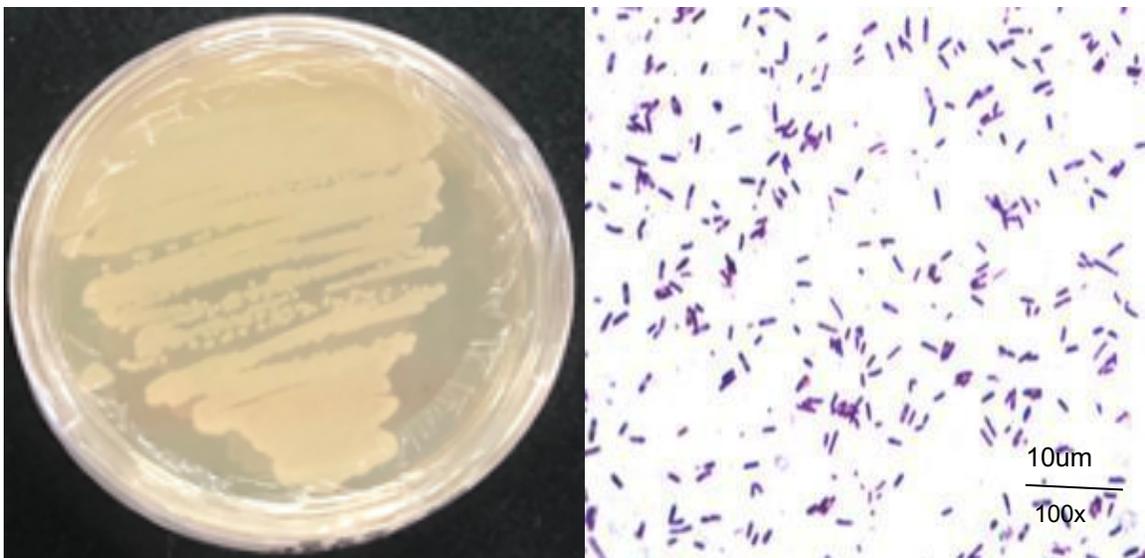
***Bacillus velezensis* INV FIR31**

Dominio: Bacteria  
Filo: Firmicutes  
Clase: Bacilli  
Orden: Bacillales  
Familia: Bacillaceae  
Género: *Bacillus*  
Especie: *Bacillus velezensis*



***Bacillus* sp. INV FIR35**

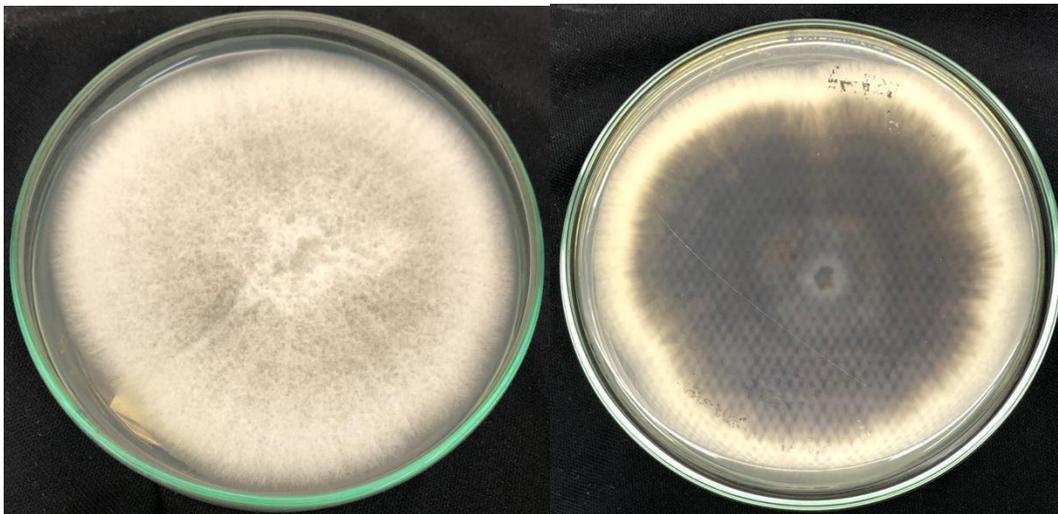
Dominio: Bacteria  
Filo: Firmicutes  
Clase: Bacilli  
Orden: Bacillales  
Familia: Bacillaceae  
Género: *Bacillus*



## A2. Hongos fitopatógenos

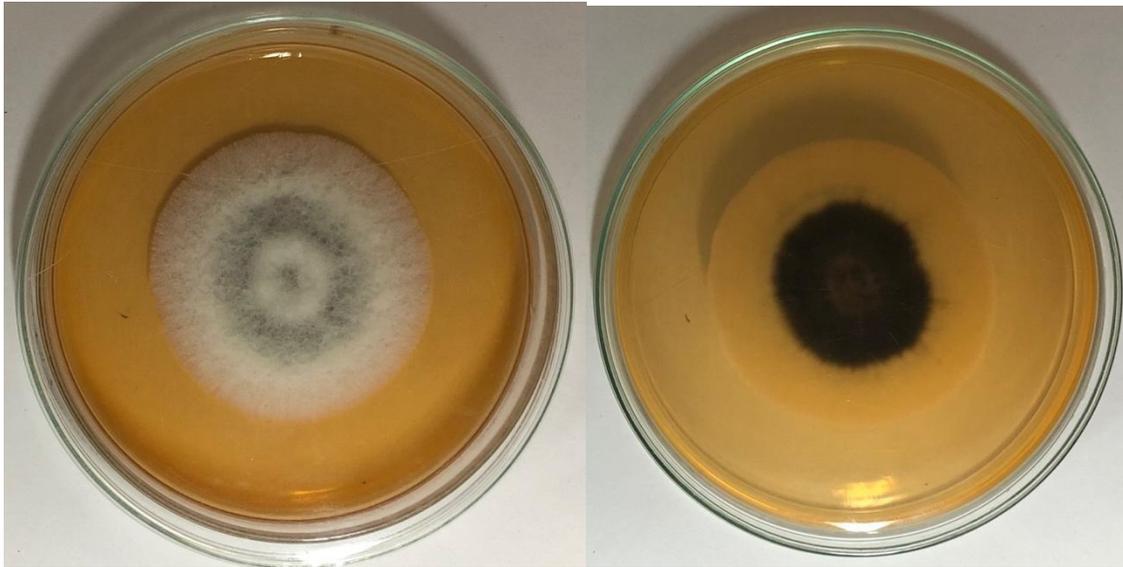
### ***Colletotrichum tropicale* C003**

Reino: Fungi  
División: Ascomycota  
Clase: Sordariomycetes  
Orden: Glomerellales  
Familia: Glomerellaceae  
Género: *Colletotrichum*  
Especie: *Colletotrichum tropicale*



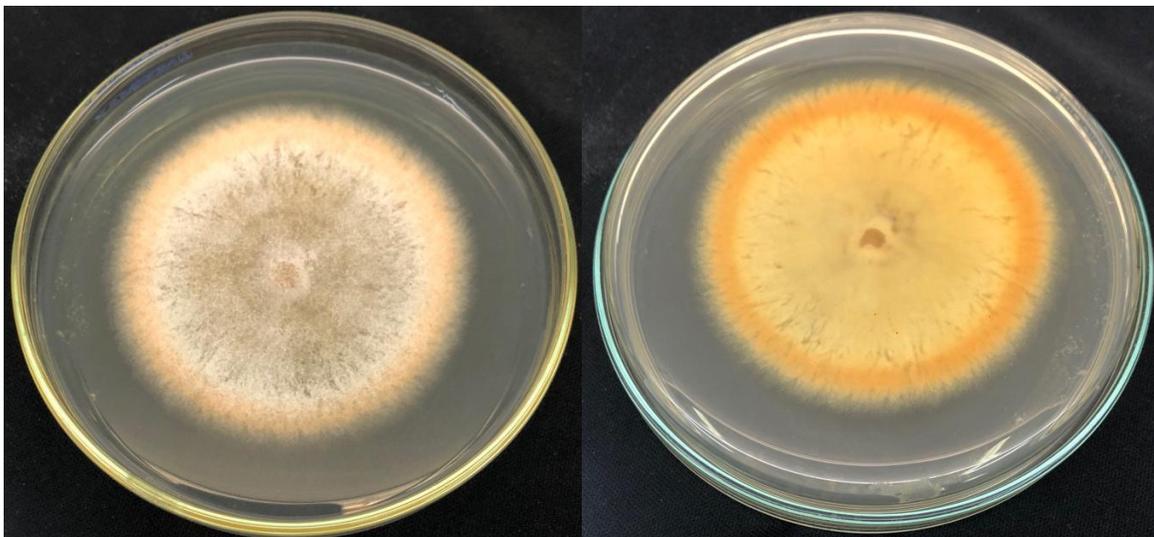
### ***Colletotrichum gloeosporioides* C004**

Reino: Fungi  
División: Ascomycota  
Clase: Sordariomycetes  
Orden: Glomerellales  
Familia: Glomerellaceae  
Género: *Colletotrichum*  
Especie: *Colletotrichum gloeosporioides*



