



INSTITUTO TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

INFORME TÉCNICO DE RESIDENCIA PROFESIONAL:

“ESTUDIO DE LA TOXICIDAD DE LA BACILOMICINA D DE *Bacillus amyloliquefaciens* EN EL CRECIMIENTO Y VIABILIDAD DE *Colletotrichum gloeosporioides* 09”

INSTITUCIÓN:  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA UNAM

ASESOR EXTERNO:  
DR. LEOBARDO SERRANO CARREÓN

PRESENTA:  
CRISTINA DE LOS SANTOS VENTURA

NÚMERO DE CONTROL:  
13270720

CARRERA:  
INGENIERÍA BIOQUÍMICA

TUXTLA GUTIÉRREZ CHIAPAS, JULIO DE 2018

## Resumen

*Colletotrichum gloeosporioides* es un hongo ascomiceto filamentoso que ha causado daños económicos importantes por ocasionar antracnosis en cultivos de mango y papaya. Es aquí donde el control biológico resalta como una de las opciones más efectivas para el control de plagas debido a sus ventajas sobre los sistemas tradicionales.

En función de lo anterior, el Instituto de Biotecnología de la UNAM ha desarrollado un producto de control biológico basados en esporas de la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* 83 (Fungifree AB®) que han resultado exitosas para el control de antracnosis en cultivos de importancia económica como el mango, papaya, aguacate y cítricos, así como el control de la cenicilla polvorienta en Cucurbitáceas y Solanáceas en nuestro país.

Esta cepa en particular debe su capacidad de biocontrol a la síntesis de lipopéptidos, como iturinas y surfactinas, las cuales se caracterizan por tener una fuerte actividad antibiótica y propiedades surfactantes. En estudios previos, se aisló e identificó tres distintos grupos isoméricos de bacilomicina D (un lipopéptido de la familia de las iturinas) producida por *B. amyloliquefaciens* 83, las cuales presentan diferencias en su actividad antifúngica contra las esporas de *C. gloeosporioides* 09 en función de sus características químicas.

Con el fin de comprobar si el homólogo que presenta una mayor concentración en el complejo de bacilomicina D biosintetizada por *B. amyloliquefaciens* 83, presenta una acción fungistática, son requeridas pruebas que permitan estudiar su efecto sobre la viabilidad celular.

Recalcando que un mejor entendimiento de los mecanismos de acción de los antibióticos producidos por *Bacillus*, son la clave para el mejoramiento de los productos de control biológico, este trabajo plantea estudiar el efecto inhibitorio del homólogo bacilomicina D 1044 Da C<sub>14</sub> producida por *B. amyloliquefacines* 83 en relación a su capacidad para permeabilizar las membranas celulares de esporas viables de *C. gloeosporioides* 09 en un estudio de comparación con anfotericina B (antibiótico polieno que mata a células fúngicas mediante permeabilización de su membrana). Analizada, mediante el uso de citometría de flujo y microscopía de fluorescencia, junto con diversos colorantes fluorescentes.

Para diferenciar la afeción a las membranas de las esporas *C. gloeosporioides* 09 expuestas a bacilomicina D se utilizaron los cromóforos de "LIVE/DEAD™ FungaLight™ Yeast Viability Kit" como indicadores. Primeramente se utilizó el citómetro de flujo "Amnis mageStream®X Mark II" para la diferenciación y cuantificación de fluorescencia emitida por las esporas de *C. gloeosporioides* 09 sometidas a concentraciones inhibitorias de bacilomicina D 1044 Da C<sub>14</sub> a diferentes tiempos de exposición (donde la presencia de fluorescencia roja, debida

a la interacción del Ioduro de propidio con los ácidos nucleicos, indica la existencia de membranas comprometidas y la presencia de fluorescencia verde debida a SYTO 9, indica la integridad de la membrana. Al utilizar los cromóforos en conjunto) sin embargo la formación de aglomerados de esporas en las muestras impedían su paso por dicho aparato.

Por lo tanto se optó por la utilización de la técnica de microscopía con el microscopio Zeiss Axioskop, ya que se ha utilizado previamente para la visualización de hongos filamentosos. Utilizándose en esta ocasión únicamente Ioduro de propidio para teñir a las esporas, ya que mediante citometría se demostró que al utilizar la mezcla de cromóforos la intensidad de fluorescencia verde de las esporas muertas era mayor que la de esporas vivas, por lo tanto se llegó a la conclusión que SYTO 9 tiene una mayor penetración en las esporas con membranas comprometidas.

Mediante microscopía se pudo confirmar que efectivamente las esporas de *C. gloeosporioides* 09 sometidas a tratamientos a una concentración de 50  $\mu$ M de bacilomicina D 1044 Da C<sub>14</sub> durante 80 min, son afectadas a nivel de membrana por el lipopéptido, ya que mostraron fluorescencia roja, indicando la permeabilización de ésta, ya que PI solo es capaz de penetrar membranas comprometidas o dañadas y emitir fluorescencia roja.

Confirmando que uno de los modos de acción de bacilomicina D para inhibir la germinación de las esporas, es la permeabilización de las membranas de las esporas de *C. gloeosporioides* 09, pudiendo ser mediante la formación de poros iónicos o ruptura en la membrana, y por consecuencia el citoplasma y los organelos intracelulares sean filtrados fuera de la célula, provocando su muerte.

No obstante, se sugiere encontrar técnicas que reduzcan la formación de agregados de esporas de *C. gloeosporioides* 09, para poder utilizar y aprovechar la potencia que tiene el citómetro "Amnis mageStream®X Mark II" y de esta manera tener un análisis estadístico más robusto, así como la utilización de distintas proporciones de cromóforos (en este proyecto fue utilizada una proporción 1:1) para poder ser usados en conjunto con la finalidad de observar la disminución de fluorescencia verde y el aumento de fluorescencia roja, y como consecuencia demostrar el aumento de permeabilidad de la membrana de las muestras con respecto a tiempo sometidas a distintas concentraciones del lipopéptido.

Finalmente, dados los resultados obtenidos en citometría y microscopía, no fue factible la comparación de bacilomicina D 1044 Da C<sub>14</sub> con anfotericina B, ya que al encontrarse los imprevistos antes mencionados (principalmente la formación de agregados por las esporas) no fue posible comparar hasta ese momento de manera cuantitativa la afección a membranas que provocaban estos dos antibióticos.

# Índice

Índice.....	4
1. Introducción .....	6
2. Descripción de la institución .....	8
3. Justificación .....	9
4. Objetivos.....	10
4.1 Objetivo General .....	10
4.2 Objetivos Específicos.....	10
5. Fundamento teórico .....	11
5.1 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , el fitopatógeno causante de la antracnosis .....	11
5.2 Control biológico, origen y evolución.....	11
5.3 <i>Bacillus</i> spp., bacteria promotora del crecimiento vegetal con acción de control biológico .	13
5.4 Lipopéptidos producidos por <i>Bacillus</i> spp.: biosíntesis y clasificación .....	14
5.5 Modo de acción de los lipopéptidos producidos por <i>Bacillus</i> spp.: propiedades antimicrobianas y surfactantes .....	16
5.6 Viabilidad celular .....	18
5.7 Antecedentes dentro del grupo de trabajo.....	20
6. Procedimiento y descripción de las actividades realizadas .....	22
6.1 Estrategia experimental .....	22
6.2 Microorganismo .....	22
6.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC <sub>100</sub> ) de anfotericina B y bacilomicina D sobre esporas de <i>C. gloeosporioides</i> 09 .....	23
6.4 Citometría de flujo .....	25
6.5 Microscopía de fluorescencia.....	26
6.6 Análisis estadístico .....	26
7. Resultados y Discusiones.....	27
7.1 Comparación de la actividad antifúngica entre bacilomicina D y anfotericina B mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria.....	27
7.2 Efecto de bacilomicina D 1044 Da C <sub>14</sub> sobre el daño en las membranas de las esporas de <i>C. gloeosporioides</i> 09, analizado mediante citometría de flujo.....	31

7.3 Efecto de bacilomicina D sobre la integridad de la membrana de las esporas de <i>C. gloeosporioides</i> 09 analizado mediante microscopía .....	37
8. Conclusiones y recomendaciones .....	40
9. Referencias.....	42

## 1. Introducción

*Colletotrichum gloeosporioides* es un hongo ascomiceto filamentoso que ha causado daños económicos importantes por ocasionar antracnosis en distintos géneros de plantas, tales como *Carya*, *Ficus*, *Mangifera*, *Pueraria* y *Vitis* (Freeman *et al.*, 1998; Weir *et al.*, 2012). Los síntomas se caracterizan por lesiones necróticas presentes principalmente en frutos durante las etapas de pre y poscosecha (Cannon *et al.*, 2012). Por lo anterior, está catalogado como uno de los patógenos de mayor importancia en el mundo (Dean *et al.*, 2012).

Actualmente hay una búsqueda social y científica para encontrar alternativas viables que permitan reducir la pérdida de productos cosechados debido a antracnosis. Éstas alternativas buscan disminuir la aplicación de pesticidas químicos, los cuales presentan efectos adversos sobre el medio ambiente. Es aquí donde el control biológico resalta como una de las opciones más efectivas para el control de plagas debido a sus ventajas sobre el control químico de plagas y enfermedades de importancia agrícola (Mari *et al.*, 2007).

Sin embargo, la cantidad de éxitos comerciales de agentes de control biológico son todavía limitados debido a que sigue siendo una tecnología en desarrollo. Este tipo de productos están basados principalmente en diversos géneros de hongos (*Trichoderma*, *Gliocladium*, *Streptomyces*, *Coniothyrium* y *Candidia*) y bacterias (*Pseudomonas* y *Bacillus*) (Serrano & Galindo, 2007).

En función de lo anterior, el Instituto de Biotecnología de la UNAM ha desarrollado un producto de control biológico basado en esporas de la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* 83 (Fungifree AB®) que ha resultado exitoso para el control de antracnosis en cultivos de importancia económica como el mango, papaya, aguacate y cítricos, así como el control de la cenicilla polvorienta en *Cucurbitáceas* y *Solanáceas* en nuestro país (Galindo *et al.*, 2013).

En particular *Bacillus amyloliquefaciens*, es una bacteria que se destaca por estimular el crecimiento de las plantas y detener o suprimir organismos patógenos gracias a la biosíntesis de metabolitos con actividad antimicrobiana, entre los que se encuentran diversos lipopéptidos no ribosomales tales como las iturinas, surfactinas y fengicinas (Chen *et al.*, 2008).

Uno de los mecanismos de biocontrol presente en *Bacillus amyloliquefaciens* 83 radica en la biosíntesis de lipopéptidos, como iturinas y surfactinas, las cuales se caracterizan por tener una fuerte actividad antibiótica y propiedades surfactantes (Roongsawang *et al.*, 2002; Leclere *et al.*, 2006).

En estudios previos (Luna Bulbarela, 2015), se aisló e identificó tres distintos grupos isoméricos de bacilomicina D (un lipopéptido de la familia de las iturinas) en función

a su peso molecular: 1044, 1058, 1072 Da; producidos por *B. amyloliquiefaciens* 83, las cuales presentan diferencias en su actividad antifúngica contra las esporas de *C. gloeosporioides* 09 en función de sus características químicas. Estos lipopéptidos también son capaces de inhibir el crecimiento micelial, sin embargo, las concentraciones inhibitorias requeridas para inhibir la germinación de esporas, son significativamente mayores. En específico el homólogo bacilomicina D 1044 Da C<sub>14</sub> demostró ser el lipopéptido de mayor importancia para la antibiosis invitro de *C. gloeosporioides* 09 debido a que es el más abundante en la mezcla de bacilomicina D biosintetizada por esta bacteria.

Ensayos preliminares, mostraron que esporas expuestas al homólogo bacilomicina D 1044 Da C<sub>14</sub>, son capaces de iniciar su germinación una vez que el lipopéptido es retirado del medio de cultivo. Debido a lo anterior surgió el interés de estudiar puntualmente el efecto de este homólogo sobre la viabilidad celular de *Colletotrichum gloeosporioides* 09 (Luna Bulbarela, 2015).

Con el fin de comprobar si este lipopéptido en particular presenta una acción fungistática, son requeridas pruebas que permitan estudiar su efecto sobre la viabilidad celular. Reportes anteriores (Zhang *et al.*, 2013; Nasir & Besson, 2012; Gu *et al.*, 2017) han sugerido que el mecanismo de acción de la bacilomicina es la permeabilización de membrana, sin embargo, no está del todo claro si este efecto repercute directamente sobre la viabilidad.

En este proyecto se plantea estudiar el efecto de la bacilomicina D 1044 Da C<sub>14</sub> producida por *B. amyloliquiefaciens* 83 sobre la permeabilidad de las membranas de *C. gloeosporioides* 09. Este estudio contribuirá a la comprensión del modo de acción de este homólogo en específico sobre las esporas de *C. gloeosporioides* 09. Aportando elementos que permitan desarrollar mejores formulaciones de control biológico.

## **2. Descripción de la institución**

El Instituto de Biotecnología de la UNAM está ubicado en Av. Universidad 2001, Chamilpa, 62210 Cuernavaca, Morelos.

La misión fundamental del Instituto es desarrollar la biotecnología moderna en la UNAM a partir de investigación de excelencia académica y de frontera y, paralelamente, la formación de recursos humanos especializados; sus objetivos son:

1. Realizar investigación y generar conocimiento en las áreas y disciplinas que se cultivan en el Instituto: biología molecular, biología celular, microbiología, virología, bioquímica, ingeniería bioquímica, inmunología, biología estructural, biología del desarrollo, genómica, ecología microbiana y bioinformática, entre las más importantes.
2. Utilizar el conocimiento en biología para desarrollar tecnología biológica competitiva, de preferencia en colaboración con el sector industrial, orientada a la solución de problemas en las áreas de salud, agropecuaria, industrial, energética y ambiental.
3. Participar en la formación de recursos humanos, preferentemente a través de su incorporación en proyectos de investigación multidisciplinarios y en colaboración con otras dependencias de la UNAM, en particular las facultades afines, y de otras universidades.
4. Contribuir a la divulgación del conocimiento en la sociedad.