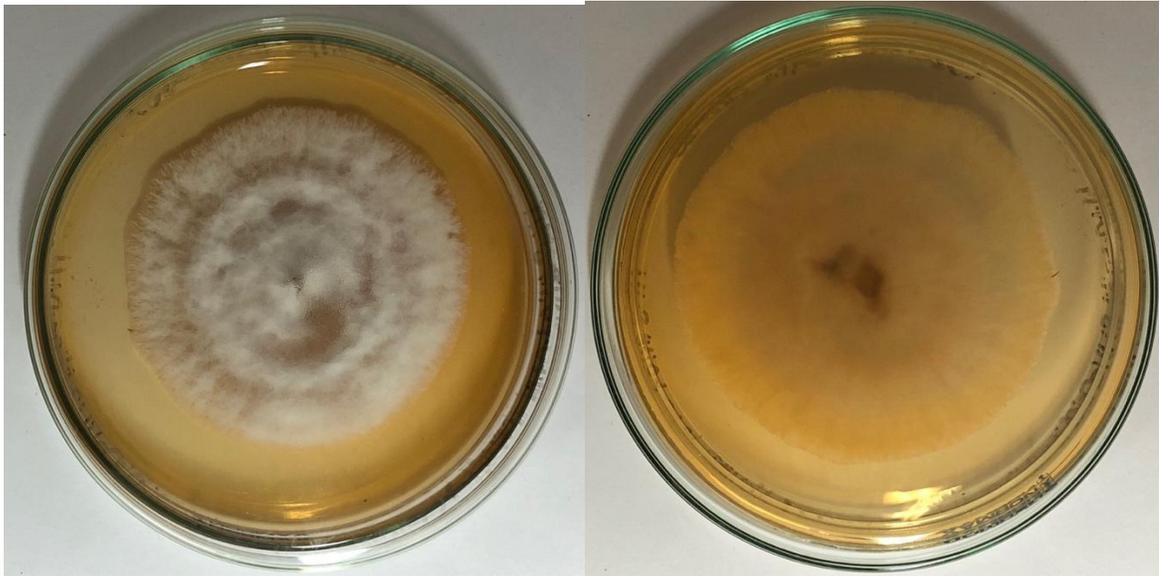
***Colletotrichum karstii* C013**

Reino: Fungi  
División: Ascomycota  
Clase: Sordariomycetes  
Orden: Glomerellales  
Familia: Glomerellaceae  
Género: *Colletotrichum*  
Especie: *Colletotrichum karstii*



***Colletotrichum asianum* C021**

Reino: Fungi  
División: Ascomycota  
Clase: Sordariomycetes  
Orden: Glomerellales  
Familia: Glomerellaceae  
Género: *Colletotrichum*  
Especie: *Colletotrichum asianum*



# Anexo B: Evaluación de Viabilidad bacteriana usando el extracto de la bacteria marina *Bacillus velezensis* INV FIR31

## Materiales y Métodos

Se utilizó el Kit de viabilidad bacteriana BacLight LIVE / DEAD®™ (L7012) que contiene el colorante SYTO 9, 3,34 mM y el colorante yoduro de propidio PI, 20 mM.

La bacteria patógena empleada fue *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM), y fue otorgada por el Laboratorio de Bioprospección Marina del INVEMAR.

SARM se cultivó en caldo tripticasa de soya (TSB), a 30°C por 16 horas en agitación constante (140 rpm), pasado el tiempo de incubación, se ajustó la concentración a la escala 0.5 McFarland (0.090 - 0.100), se añadió 1 ml de la suspensión ajustada a tubo eppendorff para concentrar las células bacterianas por centrifugación a 10.000g (10.249 rpm) por 12 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 1 ml de solución salina 0.9%, se aplicaron los tratamientos del extracto a concentraciones de 50, 100, 200 y 400 ppm y se usó isopropanol al 70% como control positivo y solución salina como control negativo, también se evaluó un control de solvente de los extractos, DMSO al 1%.

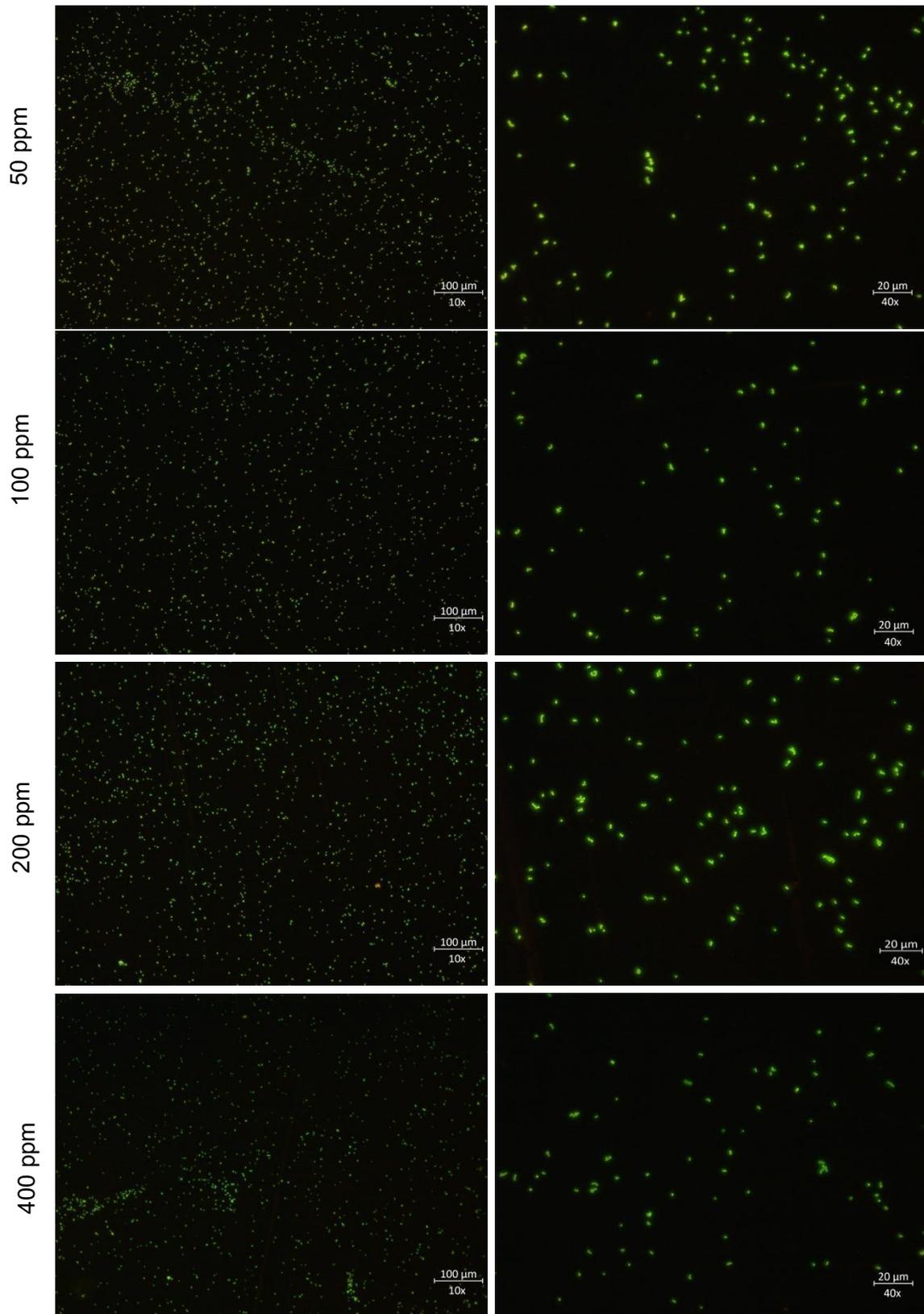
Se incubaron las muestras por 60 minutos a la oscuridad, mezclando cada 15 minutos, después se realizó un lavado, centrifugando a 10.000 g por 12 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 1 ml de solución salina 0.9%.

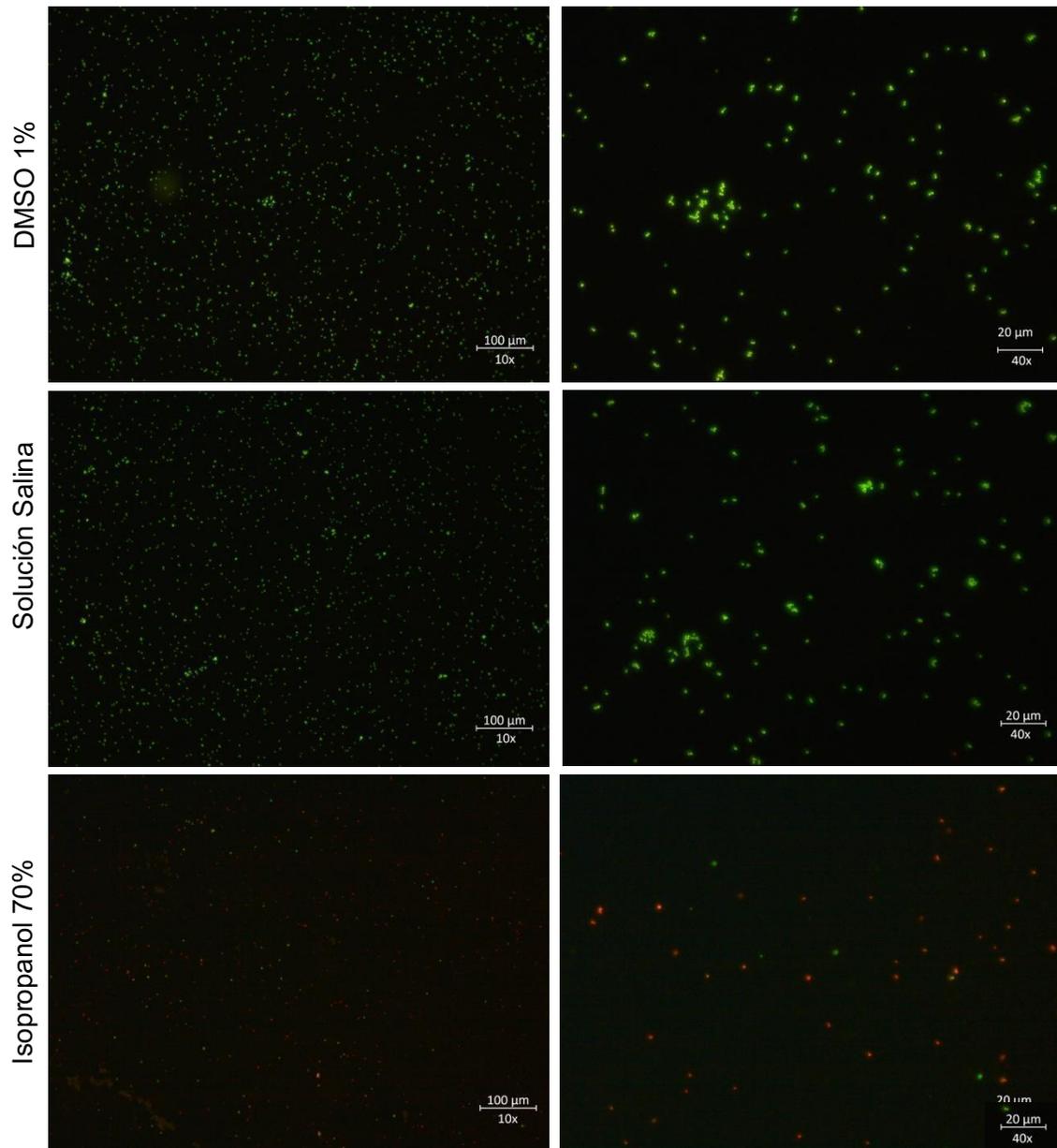
Para la tinción, se combinaron volúmenes iguales de colorante SYTO y PI en un tubo de centrífuga eppendorf y se mezclaron por 5 minutos, se agregaron 3 µL de la mezcla del colorante por cada mL de la suspensión bacteriana se mezcló esta suspensión y se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad durante 15 min. Finalmente se tomaron 7 µL de la suspensión bacteriana teñida entre un portaobjetos y un cubreobjetos cuadrado de 18 mm.