### 3. Justificación

*B. amyloliquefaciens* 83, es una cepa aislada de las hojas de mango, la cual es empleada como agente de control biológico. Actualmente sus esporas son comercializadas bajo el nombre de Fungifree AB® como un preventivo que disminuye la incidencia de antracnosis causada por el hongo *C. gloeosporioides*. Estando su capacidad antagónica relacionada con la síntesis de compuestos lipopeptídicos vía no-ribosomal, específicamente bacilomicina D.

Aunque bacilomicina D inhibe la germinación de la espora y el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* 09, experimentos previos sugieren que los distintos homólogos de este lipopéptido actúan como un agentes fungistáticos (Luna Bulbarela, 2015). Es por ello que este proyecto pretende estudiar el efecto del homólogo bacilomicina D 1044 Da C<sub>14</sub> sobre la germinación de esporas de *C. gloeosporioides* 09 y su relación con los cambios ocasionados sobre la integridad de la membrana. Cabe mencionar que este lipopéptido demostró ser de importancia para la antibiosis in vitro, debido a que es el más abundante en mezcla de bacilomicina D biosintetizada por *B. amyloliquefaciens* 83. Así mismo las afecciones a la membrana (por ejemplo, su permeabilización) están íntimamente ligadas a su viabilidad. De igual manera cabe señalar que la mayoría de trabajos que abordan el estudio del modo de acción de compuestos antimicrobianos sintetizados por vía no ribosomal (ej. bacilomicina D y bacilomicina L) con afinidad a membrana son realizados en forma de complejos lipopeptídicos sin embargo actualmente se conoce la presencia de distintos homólogos dentro de estos (Zhang *et al.*, 2013; Gu *et al.*, 2017).

Recalcando que un mejor entendimiento de los mecanismos de acción de los antibióticos producidos por *Bacillus*, son la clave para el mejoramiento de los productos de control biológico, este trabajo plantea estudiar el efecto inhibitorio del homólogo bacilomicina D 1044 Da C<sub>14</sub> producida por *B. amyloliquefacines* 83 en relación a su capacidad para permeabilizar las membranas celulares de esporas viables de *C. gloeosporioides* 09 en un estudio de comparación con anfotericina B (antibiótico polieno que mata a células fúngicas mediante permeabilización de su membrana). Analizada, mediante el uso de citometría de flujo y microscopía de fluorescencia, junto con diversos colorantes fluorescentes.

## **4. Objetivos**

### **4.1 Objetivo General**

Contribuir en el entendimiento del mecanismo de acción de la bacilomicina D 1044 Da C<sub>14</sub> sobre *Colletotrichum gloeosporioides* 09.

### **4.2 Objetivos Específicos**

Estudiar la integridad de las membranas de esporas de *C. gloeosporioides* 09 expuestas a distintas concentraciones (sub- e inhibitorias) de bacilomicina D 1044 Da C<sub>14</sub> y a diferentes periodos de tiempo, mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia para comprender el modo de acción del lipopéptido sobre la integridad de las membranas celulares de *C. gloeosporioides* 09.

Determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC<sub>100</sub>) de anfotericina B, mediante cuantificación de biomasa a través de gravimetría, para su utilización como control positivo del ensayo de integridad de membrana con bacilomicina D 1044 Da C<sub>14</sub>.

## 5. Fundamento teórico

### 5.1 *Colletotrichum gloeosporioides*, el fitopatógeno causante de la antracnosis

*Colletotrichum* es un género de hongos ascomicetos que afecta a distintas plantas, causando daños económicos significativos en cultivos de regiones tropicales, subtropicales y templadas (Freeman *et al.*, 1998).

*C. gloeosporioides* en particular, causa daños económicos en cultivos de los géneros *Carya*, *Citrys*, *Ficus*, *Mangifera*, *Pueraria*, *Vitis*, entre otros (Weir *et al.*, 2012). Inclusive, ha llegado a devastar cultivos del grano de café en África, y afecta severamente distintos cereales (Cannon *et al.*, 2012).

Es por esto que *C. gloeosporioides* está catalogado como el octavo hongo fitopatógeno de mayor importancia en el mundo (Dean *et al.*, 2012).

La enfermedad causada por este hongo es conocida como antracnosis. Esta se manifiesta como lesiones necróticas cóncavas en hojas, tallos, flores y frutos, las cuales se hacen presentes durante las etapas de pre y postcosecha (Cannon *et al.*, 2012). Existen diversas formas en las que este patógeno puede esparcirse. Entre estas se encuentra desde la propagación de esporas a través de semillas infectadas, salpicaduras de agua o mediante el viento. Es importante aclarar que el hongo posee una capacidad de sobrevivencia saprófita, por lo que naturalmente existe ya una amplia presencia en los campos cultivos (Cannon *et al.*, 2012).

La infección del hongo ocurre cuando la conidia (esporas asexuales) se adhiere y germina en la superficie de la planta, formando un tubo germinativo y posteriormente un apresorio, el cual le permite romper la cutícula y penetrar dentro del tejido hospedero. Una vez que el patógeno ha penetrado el tejido vegetal este forma una red de hifas biotróficas. Durante esta colonización inicial, la planta infectada aparentemente no reconoce al patógeno y es por eso que no existe ninguna respuesta de resistencia por parte de esta (Perfect *et al.*, 1999).

No obstante, después de colonizar varias células de manera intracelular, las hifas biotróficas, dan lugar a hifas necrófilas, las cuales enferman el tejido vegetal mediante la propagación de micelio hasta el punto de formar las características lesiones de la antracnosis (Perfect *et al.*, 1999; Bailey *et al.*, 1992).

### 5.2 Control biológico, origen y evolución

El aumento de la población ha traído consigo varias consecuencias, como la escasez de alimentos y la contaminación ambiental. En particular, la contaminación

de los campos de cultivos debido al uso excesivo de fertilizantes químicos y pesticidas es un grave problema, dado que la pérdida de fertilidad de los suelos compromete directamente sobre las fuentes de alimento de una población en constante crecimiento. Por lo tanto, debemos desarrollar nuevas estrategias para el control de plagas que afectan de manera sustancial a los cultivos agrícolas y de esta manera poder asegurar una mayor productividad sin afectar al medio ambiente (DeBach & Rosen, 1991).

Actualmente, existe una la tendencia global para disminuir la utilización y creación de fungicidas químicos a través de la búsqueda de alternativas que permitan reducir la pérdida de alimentos debido a fitopatógenos, sin contribuir a la afección del medio ambiente (Mari *et al.*, 2007) y al mismo tiempo diseñadas para que exista poca probabilidad de desarrollo de resistencia por parte de los patógenos y no comprometan la salud humana. (Barkai-Golan, 2001)

Dentro de las alternativas planteadas actualmente, resalta el uso de agentes de control biológico, como un método efectivo para el control de plagas sin los efectos secundarios de los químicos convencionales. Ésta técnica radica en la regulación de la población de plagas mediante la utilización de enemigos naturales como: predadores (ácaros depredadores, chinches, escarabajos, mosquitos, etc.), parasitoides (avispa y moscas parásitas), otros patógenos (nematodos, hongos (Jacas Miret, 2005), y microorganismos benéficos asociados a las plantas como las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR's por sus siglas en inglés) las cuales mejoran la disponibilidad de fósforo y potasio, así como la absorción de nitrógeno (ej. *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, entre otros; Sánchez López *et al.*, 2012) y hongos que mejoran el crecimiento vegetal (ej. *Trichoderma*; Martínez Tellez & Guerrero Ruíz, 2011)

En particular, las bacterias PGPR's y diversos hongos, ejercen control sobre diversas plagas mediante diversos modos de acción. Entre estos se encuentran la competencia por espacio y nutrientes, la inducción de la resistencia sistémica y la antibiosis (producción de toxinas; Sánchez López *et al.*, 2012; Martínez Tellez & Guerrero Ruíz, 2011).

Es importante entender los modos de acción empleados por estos microorganismos antagónicos, ya que de esta manera se podrán desarrollar mejores formulaciones para control biológico, basadas en antagonistas más efectivos (Wisniewski y Wilson, 1992).

Las características que usualmente describen a una formulación de control biológico ideal son: 1) estabilidad, 2) concentraciones efectivas bajas, 3) requerimiento de nutrientes simples, 4) capacidad de resistir condiciones ambientales adversas, 5) efectividad con una amplia gama de patógenos en distintos cultivos, 6) resistencia

a pesticidas, 7) inexistente producción de metabolitos que afecten a la salud humana, 8) que no tenga efectos negativos en su huésped (cultivo) y 9) que sea compatible con otros químicos y tratamientos físicos (Wilson & Wisniewski, 1989).

En el caso de agentes biológicos para el control de enfermedades, los éxitos comerciales son todavía limitados y están basados principalmente en hongos de los géneros *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Streptomyces*, *Coniothyrium* y *Candidia*, y bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* (Serrano L & Galindo E, 2007).

En México uno de los productos biotecnológicos comercializados que es utilizado para el control biológico de fitopatógenos fúngicos es Fungifree AB®, el cual es utilizado como un producto preventivo contra la antracnosis y cenicilla polvorienta. Siendo el principio activo de este producto las esporas de *B. amyloliquefaciens* 83 (Galindo *et al.*, 2013)

### **5.3 *Bacillus* spp., bacteria promotora del crecimiento vegetal con acción de control biológico**

*Bacillus* spp. son bacterias Gram-positivas formadoras de esporas, presentes usualmente en el suelo y en el material vegetal. Son aerobias estrictas y son capaces de propagarse en distintos intervalos de temperatura y pH (30-37°C y 8-7, respectivamente; Suwanmanon & Hsieh, 2014). Dichas bacterias resultan de interés industrial debido a que producen una cantidad considerable de proteínas extracelulares, específicamente enzimas hidrolíticas, tales como amilasas y proteasas (De-Boer Sietske & Diderichsen, 1991).

Dentro de este género bacteriano, existen diversas especies asociadas a las plantas. Estas promueven su crecimiento mediante la fijación de nitrógeno (ej. *Bacillus azotofixans*; Olivera *et al.*, 1993), la producción de auxinas (Ambreen & Shahida, 2010), la disminución del estrés ocasionado por el etileno al producir la enzima ACC desaminasa (Shankar-Singh *et al.*, 2011), solubilización de formas inorgánicas del fósforo mediante distintos ácidos orgánicos, entre otros (Banik & Dey, 1982).

Esta bacteria tiende a formar biopelículas (biofilms), los cuales le permiten competir eficientemente por nutrientes. Estas biopelículas, están constituidas por una mezcla de polisacáridos y proteínas que le confiere a la colonia un ambiente seguro para secuestrar nutrientes derivados de los exudados de la raíz o en la filósfera (ambiente que rodea a una hoja; Vlamakis *et al.*, 2013).

La planta al estar en contacto con la bacteria, puede desarrollar un estado conocido como de resistencia sistemática inducida (RSI) contra bacterias y hongos patógenos. Ciertas moléculas bioactivas que produce *Bacillus*, tales como, fitohormonas, antibióticos, sideróforos y enzimas líticas provocan la estimulación

de este mecanismo de defensa en la planta (Ongena *et al.*, 2007). Cuando la RSI se desencadena, la planta sufre un incremento en la expresión de ciertas enzimas como la fenilalanina amino liasa (PAL), polifenol oxidasa (PPO) y peroxidasas (POD). (Lugtenberg & Kamilova, 2009). Al mismo tiempo se ha demostrado que esta bacteria al ser utilizada como agente de control biológico, tiene un menor impacto sobre las comunidades microbianas del suelo en comparación con los fungicidas convencionales (Handelsman *et al.*, 1990; Silo-Suh *et al.*, 1994; He *et al.*, 1994; Gilber *et al.*, 1993; Milner *et al.*, 1995).

Por otro lado, *Bacillus* spp. son capaces de producir numerosos compuestos antimicrobianos, que son selectivamente tóxicos contra patógenos, los cuales no dañan al tejido del hospedero vegetal. Acorde a la forma en la que son sintetizados, estos compuestos pueden ser divididos en dos grandes grupos: los que son sintetizados vía ribosomal y no ribosomal. Entre los compuestos sintetizados por vía no ribosomal resaltan los lipopéptidos cíclicos debido a que están involucrados directamente con la antibiosis (Nagórska *et al.*, 2007; Correa & Soria, 2010).

Específicamente *Bacillus amyloliquefaciens*, es una cepa que se destaca por su habilidad para estimular el crecimiento de las plantas y ejercer antibiosis contra organismos fitopatógenos, gracias a la síntesis no ribosomal de lipéptidos cíclicos y policétidos con actividad antimicrobiana (Chen *et al.*, 2008).

Estos lipopéptidos, tienen otras funciones específicas e importantes ya que también están involucrados en la colonización de la planta y pueden ocasionar la inducción de la resistencia sistémica, (Ongera & Jacques, 2008), (Leclère, 2006).

#### **5.4 Lipopéptidos producidos por *Bacillus* spp.: biosíntesis y clasificación**

Los biosurfactantes lipopeptídicos producidos por *Bacillus* spp. son moléculas que están constituidas por una parte hidrofóbica conferida por un ácido graso (saturados e insaturados) conectada a una cadena peptídica hidrofílica, lo que les confiere propiedades anfipáticas. Gracias a su diversidad química, dichas moléculas pueden presentar diversas actividades biológicas, tales como: surfactantes, antimicrobianas y anti-enzimáticas (ej. lichenisina, bacilomicina y artrofactina, respectivamente; Roongsawang *et al.*, 2010)

Los lipopéptidos cíclicos en *Bacillus* spp., son sintetizados por vía no ribosomal mediante complejos enzimáticos llamados sintetetasas de péptidos no ribosomales (Non-Ribosomal Peptide Synthetases, "NRPSs", por sus siglas en inglés). La síntesis es un proceso complejo que incluye también modificaciones post-traduccionales y ensamblaje (Koglin & Walsh, 2009; Roongsawang *et al.*, 2010).

La mayoría de los lipopeptidos cíclicos de *Bacillus* pueden ser clasificados en tres familias: surfactina, fengicina e iturina como se muestra en la figura 1 (Raaijmakers *et al.*, 2010).