La observación se realizó con el microscopio Axio Scope A.1 marca ZEISS acoplado con a un equipo con un filtro de epifluorescencia

### **Resultados**

Las diferentes concentraciones evaluadas mostraron no afectar la membrana celular de las bacterias (Figura 1). Al homogeneizar la concentración bacteriana en cada ensayo se pudo visualizar de manera clara la morfología de coco característica de la bacteria en todos los tratamientos, de igual manera se pudo comprobar que el solvente usado en el extracto no genera daño en las bacterias, por otro lado el isopropanol al 70% ocasionó daño en la mayoría de las células bacterianas. De acuerdo a lo observado se sugiere que los compuestos del extracto BS57 no poseen actividad antibacteriana hasta concentraciones de 400 ppm en función de que no altera la membrana celular bacteriana. Estos resultados son de tipo cualitativos pero se recomienda implementar un software de procesamiento de imágenes para asignar valores cuantitativos. Park & Kim (2018) establecieron una correlación cuantitativa positiva entre el recuento directo de colonias y las medidas de viabilidad bacteriana con tinción celular de fluorescencia, como la usada en este estudio por lo que esta técnica resulta ser adecuada y rápida para la evaluación de sustancias con potencial antimicrobiano.





**Figura 1.** Evaluación con Live/Dead BacLight® kit del efecto de las concentraciones del extracto BS-57 sobre SARM. Verde indica viabilidad y rojo daño en la membrana.

## Referencias

- Park, S. Y., & Kim, C. G. (2018). A comparative study of three different viability tests for chemically or thermally inactivated *Escherichia coli*. *Environmental Engineering Research*, 23(3), 282-287. <https://doi.org/10.4491/eer.2017.223>

# Anexo C: Consentimiento informado ensayo de citotoxicidad (Prueba de hemólisis)

## FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

**Título del estudio:** Búsqueda de sustancias activas de microorganismos de ambientes marino-costeros para su potencial aplicación en los sectores: Salud, Industria, Agropecuario y Ambiente.

**Investigador Principal:** Javier Gómez León

**Co-investigadores:** Lina Marcela Blandón García, Laura Marcela Jutinico Subach, Marynes Quintero De La Hoz, Manuela Montoya Giraldo, Albert Patiño, Kathleen Lorena Alvarado, Laura Díaz, Carolina Villamil, Erika Andrea Puentes.

**Entidad donde se desarrolla la investigación:**

Laboratorio de Bioprospección Marina del Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras "José Benito Vives de Andrés" INVEMAR- Calle 25 No. 2-55, Playa Salguero, Santa Marta D.T.C.H., Colombia.

**Naturaleza y Objetivo del estudio:**

El presente estudio de investigación corresponde a un estudio experimental, que consiste en evaluar de manera *in vitro* el efecto citotóxico de sustancias obtenidas a partir de microorganismos aislados del sedimento marino-costero sobre un cultivo primario de células humanas.

**Propósito**

Este consentimiento tiene el propósito de solicitar su autorización para participar en el estudio "Búsqueda de sustancias activas de microorganismos de ambientes marino-costeros para su potencial aplicación en los sectores: Salud, Industria, Agropecuario y Ambiente" que pretende incrementar el conocimiento de la biodiversidad de microorganismos marino-costeros, con potencial aplicación en los sectores: Salud, Agro, industria y Ambiente, realizando ensayos *in vitro* de actividad biológica, empleando técnicas de microbiología clásica, químicas, moleculares y bioinformáticas; garantizando su conservación y documentación.

**Procedimiento**

Si usted acepta participar en este estudio, se le solicitará permitir la toma de muestras de sangre periférica, la cual será utilizada únicamente para este estudio, asimismo se le solicitará información sobre su tipo de grupo sanguíneo con factor RH y acudir nuevamente al lugar de investigación o ser contactado por el investigador una o dos veces.

**Riesgos asociados a su participación en el estudio**

Su participación en este estudio presenta para usted un riesgo mínimo, ya que se le tomarán muestras de sangre (3 mL) una o dos veces, por punción venosa, bajo condiciones asépticas

y este procedimiento será realizado solo por profesionales con conocimiento y experiencia del área de microbiología, con el fin de garantizar su bienestar e integridad. Los ensayos de citotoxicidad sólo serán realizados de manera *in vitro* sobre el cultivo primario de células, las cuales serán obtenidas a partir de la muestra de sangre extraída.

#### **Beneficios de su participación en el estudio**

La participación en el estudio no genera un beneficio directo para usted, pero los resultados obtenidos del estudio podrán generar beneficio futuro para la comunidad, asimismo contribuirá con el incremento del conocimiento sobre el potencial de los productos obtenidos de la biodiversidad de microorganismos marino-costeros, con potencial aplicación en los sectores como salud, agro, industria y ambiente.

#### **Voluntariedad**

Su participación es voluntaria. Si usted decide no participar ó retirarse del estudio en cualquier momento, aun cuando haya iniciado su participación del estudio puede hacerlo sin que esto ocasione una sanción o castigo para usted.

#### **Confidencialidad**

Si usted decide participar, garantizamos que toda la información suministrada será manejada con absoluta confidencialidad, sus datos personales no serán publicados ni revelados, el investigador principal se hace responsable de la custodia y privacidad de los mismos.

#### **Compartir los resultados**

Los resultados originados a partir de la investigación, serán compartidos en tiempos adecuados con fines académicos en revistas científicas, conferencias, seminarios, congresos, entre otros, manteniendo la información personal de forma confidencial.

#### **Conflicto de interés del investigador:**

El investigador no tiene conflicto de interés con los participantes ni con los patrocinadores.

#### **Contactos:**

Si tiene dudas puede comunicarse con el investigador principal **Javier Gómez León** al teléfono 4328600 EXT 231, Dirección calle 25 No. 2-55, Playa Salguero, Santa Marta y al correo electrónico [Javier.gomez@invemar.org.co](mailto:Javier.gomez@invemar.org.co).

Declaro que he entendido la información que se expone en este consentimiento y me han respondido las dudas e inquietudes surgidas.

**Autorización**

Yo Juan Manjarrés Hincapié estoy de acuerdo o acepto participar en el presente estudio.

Para constancia, firmo a los 4 días del mes de Marzo del año 2020.

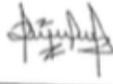
Juan Manjarrés 1083967137

Firma y Cédula del participante

**Declaración del Investigador**

Yo certifico que le he explicado a esta persona la naturaleza y el objetivo de la investigación, y que esta persona entiende en qué consiste su participación, los posibles riesgos y beneficios implicados. Todas las preguntas que esta persona ha hecho le han sido contestadas en forma adecuada. Así mismo, he leído y explicado adecuadamente las partes del consentimiento informado. Hago constar con mi firma.

Nombre del Investigador. Javier Góñez León

Firma 

Fecha (dd/mm/aaaa) 04/03/2020

## Anexo D: Análisis estadísticos.

**Tabla D1.** ANOVA para el cribado inicial de las bacterias marinas contra *Collectotrichum* sp. C003.  $\alpha = 0.05$

| Fuente             | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Valor F | Valor P               |
|--------------------|--------------------|-------------------|----------------|---------|-----------------------|
| <b>Tratamiento</b> | 23                 | 16002.1           | 695.75         | 112.37  | $2.2 \times 10^{-16}$ |
| <b>Residuales</b>  | 48                 | 297.2             | 6.19           |         |                       |

**Tabla D2.** ANOVA para el cribado inicial de las bacterias marinas contra *Collectotrichum* sp. C021.  $\alpha = 0.05$

| Fuente             | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Valor F | Valor P               |
|--------------------|--------------------|-------------------|----------------|---------|-----------------------|
| <b>Tratamiento</b> | 23                 | 18179.8           | 790.43         | 117.67  | $2.2 \times 10^{-16}$ |
| <b>Residuales</b>  | 48                 | 322.4             | 6.72           |         |                       |

**Tabla D3.** ANOVA para el cribado inicial de las bacterias marinas contra *Collectotrichum* sp. C004.  $\alpha = 0.05$

| Fuente             | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Valor F | Valor P               |
|--------------------|--------------------|-------------------|----------------|---------|-----------------------|
| <b>Tratamiento</b> | 23                 | 5963.1            | 259.26         | 35.92   | $2.2 \times 10^{-16}$ |
| <b>Residuales</b>  | 48                 | 346.4             | 7.22           |         |                       |

**Tabla D4.** ANOVA para el cribado inicial de las bacterias marinas contra *Collectotrichum* sp. C013.  $\alpha = 0.05$

---

| <b>Fuente</b>      | <b>Grados de libertad</b> | <b>Suma de cuadrados</b> | <b>Cuadrado medio</b> | <b>Valor F</b> | <b>Valor P</b>        |
|--------------------|---------------------------|--------------------------|-----------------------|----------------|-----------------------|
| <b>Tratamiento</b> | 23                        | 7789.1                   | 338.66                | 29.05          | $2.2 \times 10^{-16}$ |
| <b>Residuales</b>  | 48                        | 559.6                    | 11.66                 |                |                       |

---

**Tabla D5.** ANOVA para la evaluación del efecto del biosurfactante BS57 P en frutos de mango variedad Hilaza a una concentración 400 ppm.

---

| <b>Fuente</b>      | <b>Grados de libertad</b> | <b>Suma de cuadrados</b> | <b>Cuadrado medio</b> | <b>Valor F</b> | <b>Valor P</b>         |
|--------------------|---------------------------|--------------------------|-----------------------|----------------|------------------------|
| <b>Tratamiento</b> | 7                         | 19058                    | 2722.57               | 66.05          | $1.29 \times 10^{-10}$ |
| <b>Residuales</b>  | 16                        | 659.6                    | 41.22                 |                |                        |

---

## Anexo E: Análisis Probit

Tabla E1. Calculo del Logaritmo de la letalidad obtenida en las dosis evaluadas

| Dose/Conc. | Total | Dead | Log Dose |
|------------|-------|------|----------|
| 400        | 10    | 3,25 | 2,602    |
| 200        | 10    | 1,83 | 2,301    |
| 66         | 10    | 0,33 | 1,820    |
| 33         | 10    | 0,25 | 1,519    |

Tabla E2. Calculo del Probit Empírico

| Group | Log10 Dose | Empirical Probits |
|-------|------------|-------------------|
| 2     | 2,60       | 4,55              |
| 3     | 2,30       | 4,10              |
| 4     | 1,82       | 3,16              |
| 5     | 1,52       | 3,04              |

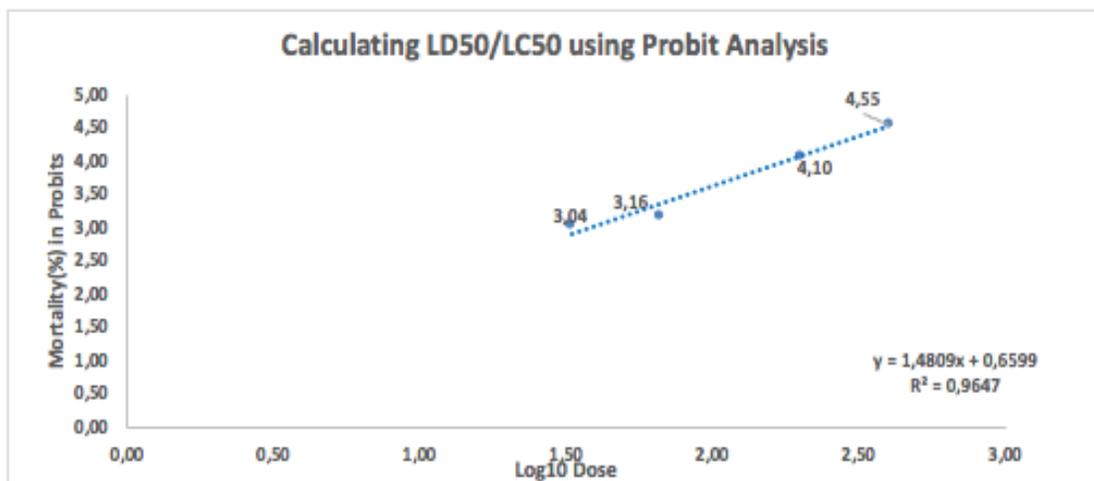


Figura E1. Regresión lineal para el calculo de la Dosis Letal<sub>50</sub> del extracto BS57 en el modelo *Artemia Franciscana* usando el Análisis Probit.

Tabla E3. Resultado del ajuste de la curva.

| <b>Curve Fitting</b>      |          |
|---------------------------|----------|
| Slope                     | 1,481    |
| Intercept                 | 0,660    |
| SD ( $\sigma$ )           | 0,675    |
| SE                        | 0,182    |
| R <sup>2</sup>            | 0,965    |
| Chi-test ( $\chi^2$ ) Sig | 0,959    |
| df                        | 2        |
| Chi-Test                  | NON-SIG  |
| Fitting                   | GOOD FIT |

Tabla E4. Estimación de la Dosis Letal<sub>50</sub>. \*Letal Dose, \*\*Intervalos de Confianza

| <b>LD *</b> | <b>LD</b>     | <b>95%Fiducial CI**</b> |                |
|-------------|---------------|-------------------------|----------------|
|             |               | <b>Lower</b>            | <b>Upper</b>   |
| <b>(%)</b>  | <b>ppm</b>    |                         |                |
| LD25        | 297,77        | 131,12                  | 676,27         |
| <b>LD50</b> | <b>864,92</b> | <b>380,84</b>           | <b>1964,30</b> |
| LD75        | 2512,25       | 1106,19                 | 5705,52        |
| LD96        | 13770,56      | 6063,44                 | 31274,09       |

**BIBLIOGRAFÍA**

- Abbott, W. S. (1925). *A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide*. *Journal of Economic Entomology*, 18(2), 265–267. <http://dx.doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>
- Adeniji, A. A., Loots, D. T., & Babalola, O. O. (2019). *Bacillus velezensis*: Phylogeny, useful applications, and avenues for exploitation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(9), 3669-3682. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09710-5>
- Agrawal, S., Acharya, D., Adholeya, A., Barrow, C. J., & Deshmukh, S. K. (2017). Nonribosomal Peptides from Marine Microbes and Their Antimicrobial and Anticancer Potential. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 828. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00828>
- Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-02037-6>
- AGRONET (2018). Evaluaciones Agropecuarias del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia. Recuperado el 30 de mayo del 2021, de <https://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx?cod=1>
- Akem, C. (2006). Mango Anthracnose Disease: Present Status and Future Research Priorities. *Plant Pathology Journal*, 5(3), 266-273. <https://doi.org/10.3923/ppj.2006.266.273>
- Ali, S., Bruce, S., Ana I, V., Aaron J, P., Patricia, L., & Asiye, S. (2018). In vitro evaluation of eight plant essential oils for controlling *Colletotrichum*, *Botryosphaeria*, *Fusarium* and *Phytophthora* fruit rots of avocado, mango and papaya. *Plant Protection Science*, 54(No. 3), 153-162. <https://doi.org/10.17221/49/2017-PPS>
- Aloisio, E., Carnevale, A., Pasqualetti, S., Birindelli, S., Dolci, A., & Panteghini, M. (2018). Random uncertainty of photometric determination of hemolysis index on the Abbott

- Architect c16000 platform. *Clinical Biochemistry*, 57, 62-64.  
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.01.009>
- Alvarado, J. R., Moreno, L. A., (2012). Acuerdo de competitividad cadena productiva del mango en Colombia. Recuperado el 09 de junio del 2021, de:  
<https://sioc.minagricultura.gov.co/Mango/Normatividad/004%20-%20D.C.%20-%20Acuerdo%20Competitividad%20Cadena%20Mango.pdf>
- Alvandia, D. G., & Acda, M. A. (2015). The antagonistic effect and mechanisms of *Bacillus amyloliquefaciens* DGA14 against anthracnose in mango cv. 'Carabao'. *Biocontrol Science and Technology*, 25(5), 560-572.  
<https://doi.org/10.1080/09583157.2014.996738>
- Aranda, F. J., Teruel, J. A., & Ortiz, A. (2005). Further aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin A. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1713(1), 51-56. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.05.003>
- Arrebola, E., Jacobs, R., & Korsten, L. (2010). Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 108(2), 386-395.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04438.x>
- Arroyave-Toro, J. J., Mosquera, S., & Villegas-Escobar, V. (2017). Biocontrol activity of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 cells and lipopeptides against postharvest fungal pathogens. *Biological Control*, 114, 195-200.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.08.014>
- Asohofrucol, & Corpoica. (2013). *Modelo Tecnológico para el cultivo del mango en el Valle del alto Magdalena en el Departamento del Tolima*. Recuperado el 31 de mayo del

2021, de <https://sioc.minagricultura.gov.co/DocumentosContexto/S1462-MANGO%20ASOHOFrucol%20ICA%20CORPOICA.pdf>