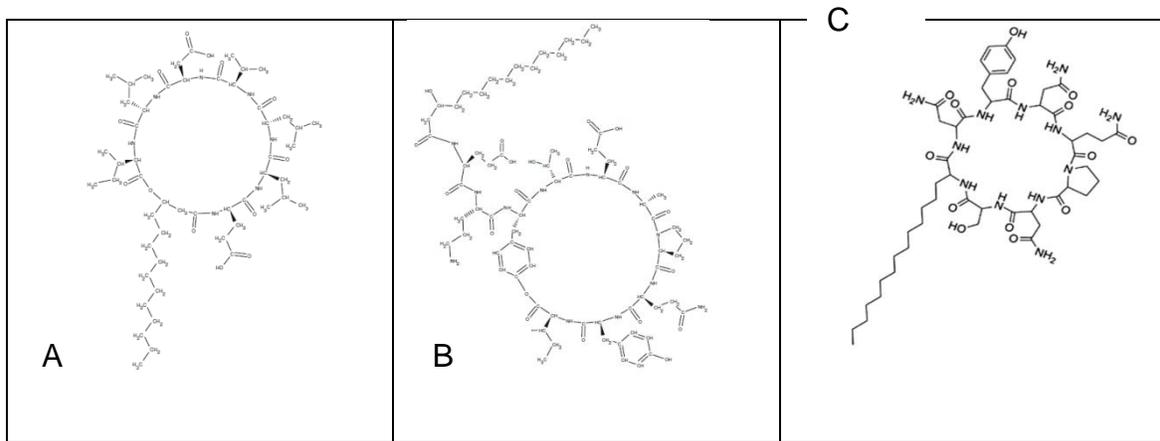


Figura 1. Surfactantes lipopeptídicos sintetizados por *Bacillus*. A) Surfactina , B) Fengicina y C) Iturina. (Jacques, 2011; Ongena and Jacques, 2008).

La familia de la surfactina está compuesta por aproximadamente 20 lipopeptidos diferentes, entre los que se encuentran: lichenisina A/D, surfactant BL86, pumilacidina, entre otros (Roongsawang *et al.*, 2010). Las surfactinas se caracterizan por ser biosurfactantes potentes, capaces de reducir la tensión superficial del agua de 74 hasta 27 mN/m a concentraciones cercanas a 25-220 mg/L. (Grangermard *et al.*, 1999; Grangemard *et al.*, 2001; Roongsawang *et al.*, 2010). Su sección peptídica está conformada por siete aminoácidos, en los que D-Leu3, D-Leu6, L-Asp4, están conservados entre todos los miembros de la familia. Residuos de aminoácidos en las posiciones 2, 4 y 7 corresponden al grupo de aminoácidos con cadenas laterales alifáticas (Val, Leu e Ile). La biosíntesis de estas variantes es afectada por las condiciones de cultivo, en particular, con la presencia de residuos de aminoácidos específicos dentro del medio de cultivo. La secuencia peptídica tiene la particularidad de presentar un patrón de quiralidad conservado, el cual es el siguiente: L, L, D, L, L, D, L. Por otro lado, las surfactinas se caracterizan por presentar un ácido graso  $\beta$ -hidroxilado (Jacques, 2011).

La familia de la fengicina cuenta con cuatro miembros principales: fengicina A y B, y la plipastatina A y B. Estos son lipodecapéptidos, con la siguiente secuencia peptídica conservada: L-Glu-D-Orn-D-Tyr-D-Thr-L-Glu-D-(Ala o Val)-L-Pro-L-Gln-L-Tyr-Ile (Figura 1B; Ongena *et al.*, 2007; Ongena, 2011). Todos los miembros presentan un anillo tipo lactona en la sección peptídica entre el carboxilo terminal

de una isoleucina y un grupo hidroxilo de una tirosina en la posición tres. La cadena de ácido graso es  $\beta$ -hidroxilada, con un esqueleto hidrocarbonado de 14 a 18 carbonos de longitud, por lo regular saturada.

Finalmente, la familia de la iturina incluye a la bacilomicina, iturina y micosubtilina. Estos son lipoheptapéptidos. En el caso de las iturinas, la sección peptídica forma una estructura cíclica con un ácido graso  $\beta$ -aminado. La secuencia de los primeros tres aminoácidos es conservada. Esta secuencia es: L-Asn-D-Tyr-D-Asn, en la que Tyr, es fundamental para su actividad antifúngica

La cadena de ácido graso  $\beta$ -aminada puede variar desde C-14 hasta C-18, aunque existen sus excepciones (Ongena & Jacques, 2008).

### **5.5 Modo de acción de los lipopéptidos producidos por *Bacillus* spp.: propiedades antimicrobianas y surfactantes**

Como se mencionó anteriormente, los lipopéptidos sintetizados por *Bacillus* spp. presentan actividad biosurfactantes debido a sus características anfipáticas. No obstante, estos también pueden presentar acción antimicrobiana, capacidad quelante y formación poros iónicos en biomembranas, antitumoral, antiviral y hemolítica, como en el caso de la surfactina (Hosono & Susuki, 1983). Asimismo, está involucrada en diferentes procesos celulares en *Bacillus* spp., tales como la formación de biopelículas (Bais *et al.*, 2004), y la diferenciación celular (Julkowska *et al.*, 2005). Por último, la surfactina es capaz de inhibir la formación de biopelículas de otras bacterias al interferir con su adhesión a una superficie (Branda *et al.*, 2001).

Los estudios actuales han demostrado que, aunque los lipopéptidos son estructuralmente similares, las diferentes familias (surfactina, fengicina e iturina) no tienen el mismo mecanismo de acción.

A diferencia de la surfactina, la cual es descrita ampliamente como un antibiótico antibacteriano, la fengicina inhibe el crecimiento de hongos filamentosos. Asimismo, se ha reportado su capacidad de inhibir a la fosfolipasa A2, enzima involucrada en una serie de procesos celulares fisiológicamente importantes tales como el recambio de fosfolípidos de membranas y generación de diversas sustancias bioactivas (Volpon *et al.*, 2000). Sin embargo, su actividad surfactante es menor en comparación a la surfactina. (Nishikiori *et al.*, 1986; Thaniyavarn *et al.*, 2003; Leclere *et al.*, 2006).

De igual manera, las iturinas son lipopéptidos con menor actividad surfactante. Sin embargo, a diferencia de la surfactina, poseen una alta actividad antifúngica de amplio espectro. Se ha descrito que su especificidad hacia hongos, se relaciona a su fuerte interacción con la membrana fúngica citoplasmática. Este lipopéptido

aumenta la permeabilidad de la membrana y se sugiere que forma poros iónicos en la misma, causando un desbalance osmótico y posteriormente la muerte celular. Sin embargo, su actividad antibacteriana es limitada (Maget-Dana & Peypoux, 1994).

A manera más detallada, se ha propuesto que el mecanismo de acción de las iturinas es la formación de estructuras oligoméricas con actividad de poro iónico. Estos poros podrían ser agregados de lipopéptidos-fosfolípidos, los cuales permiten la permeabilización de la membrana y la liberación de  $K^+$  intracelular. Además, también se ha confirmado que tiene interacción con esteroides, formando complejos de lipopéptidos/colesterol. Es por ello que se sugiere que la estructura biológicamente activa y responsable de su actividad es la terciaria: iturina/fosfolípido/esterol (Maget-Dana & Peypoux, 1994). Al parecer, el contenido de esteroides en membrana es un punto clave que conlleva a diferencias en susceptibilidad entre las diversas cepas de hongos reportadas. (Maget-Dana & Ptak, 1990).