- Barbe, V., Cruveiller, S., Kunst, F., Lenoble, P., Meurice, G., Sekowska, A., Vallenet, D., Wang, T., Moszer, I., Médigue, C., & Danchin, A. (2009). From a consortium sequence to a unified sequence: the *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later. *Microbiology (Reading, England)*, 155(Pt 6), 1758–1775. <https://doi.org/10.1099/mic.0.027839-0>
- Belenky, P., Camacho, D., & Collins, J. J. (2013). Fungicidal Drugs Induce a Common Oxidative-Damage Cellular Death Pathway. *Cell Reports*, 3(2), 350-358. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.12.021>
- Beltran-Gracia, E., Macedo-Raygoza, G., Villafaña-Rojas, J., Martinez-Rodriguez, A., Chavez-Castrillon, Y. Y., Espinosa-Escalante, F. M., Di Mascio, P., Ogura, T., & Beltran-Garcia, M. J. (2017). Production of Lipopeptides by Fermentation Processes: Endophytic Bacteria, Fermentation Strategies and Easy Methods for Bacterial Selection. En A. F. Jozala (Ed.), *Fermentation Processes*. InTech. <https://doi.org/10.5772/64236>
- Ben Ayed, H., Hmidet, N., Béchet, M., Chollet, M., Chataigné, G., Leclère, V., Jacques, P., & Nasri, M. (2014). Identification and biochemical characteristics of lipopeptides from *Bacillus mojavensis* A21. *Process Biochemistry*, 49(10), 1699-1707. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.07.001>
- Borroto, J., Reinaldo Trujillo, Yael C. de la Torre, Noemí Waksman, Martha Hernández, & Ricardo Salazar. (2011). Actividad antimicrobiana y toxicidad frente a *Artemia salina* del extracto diclorometánico de raíces de *Morinda royoc* L. *Revista Cubana*

- de Plantas Medicinales*, 16(1), 34-42. Recuperado el 29 de mayo del 2021, de <https://www.medigraphic.com/pdfs/revcubplamed/cpm-2011/cpm111d.pdf>
- Borthwick, A. D. (2012). 2,5-Diketopiperazines: Synthesis, Reactions, Medicinal Chemistry, and Bioactive Natural Products. *Chemical Reviews*, 112(7), 3641-3716. <https://doi.org/10.1021/cr200398y>
- Buchoux, S., Lai-Kee-Him, J., Garnier, M., Tsan, P., Besson, F., Brisson, A., & Dufourc, E. J. (2008). Surfactin-Triggered Small Vesicle Formation of Negatively Charged Membranes: A Novel Membrane-Lysis Mechanism. *Biophysical Journal*, 95(8), 3840-3849. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.128322>
- Bushnell, L. D., & Haas, H. F. (1941). The Utilization of Certain Hydrocarbons by Microorganisms. *Journal of bacteriology*, 41(5), 653-673. <https://doi.org/10.1128/jb.41.5.653-673.1941>
- Carolin C, F., Kumar, P. S., & Ngueagni, P. T. (2021). A Review on New Aspects of Lipopeptide Biosurfactant: Types, Production, Properties and its Application in the Bioremediation Process. *Journal of Hazardous Materials*, 124827. <https://doi:10.1016/j.jhazmat.2020.124827>
- Carrillo, C., Teruel, J. A., Aranda, F. J., & Ortiz, A. (2003). Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1611(1-2), 91-97. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(03\)00029-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(03)00029-4)
- Chandler, D., Bailey, A. S., Tatchell, G. M., Davidson, G., Greaves, J., & Grant, W. P. (2011). The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1573), 1987-1998. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0390>

- Cheffi, M., Maalej, A., Mahmoudi, A., Hentati, D., Marques, A. M., Sayadi, S., & Chamkha, M. (2021). Lipopeptides production by a newly *Halomonas venusta* strain: Characterization and biotechnological properties. *Bioorganic Chemistry*, 109, 104724. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104724>
- Chen, K., Tian, Z., He, H., Long, C., & Jiang, F. (2020). *Bacillus* species as potential biocontrol agents against citrus diseases. *Biological Control*, 151, 104419. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104419>
- Chen, X. H., Scholz, R., Borriss, M., Junge, H., Mögel, G., Kunz, S., & Borriss, R. (2009). Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. *Journal of Biotechnology*, 140(1-2), 38-44. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.10.015>
- Coconubo Guio, L. C., Sinuco León, D. C., & Castellanos Hernández, L. (2020). Fungicidal activity of volatile organic compounds from *Paenibacillus* bacteria against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista Colombiana de Química*, 49(1), 20-25. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v1n49.81996>
- Corpus Sjøgreen, A. M. (2010). Determinación de la concentración letal media (CL50-96) del aluminio mediante pruebas toxicológicas utilizando alevinos de *Oncorhynchus mykiss* (Trucha arco iris). Universidad de la Salle. Recuperado el 30 de mayo del 2021, de [https://ciencia.lasalle.edu.co/ing\\_ambiental\\_sanitaria/511](https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_ambiental_sanitaria/511)
- De Oliveira, K. Á. R., Berger, L. R. R., de Araújo, S. A., Câmara, M. P. S., & de Souza, E. L. (2017). Synergistic mixtures of chitosan and *Mentha piperita* L. essential oil to inhibit *Colletotrichum* species and anthracnose development in mango cultivar Tommy Atkins. *Food Microbiology*, 66, 96-103. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.012>

- De Silva, D. D., Crous, P. W., Ades, P. K., Hyde, K. D., & Taylor, P. W. J. (2017). Life styles of *Colletotrichum* species and implications for plant biosecurity. *Fungal Biology Reviews*, 31(3), 155–168. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2017.05.001>
- Del Puerto Rodríguez, A. M., Suárez Tamayo, S., & Palacio Estrada, D. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52(3).
- Devi, S., Kiese-walter, H. T., Kovács, R., Frisvad, J. C., Weber, T., Larsen, T. O., Kovács, Á. T., & Ding, L. (2019). Depiction of secondary metabolites and antifungal activity of *Bacillus velezensis* DTU001. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 4(3), 142-149. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2019.08.002>
- Díaz-Medina, A. R., Arboleda-Zapata, T., & Ríos-Osorio, L. A. (2019). Estrategias de control biológico utilizadas para el manejo de la antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides* en frutos de mango: Una revisión sistemática. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 22, 595-611. <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKewj-pNbguvXwAhUdGFkFHcFsCykQFjAAegQIAxAD&url=https%3A%2F%2Fwww.revista.ccba.uady.mx%2Fojs%2Findex.php%2FTSA%2Farticle%2Fdownload%2F2699%2F1315&usg=AOvVaw30KDq68AmMBECJSu0EUZDC>
- Drakontis, C. E., & Amin, S. (2020). Biosurfactants: Formulations, properties, and applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 48, 77-90. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2020.03.013>
- Du, L., & Lou, L. (2010). PKS and NRPS release mechanisms. *Nat. Prod. Rep.*, 27(2), 255-278. <https://doi.org/10.1039/B912037H>

- Dunlap, C. A., Bowman, M. J., & Rooney, A. P. (2019). Iturinic Lipopeptide Diversity in the *Bacillus subtilis* Species Group – Important Antifungals for Plant Disease Biocontrol Applications. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1794. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01794>
- Dunlap, C. A., Bowman, M. J., & Schisler, D. A. (2013). Genomic analysis and secondary metabolite production in *Bacillus amyloliquefaciens* AS 43.3: A biocontrol antagonist of Fusarium head blight. *Biological Control*, 64(2), 166-175. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.11.002>
- Etcheagaray, A., de Castro Bueno, C., de Melo, I. S., Tsai, S. M., Fiore, M. de F., Silva-Stenico, M. E., de Moraes, L. A. B., & Teschke, O. (2008). Effect of a highly concentrated lipopeptide extract of *Bacillus subtilis* on fungal and bacterial cells. *Archives of Microbiology*, 190(6), 611-622. <https://doi.org/10.1007/s00203-008-0409-z>
- 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>
- Finney, D. J. (1952). Probit Analysis (2nd Ed). *Journal of the Institute of Actuaries*, 78(3), 388-390. <https://doi.org/10.1002/jps.3030411125>
- Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., & Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*, 285, 44-55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>

- Fravel, D. R. (2005). Commercialization and Implementation of Biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, 43(1), 337-359. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.032904.092924>
- Gañán, Lederson, Álvarez, Elizabeth, & Castaño-Zapata, Jairo. (2015). Identificación genética de aislamientos de *Colletotrichum* spp. causantes de antracnosis en frutos de aguacate, banano, mango y tomate de árbol. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 39(152), 339-347. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.192>
- Gondry, M., Jacques, I. B., Thai, R., Babin, M., Canu, N., Seguin, J., Belin, P., Pernodet, J.-L., & Moutiez, M. (2018). A Comprehensive Overview of the Cyclodipeptide Synthase Family Enriched with the Characterization of 32 New Enzymes. *Frontiers in Microbiology*, 9, 46. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00046>
- Gong, Q., Zhang, C., Lu, F., Zhao, H., Bie, X., & Lu, Z. (2014). Identification of bacillomycin D from *Bacillus subtilis* fmbJ and its inhibition effects against *Aspergillus flavus*. *Food Control*, 36(1), 8-14. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.07.034>
- Govender, V., & Korsten, L. (2006). Evaluation of different formulations of *Bacillus licheniformis* in mango pack house trials. *Biological Control*, 37(2), 237-242. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.11.012>
- Grangemard, I., Wallach, J., Maget-Dana, R., & Peypoux, F. (2001). Lichenysin: A More Efficient Cation Chelator Than Surfactin. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 90(3), 199-210. <https://doi.org/10.1385/ABAB:90:3:199>
- Gu, K., Zhang, D., Guan, C., Xu, J., Li, S., Shen, G., Luo, Y., & Li, Y. (2017). Safe antifungal lipopeptides derived from *Bacillus marinus* B-9987 against grey mold caused by