Sin embargo, estudios con bacilomicina producida por *B. amyloliquefaciens* revelaron que su actividad antifúngica se debe no solo a la permeabilización de la membrana si no a su interacción con estructuras contenidas en el citoplasma de las células del hongo. (Zhang *et al.*, 2013). Con respecto a lo anterior, estudios realizados con microscopía electrónica, demostraron que la bacilomicina D lesiona la pared y membrana celular tanto de la hifa como de la espora de *Aspergillus flavus*; provocando que el citoplasma salga de la célula a través de poros en la membrana (Gong *et al.*, 2014). Este mismo mecanismo de acción se observó contra *Fusarium graminearum*, ya que la bacilomicina ocasionó cambios morfológicos en su membrana plasmática, tanto en conidias e hifas del hongo, acumulación de especies de oxígeno reactivas (Gu *et al.*, 2017) y se demostró la capacidad que tiene este lipopéptido para unirse al ADN de las células fúngicas de *Rhizoctonia solani* después de penetrar en las membranas celulares (Zhang *et al.*, 2013)

Por ejemplo, la capacidad hemolítica de los lipopéptidos de la familia de la iturina, la micosublitina es la más activa, seguido de la bacilomicina (Nail-Nasir & Besson, 2012).

Un punto importante acerca de la actividad antimicrobiana de los lipopéptidos producidos por *Bacillus amyloliquefaciens* es el hecho de que se ha demostrado que la dosis necesaria para inhibir hongos fitopatógenos es menor a la concentración micelar crítica (CMC), al menos de las mezclas de homólogos de un mismo lipopéptido, refiriéndose como homólogo a los lipopéptidos que tienen la misma secuencia peptídica pero diferentes longitudes de cadenas de ácidos grasos, variando su peso molecular (Luna Bulbarela, 2015). Esto significa que el estado micelar no interviene en su absorción en la membrana del hongo. Se ha observado,

que lipopéptidos como la fengicina y la iturina pueden solubilizar la membrana sin alcanzar una concentración crítica o desorden general (Nazari *et al.*, 2012).

Tal como sucede en otros surfactantes, los lipopéptidos son capaces de formar agregados en forma de micelas y/o vesículas. Esto les permite encapsular sustancias polares dependiendo de su concentración, por lo que a partir de diversos estudios se ha llegado a la hipótesis de que fungen como transporte de otros metabolitos antifúngicos de bajo peso molecular (Grau *et al.*, 2001).

Es importante aclarar que la sección lipofílica en un lipopéptidos es un factor determinante para su actividad biológica. Por ejemplo, la sustitución del ácido graso por una alanina en una molécula de iturina, ocasiona una pérdida total de su actividad, por lo que debe existir una longitud mínima de cadena que sea crítica para que estas moléculas se anclen en la membrana y sean efectivas (Volpon *et al.*, 2007).

Con respecto a lo anterior, en distintos estudios se han comprobado que la actividad antibiótica de los lipopéptidos aumenta al incrementar la longitud de su cadena de ácido graso (Béchet *et al.*, 2012; Luna Bulbarela, 2015). Esta relación entre la actividad antimicrobiana del lipopéptido y la longitud de su ácido graso asociado se ha demostrado con lipopéptidos obtenidos mediante síntesis química, (Makovitzki, *et al.*, 2006).

## 5.6 Viabilidad celular

Se entiende como viabilidad celular a la capacidad de las células para llevar a cabo ciertas funciones metabólicas, de crecimiento, reproductivas, sensitivas, de adaptabilidad así como la presencia de la integridad de la membrana, función mitocondrial, entre otros (May, 2014). El principal uso de la cuantificación de la viabilidad es la determinación de la cantidad de células vivas después de haber sido expuestas a algún procedimiento o sustancia de interés que pudiera haberlas afectado.

Existen diversos métodos para medir de forma cuantitativa la viabilidad celular de un cultivo, sin embargo, dependiendo de las células a estudiar son las técnicas y/o sustancias utilizadas para cuantificar esta variable.

Dentro de los ensayos colorimétricos, existe la utilización de sales tetrazolio. Diversas especies de hongos (*Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus oryzae* y *Candida albicans*) son capaces de reducir químicamente estos compuestos. Células viables tratadas con estas sales, forman cristales amarillos intracelulares, que tras su reducción vía enzimática se transforman en formazán que presenta un color púrpura. Éste tipo de prueba permite medir la viabilidad en hongos filamentosos, ya que es posible correlacionarla intensidad del color púrpura (medida mediante

espectrofotometría) con la viabilidad del cultivo (Levitz & Diamond, 1985, Kuhn *et al.*, 2003).

Otra opción para evaluar la viabilidad celular, es mediante el uso de cromóforos fluorescentes. Estas moléculas son capaces de absorber energía lumínica, excitarse y emitir diversos colores dependiendo de la longitud de onda emitida como consecuencia del cambio de nivel energético de los electrones (López Jácome *et al.*, 2014). Ejemplos de estos cromóforos son el diacetato de fluoresceína junto con el bromuro de etidio (Jarnagin & Luchsinger *et al.*, 1980). En células viables, el diacetato de fluoresceína es capaz de permear a través de la membrana celular y ser hidrolizado por diferentes enzimas como proteasas, lipasas, y esterasas. Cuando esto ocurre, se libera fluoresceína, la cual puede ser cuantificada por microscopía de fluorescencia o espectrofotometría (Green *et al.*, 2005). Por lo contrario, el bromuro de etidio, solo permear a las células muertas, tras unirse a los ácidos nucleicos mediante intercalamiento entre las bases, el bromuro de etidio aumenta su intensidad de fluorescencia (color rojo) Aunque inicialmente fueron diseñados para células de mamíferos, existen reportes de resultados positivos para células fúngicas (Jarnagin & Luchsinger, 1980)

También existe la posibilidad de una doble tinción, siempre y cuando exista compatibilidad entre los cromóforos utilizados. Lo anterior permite monitorear distintos eventos celulares de manera simultánea, lo cual posibilita abordar problemas de manera más profunda. Un ejemplo de lo anterior es el uso de un doble marcaje con "Syto 9" y Ioduro de propidio (Molecular Probes, 2005). Syto 9 es un cromóforo que tiñe de forma permanente a los ácidos nucleicos y muestra fluorescencia en verde al unirse a estos (ADN o ARN). Este compuesto es capaz de permear indistintamente a través de membranas de células viables o comprometidas (Molecular Probes, 2003). De igual manera, el ioduro de propidio es un compuesto que se intercala entre los ácidos nucleicos generando fluorescencia roja. Sin embargo, a diferencia del Syto 9, este sí es excluido por aquellas células con membranas intactas. (Martínez Salazar, 2009; Riccardi & Nicoletti, 2006). La interacción entre estos dos cromóforos desencadena un fenómeno llamado transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRED, por sus siglas en inglés). En el caso de haber expuesto células comprometidas a esta doble tinción ocurrirá el fenómeno FRED, en donde una molécula donadora excitada (SYTO 9) pierda su fluorescencia tras transferirle energía a un aceptor (ioduro de propidio), ocasionando que este último emita fluorescencia. Por lo tanto, dentro de un cultivo de células tratadas con la mezcla de cromóforos, aquellas que tengan membranas intactas seguirán teñidas de color verde, ya que los dos cromóforos nunca entran en contacto, mientras que las que tengan membranas dañadas presentarán una coloración roja debido al FRED (Babu Sekar & Periasamy, 2003).

Estos cromóforos presentan un espectro de emisión dentro del rango del ultravioleta, por lo que es necesario el uso de equipos especiales que permitan

detectar dichas longitudes de onda. Tal es el caso de un microscopio de fluorescencia.

Estos equipos cuentan con un sistema de filtros apropiados que permiten el paso de la luz de un cierto intervalo de longitud de onda, después esta luz incide sobre el objeto de estudio y lo excita. La energía de emisión del cromóforo es reflejada mediante un espejo dicróico (epi-iluminación) y es nuevamente filtrada para poder ser observada (Klar *et al.*, 2007). Este tipo de aplicaciones resultan particularmente útil para modelos de estudio en tejidos celulares y hongos filamentosos. Sin embargo, si el modelo de estudio son células en suspensión, la opción más robusta para un análisis de viabilidad es el empleo de un citómetro de flujo.

Este equipo permite una mayor cuantificación de objetos, de hasta 5,000 objetos por segundo, lo que permite validar el fenómeno de estudio con un análisis estadístico sólido, al hacer pasar las células u otras partículas en suspensión alineadas y de una en una por delante de un haz luminoso, la información producida puede agruparse en la que es generada por la dispersión de luz o la relacionada con la emisión de luz por los fluorocromos excitados por el rayo luminoso. Las señales luminosas detectadas se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que son procesadas por una computadora (Barrera Ramírez *et al.*, 2004).

La ventaja del uso de este tipo de aparatos es la capacidad de hacer mediciones individuales cuantitativas y multiparamétricas en un número estadísticamente apropiado de células y poder definir las propiedades de una población celular. Proporcionando datos como el tamaño relativo, granularidad, morfología, fluorescencia, etc. (Barrera Ramírez *et al.*, 2004). Usualmente los citómetros de flujo actuales, poseen la capacidad de monitorear simultáneamente la fluorescencia a distintas longitudes de onda, por lo que son compatibles con el uso de dobles tinciones.

### **5.7 Antecedentes dentro del grupo de trabajo**

Actualmente, dentro del grupo de trabajo del Dr. Enrique Galindo Fentanes y el Dr. Leobardo Serrano Carreón del Instituto de Biotecnología de la UNAM existe un interés por identificar y caracterizar la actividad antifúngica de diversos metabolitos lipopéptidos antifúngicos producidos por una cepa de *B. amyloliquefaciens* 83. Esta cepa actualmente es comercializada como un biofungicida bajo el nombre de FungiFree AB®, y tiene capacidad para inhibir de manera *in vitro* al hongo *C. gloeosporioides* 09 (Galindo *et al.*, 2013).

Los resultados de sus investigaciones han demostraron que *B. amyloliquefaciens* 83 sintetiza diversos homólogos de bacilomicina D capaces de inhibir de manera *in vitro* la germinación de esporas y el crecimiento del micelio de *C. gloeosporioides* 09.

Estos compuestos fueron aislados e identificados mediante RP-HPLC y LC-MS/MS. Hasta ahora, se han hallado seis homólogos de bacilomicina D en caldos de cultivo de *B. amyloliquefaciens* 83, y se han clasificado en tres grupos isoméricos: 1044, 1058, 1072 Da de peso molecular. La secuencia peptídica de estos homólogos es la siguiente: a Asn1-Tyr2-Asn3-Pro4-Glu5-Ser6-Thr7. Esta secuencia forma un anillo con una cadena de ácido graso  $\beta$ -NH<sub>2</sub> de longitud variable (C14, C15 y C16).

Sin embargo, el homólogo que demostró ser de importancia para la antibiosis *in vitro* de *C. gloeosporioides* 09, debido a que es la más abundante en la mezcla es el homólogo bacilomicina D 1044 Da C<sub>14</sub>.

La figura 2 muestra la estructura propuesta para una bacilomicina D 1044 Da C<sub>14</sub> (Luna Bulbarela, 2015).

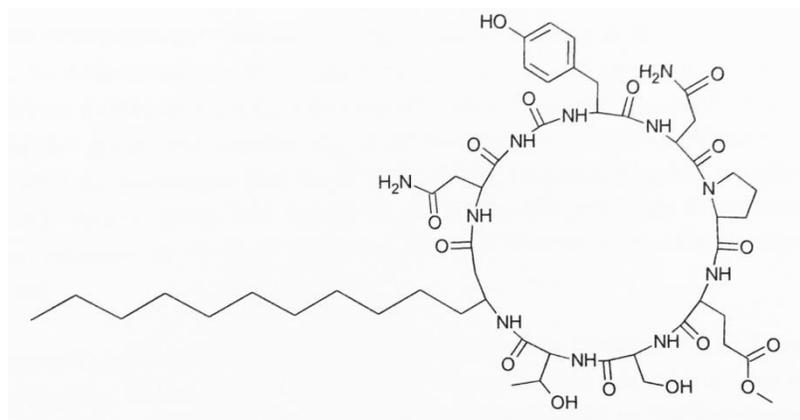


Figura 2. Estructura propuesta de la bacilomicina D 1044 Da C<sub>14</sub> (Luna Bulbarela, 2015).

## 6. Procedimiento y descripción de las actividades realizadas

### 6.1 Estrategia experimental

Partiendo de la aseveración de que el homólogo bacilomicina D 1044 C<sub>14</sub> biosintetizado por *B. amyloliquefaciens* 83 tiene la capacidad de provocar daños a las membranas (ej. permeabilización) de las esporas de *C. gloeosporioides* 09, se planteó una estrategia experimental donde el sujeto de estudio fueran las esporas *C. gloeosporioides* 09, y el factor a evaluar fuera la intensidad de fluorescencia color rojo producida por la presencia de yoduro de propidio dentro de las células con membranas comprometidas y la disminución de la intensidad de fluorescencia verde por la presencia de SYTO 9 debido al fenómeno FRED, siendo la concentración del lipopéptido y el tiempo de exposición las variables que afectaban a dichos factores y finalmente empleándose anfotericina B a diferentes concentraciones y tiempos de exposición como control positivo, por su efecto significativo en la integridad de la membrana.

Se propusieron estrategias que permitieran validar o no la aseveración planteada, la cual se dividió en tres etapas principales, primeramente se empleó la citometría de flujo por la capacidad que tiene esta técnica de cuantificar una población delimitada de objetos y la velocidad (5,0000 objetos por segundo) con la que puede cuantificar la fluorescencia de los objetos presentes en la muestra, sin embargo por la formación de agregados celulares no fue factible la utilización de esta técnica, aunado al aumento de fluorescencia verde en esporas con daños a nivel membrana al aumentar la fluorescencia de SYTO 9, al utilizar una mezcla de cromóforos del “LIVE/DEAD™ FungaLight™ Yeast Viability Kit” .

Posteriormente la segunda etapa consistió en el uso de la microscopía de fluorescencia, la cual al ser utilizada para visualizar hongos filamentos, permitirá la visualización de la presencia de yoduro de propidio en forma de fluorescencia roja en las esporas que tengan su membrana comprometida, utilizando únicamente este cromóforo del “LIVE/DEAD™ FungaLight™ Yeast Viability Kit” como indicador de dicha afección.