- Botrytis cinerea*. *Journal of Integrative Agriculture*, 16(9), 1999-2008.  
[https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(16\)61616-7](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61616-7)
- Guo, W., Li, F., Xia, J., & Wang, W. (2021). Complete genome sequence of a marine-derived bacterium *Pseudomonas* sp. SXM-1 and characterization of its siderophore through antiSMASH analysis and with mass spectroscopic method. *Marine Genomics*, 55, 100802. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2020.100802>
- Heerklotz, H., & Seelig, J. (2001). Detergent-Like Action of the Antibiotic Peptide Surfactin on Lipid Membranes. *Biophysical Journal*, 81(3), 1547-1554.  
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)75808-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75808-0)
- Hentati, D., Chebbi, A., Hadrich, F., Frikha, I., Rabanal, F., Sayadi, S., Manresa, A., & Chamkha, M. (2019). Production, characterization and biotechnological potential of lipopeptide biosurfactants from a novel marine *Bacillus stratosphericus* strain FLU5. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 167, 441-449.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.036>
- Hernández Delgado, P. M., Aranguren, M., Reig, C., Fernández Galván, D., Mesejo, C., Martínez Fuentes, A., Galán Saúco, V., & Agustí, M. (2011). Phenological growth stages of mango (*Mangifera indica* L.) according to the BBCH scale. *Scientia Horticulturae*, 130(3), 536-540. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.07.027>
- Hernández-Montiel, L. G., Larralde-Corona, C. P., Vero, S., López-Aburto, M. G., Ochoa, J. L., & Ascencio-Valle, F. (2010). Caracterización de levaduras *Debaryomyces hansenii* para el control biológico de la podredumbre azul del limón mexicano Characterization of yeast *Debaryomyces hansenii* for the biological control of blue mold decay of Mexican lemon. *CyTA - Journal of Food*, 8(1), 49-56.  
<https://doi.org/10.1080/19476330903080592>

- Hernandez Montiel, L. G., Zulueta Rodriguez, R., Angulo, C., Rueda Puente, E. O., Quiñonez Aguilar, E. E., & Galicia, R. (2017). Marine yeasts and bacteria as biological control agents against anthracnose on mango. *Journal of Phytopathology*, 165(11-12), 833-840. <https://doi.org/10.1111/jph.12623>
- Hifnawy, M. S., Fouda, M. M., Sayed, A. M., Mohammed, R., Hassan, H. M., AbouZid, S. F., Rateb, M. E., Keller, A., Adamek, M., Ziemert, N., & Abdelmohsen, U. R. (2020). The genus *Micromonospora* as a model microorganism for bioactive natural product discovery. *RSC Advances*, 10(35), 20939-20959. <https://doi.org/10.1039/D0RA04025H>
- Holguer, J. O., Offei, S. K., Oduro, K. A., & Odamtten, G. T. (2015). Nature of mango anthracnose in Ghana: Implications for the control of the disease. *Ghana Jnl agric. Sci.* 49, 53 – 67. Recuperado el 30 de mayo del 2021, de <https://www.ajol.info/index.php/gjas/article/view/142497>
- Ibrar, M., & Zhang, H. (2020). Construction of a hydrocarbon-degrading consortium and characterization of two new lipopeptides biosurfactants. *Science of The Total Environment*, 714, 136400. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136400>
- Inès, M., & 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>
- Jensen, P. R. (2016). Natural Products and the Gene Cluster Revolution. *Trends in Microbiology*, 24(12), 968-977. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.07.006>
- Jin, P., Wang, H., Liu, W., Fan, Y., & Miao, W. (2018). A new cyclic lipopeptide isolated from *Bacillus amyloliquefaciens* HAB-2 and safety evaluation. *Pesticide*

*Biochemistry and Physiology*, 147, 40-45.

<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.08.015>

Jin, P., Wang, H., Tan, Z., Xuan, Z., Dahar, G. Y., Li, Q. X., Miao, W., & Liu, W. (2020).

Antifungal mechanism of bacillomycin D from *Bacillus velezensis* HN-2 against *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 163,

102-107. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.11.004>

Jongsri, P., Rojsitthisak, P., Wangsomboondee, T., & Seraypheap, K. (2017). Influence of

chitosan coating combined with spermidine on anthracnose disease and qualities of 'Nam Dok Mai' mango after harvest. *Scientia Horticulturae*, 224, 180-187.

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.06.011>

Kamble, M., & Kumar, P. (Eds.). (2016). *Colletotrichum gloeosporioides*: Pathogen of

Anthracnose Disease in Mango (*Mangifera indica* L.). En *Current Trends in Plant Disease Diagnostics and Management Practices* (pp. 207-219). Springer

International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-27312-9\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-27312-9_9)

Karim, A., Poirot, O., Khatoon, A., & Aurongzeb, M. (2019). Draft genome sequence of a

novel *Bacillus glycinifermentans* strain having antifungal and antibacterial properties. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 19, 308-310.

<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.10.011>

Kefialew, Y., & Ayalew, A. (2008). Postharvest biological control of anthracnose

(*Colletotrichum gloeosporioides*) on mango (*Mangifera indica*). *Postharvest Biology and Technology*, 50(1), 8-11. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.03.007>

Kevany, B. M., Rasko, D. A., & Thomas, M. G. (2009). Characterization of the Complete

Zwittermicin A Biosynthesis Gene Cluster from *Bacillus cereus*. *Applied and*

- Environmental Microbiology*, 75(4), 1144-1155.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.02518-08>
- Kim, S.-K. (Ed.). (2013). *Marine Microbiology*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.  
<https://doi.org/10.1002/9783527665259>
- Knight, C. A., Bowman, M. J., Frederick, L., Day, A., Lee, C., & Dunlap, C. A. (2018). The first report of antifungal lipopeptide production by a *Bacillus subtilis* subsp. Inaquosorum strain. *Microbiological Research*, 216, 40-46.  
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.08.001>
- Köcher, S., Breitenbach, J., Müller, V., & Sandmann, G. (2009). Structure, function and biosynthesis of carotenoids in the moderately halophilic bacterium *Halobacillus halophilus*. *Archives of Microbiology*, 191(2), 95-104.  
<https://doi.org/10.1007/s00203-008-0431-1>
- Koumoutsis, A., Chen, X.-H., Henne, A., Liesegang, H., Hitzeroth, G., Franke, P., Vater, J., & Borriss, R. (2004). Structural and Functional Characterization of Gene Clusters Directing Nonribosomal Synthesis of Bioactive Cyclic Lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* Strain FZB42. *Journal of Bacteriology*, 186(4), 1084-1096.  
<https://doi.org/10.1128/JB.186.4.1084-1096.2004>
- Li, Q., Bu, J., Shu, J., Yu, Z., Tang, L., Huang, S., Hsiang, T. (2019). *Colletotrichum* species associated with mango in southern China. *Scientific Reports*, 9(1), 18891.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-54809-4>
- Li, F.-Z., Zeng, Y.-J., Zong, M.-H., Yang, J.-G., & Lou, W.-Y. (2020). Bioprospecting of a novel endophytic *Bacillus velezensis* FZ06 from leaves of *Camellia assamica*: Production of three groups of lipopeptides and the inhibition against food spoilage

- microorganisms. *Journal of Biotechnology*, 323, 42-53.  
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.07.021>
- Libralato, G., Prato, E., Migliore, L., Cicero, A. M., & Manfra, L. (2016). A review of toxicity testing protocols and endpoints with *Artemia* spp. *Ecological Indicators*, 69, 35-49.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.04.017>
- Lieberman, M. (1999). A Brine Shrimp Bioassay for Measuring Toxicity and Remediation of Chemicals. *Journal of Chemical Education*, 76(12), 1689.  
<https://doi.org/10.1021/ed076p1689>
- Lima, N. B., Marcus, M. V., De Moraes, M. A., Barbosa, M. A. G., Michereff, S. J., Hyde, K. D., & Câmara, M. P. S. (2013). Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. *Fungal Diversity*, 61(1), 75–88.  
<https://doi.org/10.1007/s13225-013-0237-6>
- Liu, Y., Teng, K., Wang, T., Dong, E., Zhang, M., Tao, Y., & Zhong, J. (2020). Antimicrobial *Bacillus velezensis* HC6: Production of three kinds of lipopeptides and biocontrol potential in maize. *Journal of Applied Microbiology*, 128(1), 242-254.  
<https://doi.org/10.1111/jam.14459>
- Luna-Bulbarela, A., Tinoco-Valencia, R., Corzo, G., Kazuma, K., Konno, K., Galindo, E., & Serrano-Carreón, L. (2018). Effects of bacillomycin D homologues produced by *Bacillus amyloliquefaciens* 83 on growth and viability of *Colletotrichum gloeosporioides* at different physiological stages. *Biological Control*, 127, 145-154.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.08.004>
- Majer, H. M., Ehrlich, R. L., Ahmed, A., Earl, J. P., Ehrlich, G. D., & Beld, J. (2021). Whole genome sequencing of *Streptomyces actuosus* ISP-5337, *Streptomyces sioyaensis* B-5408, and *Actinospica acidiphila* B-2296 reveals secondary metabolomes with

- antibiotic potential. *Biotechnology Reports*, 29, e00596.  
<https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00596>
- Malviya, D., Sahu, P. K., Singh, U. B., Paul, S., Gupta, A., Gupta, A. R., Singh, S., Kumar, M., Paul, D., Rai, J. P., Singh, H. V., & Brahma Prakash, G. P. (2020). Lesson from Ecotoxicity: Revisiting the Microbial Lipopeptides for the Management of Emerging Diseases for Crop Protection. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(4), 1434. <https://doi.org/10.3390/ijerph17041434>
- Mani, P., Sivakumar, P., & Balan, S. S. (2016). Economic Production and Oil Recovery Efficiency of a Lipopeptide Biosurfactant from a Novel Marine Bacterium *Bacillus simplex*. *Achievements in the Life Sciences*, 10(1), 102-110.  
<https://doi.org/10.1016/j.als.2016.05.010>
- Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K., & Kim, S. K. (2014). Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. *Microbiological research*, 169(4), 262–278. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.07.014>
- Mattiuz, B.-H., Ducamp-Collin, M.-N., Mattiuz, C. F. M., Vigneault, C., Marques, K. M., Sagoua, W., & Montet, D. (2015). Effect of propolis on postharvest control of anthracnose and quality parameters of 'Kent' mango. *Scientia Horticulturae*, 184, 160-168. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.12.035>
- Medina-Córdova, N., López-Aguilar, R., Ascencio, F., Castellanos, T., Campa-Córdova, A. I., & Angulo, C. (2016). Biocontrol activity of the marine yeast *Debaryomyces hansenii* against phytopathogenic fungi and its ability to inhibit mycotoxins production in maize grain (*Zea mays* L.). *Biological Control*, 97, 70-79.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.03.006>

- Meena, K. R., & Kanwar, S. S. (2015). Lipopeptides as the Antifungal and Antibacterial Agents: Applications in Food Safety and Therapeutics. *BioMed Research International*, 2015, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2015/473050>
- Mihaleva, V. V., Vorst, O., Maliepaard, C., Verhoeven, H. A., de Vos, R. C. H., Hall, R. D., & van Ham, R. C. H. J. (2008). Accurate mass error correction in liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry-based metabolomics. *Metabolomics*, 4(2), 171-182. <https://doi.org/10.1007/s11306-008-0108-4>
- Mnif, I., Chaabouni-Ellouze, S., & Ghribi, D. (2012). Optimization of the Nutritional Parameters for Enhanced Production of *B. subtilis* SPB1 Biosurfactant in Submerged Culture Using Response Surface Methodology. *Biotechnology Research International*, 2012, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2012/795430>
- Montoya Solano, J. D., Suárez Moreno, Z. R., Montoya Castaño, D., & Aristizábal Gutiérrez, F. A. (2006). *Análisis bioinformático y predicción de genes en secuencias genómicas de Clostridium sp. IBUN22A*. VIII(1), 57-64.
- Morales-Cedeño, L. R., Orozco-Mosqueda, Ma. del C., Loeza-Lara, P. D., Parra-Cota, F. I., de los Santos-Villalobos, S., & Santoyo, G. (2021). Plant growth-promoting bacterial endophytes as biocontrol agents of pre- and post-harvest diseases: Fundamentals, methods of application and future perspectives. *Microbiological Research*, 242, 126612. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126612>
- Muñoz-Vasquez, C. M. (2015). Caracterización de cepas bacterianas silvestres con actividad fungicida como potenciales agentes para el control biológico del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*. Universidad de Chile. Recuperado el 31 de mayo del 2021, de <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/138513/Caracterizacion->

[de-cepas-bacterianas-silvestres-con-actividad-fungicida-como-potenciales-agentes-para-el%20control-biologico.pdf?sequence=1&isAllowed=y](#)

- Nakhate, P. H., Yadav, V. K., & Pathak, A. N. (2013). A Review on Daptomycin; the first US-FDA approved Lipopeptide antibiotics. *Journal of Scientific and Innovative Research*, 2(5), 970-980.
- Nasir, M. N., & Besson, F. (2012a). Conformational analyses of bacillomycin D, a natural antimicrobial lipopeptide, alone or in interaction with lipid monolayers at the air–water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 387(1), 187-193. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.07.091>
- Nasir, M. N., & Besson, F. (2012b). Conformational analyses of bacillomycin D, a natural antimicrobial lipopeptide, alone or in interaction with lipid monolayers at the air–water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 387(1), 187-193. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.07.091>
- Nelson, S. C. (2008). Mango anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). College of Tropical Agriculture and Human Resource. Plant Disease-48. Hawaii, USA. Recuperado el 30 de mayo del 2021, <https://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/pd-48.pdf>
- Nunes, B. S., Carvalho, F. D., Guilhermino, L. M., & Van Stappen, G. (2006). Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environmental Pollution*, 144(2), 453–462. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.12.037>
- Nunes, J., Charneira, C., Nunes, C., Gouveia-Fernandes, S., Serpa, J., Morello, J., & Antunes, A. M. M. (2019). A Metabolomics-Inspired Strategy for the Identification of Protein Covalent Modifications. *Frontiers in Chemistry*, 7, 532. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00532>

- Noriega-Cantú D. H., Pereyda-Hernández J., Garrido-Ramírez E. R., Jiménez-Guillén R. y Cruzaley-Sarabia. R. (2014). Manejo integrado de la antracnosis y caída de frutos de mango Ataulfo en las costas de Guerrero. SAGARPA - INIFAP – CIRPAS. Campo Experimental Iguala. Folleto Técnico Núm. 22. Recuperado el 30 de mayo del 2021, de [https://www.researchgate.net/publication/272480472\\_MANEJO\\_INTEGRADO\\_DE\\_LA\\_ANTRACNOSIS\\_Y\\_CAIDA\\_DE\\_FRUTOS\\_DE\\_MANGO\\_ATAULFO\\_EN\\_LAS\\_COSTAS\\_DE\\_GUERRERO](https://www.researchgate.net/publication/272480472_MANEJO_INTEGRADO_DE_LA_ANTRACNOSIS_Y_CAIDA_DE_FRUTOS_DE_MANGO_ATAULFO_EN_LAS_COSTAS_DE_GUERRERO)
- 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>
- Organización Mundial de la Salud. (2014). *Código Internacional de Conducta para la Gestión de Plaguicidas*. <http://www.fao.org/3/a-i3604s.pdf>
- Ortega-Morales, B. O., Ortega-Morales, F. N., Lara-Reyna, J., De la Rosa-García, S. C., Martínez-Hernández, A., & Montero-M., J. (2009). Antagonism of *Bacillus* spp. Isolated from Marine Biofilms Against Terrestrial Phytopathogenic Fungi. *Marine Biotechnology*, 11(3), 375-383. <https://doi.org/10.1007/s10126-008-9152-3>
- Páez-Redondo, A. R. (2003). *Tecnologías sostenibles para el manejo de la antracnosis (Colletotrichum gloesporioides (Penz.) Penz. Y Sacc.) en papaya (Carica papaya L.) y mango (Mangifera indica L.)*. AGROSAVIA.
- Pagliara, P., & Caroppo, C. (2011). Cytotoxic and antimitotic activities in aqueous extracts of eight cyanobacterial strains isolated from the marine sponge *Petrosia ficiformis*. *Toxicon*, 57(6), 889-896. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.03.006>

- Paik, S. H., Chakicherla, A., & Hansen, J. N. (1998). Identification and Characterization of the Structural and Transporter Genes for, and the Chemical and Biological Properties of, Sublancin 168, a Novel Lantibiotic Produced by *Bacillus subtilis* 168. *Journal of Biological Chemistry*, 273(36), 23134-23142. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.36.23134>
- Palazzini, J. M., Dunlap, C. A., Bowman, M. J., & Chulze, S. N. (2016). *Bacillus velezensis* RC 218 as a biocontrol agent to reduce Fusarium head blight and deoxynivalenol accumulation: Genome sequencing and secondary metabolite cluster profiles. *Microbiological Research*, 192, 30-36. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.06.002>
- Pérez-García, A., Romero, D., & de Vicente, A. (2011). Plant protection and growth stimulation by microorganisms: Biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2), 187-193. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.12.003>
- Peterson, A., Hohmann, L., Huang, L., Kim, B., Eng, J. K., & Martin, D. B. (2009). Analysis of RP-HPLC loading conditions for maximizing peptide identifications in shotgun proteomics. *Journal of proteome research*, 8(8), 4161-4168. <https://doi.org/10.1021/pr9001417>
- Ploetz R.C., (2002) Antracnosis en mango: Manejo de la enfermedad más importante pre y postcosecha. Recuperado el 30 de mayo del 2021, de [https://www.mango.org/wp-content/uploads/2018/03/Anthracnose\\_Mangos\\_Final\\_Report\\_Spn.pdf](https://www.mango.org/wp-content/uploads/2018/03/Anthracnose_Mangos_Final_Report_Spn.pdf)
- Prusky, D., Alkan, N., Mengiste, T., & Fluhr, R. (2013). Quiescent and necrotrophic lifestyle choice during postharvest disease development. *Annual review of phytopathology*, 51, 155–176. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102349>

- Quintero, M., Velásquez, A., Jutinico, L. M., Jiménez-Vergara, E., Blandón, L. M., Martínez, K., Lee, H. S., & Gómez-León, J. (2018). Bioprospecting from marine coastal sediments of Colombian Caribbean: Screening and study of antimicrobial activity. *Journal of Applied Microbiology*, 125(3), 753-765. <https://doi.org/10.1111/jam.13926>
- Quintero-Mercado, A., Dangon-Bernier, F., & Páez-Redondo, A. (2019). Aislamientos endofíticos de *Colletotrichum* spp. A partir de hojas y ramas de mango (*Mangifera indica* L.) cultivar Azúcar en el municipio de Ciénaga, Magdalena, Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 43(166), 65. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.788>
- Rabari, V. P., Chudashama, K. S., & Thaker, V. S. (2018). *In vitro* Screening of 75 Essential Oils Against *Colletotrichum gloeosporioides*: A Causal Agent of Anthracnose Disease of Mango. *International Journal of Fruit Science*, 18(1), 1-13. <https://doi.org/10.1080/15538362.2017.1377666>
- Raddadi, N., Crotti, E., Rolli, E., Marasco, R., Fava, F., & Daffonchio, D. (2012). The Most Important Bacillus Species in Biotechnology. En E. Sansinenea (Ed.), *Bacillus thuringiensis Biotechnology* (pp. 329-345). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-3021-2\\_17](https://doi.org/10.1007/978-94-007-3021-2_17)
- Radovanović, N., Milutinović, M., Mihajlovski, K., Jović, J., Nastasijević, B., Rajilić-Stojanović, M., & Dimitrijević-Branković, S. (2018). Biocontrol and plant stimulating potential of novel strain *Bacillus* sp. PPM3 isolated from marine sediment. *Microbial Pathogenesis*, 120, 71-78. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.04.056>
- Rajaofera, M. J. N., Jin, P. F., Fan, Y. M., Sun, Q. Q., Huang, W. K., Wang, W. B., Shen, H. Y., Zhang, S., Lin, C. H., Liu, W. B., Zheng, F. C., & Miao, W. G. (2018).

- Antifungal activity of the bioactive substance from *Bacillus atrophaeus* strain HAB-5 and its toxicity assessment on *Danio rerio*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 147, 153-161. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.06.006>
- Relyea, R. A. (2011). Chapter 9. Amphibians Are Not Ready for Roundup®. En *Wildlife Ecotoxicology: Forensic Approaches, Emerging Topics in Ecotoxicology* (pp. 267-300). Springer Science. Recuperado el 29 de mayo del 2021, de <https://www.biology.pitt.edu/sites/default/files/facilities-images/Relyea%20286.pdf>
- Reyes-Estebanez, M., Sanmartín, P., Camacho-Chab, J. C., De la Rosa-García, S. C., Chan-Bacab, M. J., Águila-Ramírez, R. N., Carrillo-Villanueva, F., De la Rosa-Escalante, E., Arteaga-Garma, J. L., Serrano, M., & Ortega-Morales, B. O. (2020). Characterization of a native *Bacillus velezensis*-like strain for the potential biocontrol of tropical fruit pathogens. *Biological Control*, 141, 104127. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104127>
- Reyes-Pérez, J. J., Hernández-Montiel, L. G., Vero, S., Noa-Carrazana, J. C., Quiñones-Aguilar, E. E., & Rincón-Enríquez, G. (2019). Postharvest biocontrol of *Colletotrichum gloeosporioides* on mango using the marine bacterium *Stenotrophomonas rhizophila* and its possible mechanisms of action. *Journal of Food Science and Technology*, 56(11), 4992-4999. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03971-8>
- Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R. H., Dufour, S. E., Veening, J.-W., Arrebola, E., Cazorla, F. M., Kuipers, O. P., Paquot, M., & Pérez-García, A. (2007). The Iturin and Fengycin Families of Lipopeptides Are Key Factors in Antagonism of *Bacillus subtilis* Toward *Podosphaera fusca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 20(4), 430-440. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-4-0430>

- Ruiz-Sánchez, E., Mejía-Bautista, M. A., Serrato-Díaz, A., Reyes-Ramírez, A., Estrada-Girón, Y., & Valencia-Botín, A. (2016). Antifungal activity and molecular identification of native strains of *Bacillus subtilis*. *Agrociencia*, 50(2). Recuperado el 31 de mayo de 2021, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-31952016000200133&lng=es&tlng=en](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952016000200133&lng=es&tlng=en)
- Rungjindamai, N. (2016). Isolation and evaluation of biocontrol agents in controlling anthracnose disease of mango in Thailand. *Journal of Plant Protection Research*, 56(3), 306-311. <https://doi.org/10.1515/jppr-2016-0034>
- Schneider, T., Müller, A., Miess, H., & Gross, H. (2014). Cyclic lipopeptides as antibacterial agents – Potent antibiotic activity mediated by intriguing mode of actions. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(1), 37-43. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.08.009>
- Schwarzer, D., Finking, R., & Marahiel, M. A. (2003). Nonribosomal peptides: From genes to products. *Natural Product Reports*, 20(3), 275. <https://doi.org/10.1039/b111145k>
- Sharma, Rajat. (2019). Analytical Concept of Fungicide Resistance: A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8(12), 1672-1684. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.812.201>
- Sharma, Rajni, Singh, J., & Verma, N. (2018). Production, characterization and environmental applications of biosurfactants from *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 132-139. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.07.028>
- Sharma, Rajni, Singh, J., & Verma, N. (2020). Statistical optimization and comparative study of lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* SAS-1 and *Bacillus*

- subtilis* BR-15. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 25, 101575.  
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101575>
- Stein, T., Düsterhus, S., Stroh, A., & Entian, K.-D. (2004). Subtilosin Production by Two *Bacillus subtilis* Subspecies and Variance of the sbo-alb Cluster. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4), 2349-2353.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.2349-2353.2004>
- Sudarmono, P., Wibisana, A., Listriyani, L. W., & Sungkar, S. (2019). Characterization and Synergistic Antimicrobial Evaluation of Lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* Isolated from Oil-Contaminated Soil [Research Article]. *International Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1155/2019/3704198>
- Talero-Pérez, Y. V., Medina, O. J., & Rozo-Núñez, W. (2013). Técnicas analíticas contemporáneas para la identificación de residuos de sulfonamidas, quinolonas y cloranfenicol. *Universitas Scientiarum*, 19(1), 11-28.  
<https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC19-1.taci>
- Thimon, L., Peypoux, F., Maget-Dana, R., Roux, B., & Michel, G. (1992). Interactions of bioactive lipopeptides, iturin A and surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 16(2), 144-151.
- Thong, O., Chiew, S., Geethaa, S., & Thavamany, P. (2013). Interference from ordinarily used solvents in the outcomes of *Artemia salina* lethality test. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 4(4), 179. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.121411>
- Veith, B., Herzberg, C., Steckel, S., Feesche, J., Maurer, K. H., Ehrenreich, P., Bäumer, S., Henne, A., Liesegang, H., Merkl, R., Ehrenreich, A., & Gottschalk, G. (2004). The Complete Genome Sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an Organism with

Great Industrial Potential. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 7(4), 204-211. <https://doi.org/10.1159/000079829>

Villanueva Rodríguez S. (2016). Introducción a la Tecnología del Mango", Primera Edición. Recuperado el 30 de mayo del 2021, de <https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/388/1/Libro%20Mango.pdf>

Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & De los Santos-Villalobos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(1). <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1706-5>

Wade, L. G. (2013). *Química orgánica*. Pearson Educación. Vol. 1. Recuperado el 31 de mayo del 2021, de [https://www.academia.edu/37365645/Quimica\\_Orgánica\\_L\\_G\\_Wade\\_Vol](https://www.academia.edu/37365645/Quimica_Orgánica_L_G_Wade_Vol)

Wang, Y., Bao, Y., Shen, D., Feng, W., Yu, T., Zhang, J., & Zheng, X. D. (2008). Biocontrol of *Alternaria alternata* on cherry tomato fruit by use of marine yeast *Rhodospiridium paludigenum* Fell & Tallman. *International Journal of Food Microbiology*, 123(3), 234-239. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.02.002>

Wang, Y., Tang, F., Xia, J., Yu, T., Wang, J., Azhati, R., & Zheng, X. D. (2011). A combination of marine yeast and food additive enhances preventive effects on postharvest decay of jujubes (*Zizyphus jujuba*). *Food Chemistry*, 125(3), 835-840. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.032>

- Waters, A. L., Hill, R. T., Place, A. R., & Hamann, M. T. (2010). The expanding role of marine microbes in pharmaceutical development. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(6), 780-786. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.09.013>
- World Health Organization, & Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2014). *International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides*.
- Wu, L., Wu, H., Chen, L., Yu, X., Borriss, R., & Gao, X. (2015). Difficidin and bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 have antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* rice pathogens. *Scientific Reports*, 5(1), 12975. <https://doi.org/10.1038/srep12975>
- Xiong, J., Bauer, C. E., & Pancholy, A. (2007). Insight into the haem d 1 biosynthesis pathway in heliobacteria through bioinformatics analysis. *Microbiology*, 153(10), 3548-3562. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/007930-0>
- Yang, H., Li, X., Li, X., Yu, H., & Shen, Z. (2015). Identification of lipopeptide isoforms by MALDI-TOF-MS/MS based on the simultaneous purification of iturin, fengycin, and surfactin by RP-HPLC. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(9), 2529-2542. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8486-8>
- Yoshida, H., Yamazaki, J., Ozawa, S., Mizukoshi, T., & Miyano, H. (2009). Advantage of LC-MS Metabolomics Methodology Targeting Hydrophilic Compounds in the Studies of Fermented Food Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4), 1119-1126. <https://doi.org/10.1021/jf803235m>
- Young-Soo, kim, Balaraju, Kotnala, & Jeon, Yongho. (2016). Biological Control of Apple Anthracnose by *Paenibacillus polymyxa* APEC128, an Antagonistic *Rhizobacterium*. *The Plant Pathology Journal*, 32(3), 251-259. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.01.2016.0015>

- Zhang, L., An, R., Wang, J., Sun, N., Zhang, S., Hu, J., & Kuai, J. (2005). Exploring novel bioactive compounds from marine microbes. *Current opinion in microbiology*, 8(3), 276–281. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.04.008>
- Zhao, H., Shao, D., Jiang, C., Shi, J., Li, Q., Huang, Q., Rajoka, M. S. R., Yang, H., & Jin, M. (2017). Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(15), 5951-5960. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8396-0>
- Zheng, M., Shi, J., Shi, J., Wang, Q., & Li, Y. (2013). Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic *Bacillus* strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangos. *Biological Control*, 65(2), 200-206. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.02.004>