Finalmente se realizó la comparación de la intensidad fluorescente en el canal rojo (donde es visualizada la fluorescencia de yoduro de propidio) mediante microscopía, entre bacilomicina D 1044 C<sub>14</sub>, y anfotericina B a diferentes concentraciones y tiempos de exposición, comparando estos resultados posteriormente con un método que cuantifique viabilidad celular, y pueda correlacionarse con la fluorescencia ocasionada por daño en la membrana.

### 6.2 Microorganismo

Para los ensayos de inhibición se empleó la cepa de *Colletotrichum gloeosporioides* 09 aislada de la filósfera de *Carica papaya* proporcionada por el Área de Horticultura del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Unidad Culiacán.

Para la utilización de esporas con el mismo tiempo de cultivo, periódicamente se colocaban explantes del hongo patógeno (1x1 cm) en el centro de cajas Petri con 25 mL de medio sólido de papa y dextrosa (PDA, BD DIFCO®), incubándose en oscuridad a 29°C. Repitiéndose este proceso cada 15 días, ya que las esporas utilizadas tenían 10 días de incubación.

### **6.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC<sub>100</sub>) de anfotericina B y bacilomicina D sobre esporas de *C. gloesporioides* 09**

La MIC<sub>100</sub> se definió como la concentración (en µM) a la cual se disminuyó en un cien por ciento el crecimiento de *C. gloesporioides* 09 con respecto a un control sin anfotericina B, después de 58 h de cultivo del hongo.

Dichos ensayos fueron realizados como cultivos en medio líquidos, en matraces de 50 mL de capacidad máxima, con 10 mL de medio, caldo de papa dextrosa (PDB, BD DIFCO®). Los matraces fueron inoculados con una suspensión de esporas para alcanzar una concentración inicial de  $2 \times 10^5$  cel/mL, ya que esta concentración se encuentra dentro del rango de su germinación óptima *in vitro* (conidios), inhibiéndose si ésta es igual o superior a  $1 \times 10^7$  conidios/mL, (Kenny *et al.*, 2012).

Las esporas se obtuvieron de los cultivos hechos en cajas Petri (con 10 días de incubación). Para la recuperación de éstas, se adicionaron a cada caja 10 mL de solución salina (3.4 g/L) y se recolectó mediante la utilización de una jeringa, posteriormente el líquido recuperado fue filtrado para asegurar que solo hubieran esporas en dicha solución (solución inicial).

La concentración de la solución inicial fue cuantificada en la cámara de Neubauer, haciéndose una dilución 1:10 con la solución salina utilizada anteriormente.

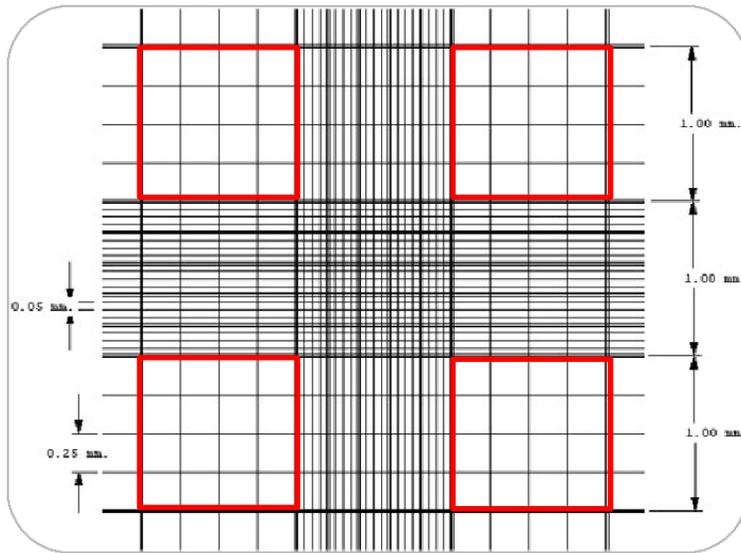


Figura 3. Detalle de la rejilla de una cámara de Neubauer

Para obtener la concentración de la solución inicial, se tomó una muestra de la solución diluida y se colocó en el recuadro de la cámara de Neubauer y se visualizó en el microscopio a un objetivo de 40X. Se sumaron las esporas contadas en los recuadro de 1x1 (marcados con en rojo en la figura 3) y se utilizó la siguiente fórmula para obtener las concentración de esporas en la solución inicial ( $4 \times 10^{-4}$  representa el volumen total de los cuatro recuadros de 1x1 mm donde fueron cuantificadas las esporas).

$$\frac{\text{esporas}}{\text{mL}} = (\text{No. de esporas} * \text{dilusión}) / 4 \times 10^{-4}$$

Posteriormente se inocularon los matraces para obtener una concentración final en éstos de  $2 \times 10^5$  esporas/ mL. Homogenizando para cada ensayo el inóculo a un volumen de 100  $\mu\text{L}$  con solución salina.

Las concentraciones finales de anfotericina B por ensayo (matraz) fueron 1, 2, 3, 4, 5, 10 y 13  $\mu\text{M}$ , para esto se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  del fungicida disuelto en DMSO, un control absoluto (sin presencia de la fungicida y solvente) y un control negativo (100  $\mu\text{L}$  de DMSO), agregándose de manera inmediata a los matraces inoculados anteriormente. Los matraces se incubaron a una velocidad de 120 rpm a 29°C durante 58 h, esta prueba se llevó a cabo tres veces con los respectivos triplicados.

Durante las primeras 10 h cada 2 h se tomaron muestras (100  $\mu\text{L}$ ) de cada tratamiento para visualizar en el microscopio la morfología de las esporas.

Finalizándose las 58 h, se obtuvo el peso seco del pellet celular formado durante este tiempo, mediante gravimetría. La biomasa fue recolectada en papeles filtro

previamente llevados a peso constante mediante la utilización de un horno que se encontraba a una temperatura de 70-100°C. Posterior a esto las muestras fueron secadas en el mismo horno durante 24 h, finalizado este tiempo las muestras fueron colocadas en un desecador hasta que su temperatura fuera la del ambiente. Alcanzada la temperatura ambiente, los papeles filtro junto con la biomasa fueron pesados, y haciendo la diferencia de peso se determinó en g/L la biomasa formada por *C. gloeosporioides* 09 bajo las distintas concentraciones de anfotericina B.

Previo a la determinación del peso seco, de los matraces se recolectó el conjunto de pellets formados durante las 58 h de cultivo, y se colocaron respectivamente en una caja de Petri para capturar fotografías.

A partir de los datos de biomasa obtenidos por gravimetría, se construyó un gráfico donde indicara el porcentaje de crecimiento micelial (con respecto al control negativo) en función de la concentración del antibiótico. Estos datos fueron ajustados a un modelo de tipo logístico para determinar la MIC<sub>100</sub>, realizándose el ajuste de los datos mediante Sigma Plot (versión 12.0) (Luna Bulbarela, 2015).

La MIC<sub>100</sub> del homólogo bacilomicina D 1044 Da C<sub>14</sub> para esporas de *C. gloeosporioides* 09 ya estaba determinada en estudios previos, siendo de 22.1 µM, la cual fue cuantificada con la metodología descrita anteriormente (Luna Bulbarela, 2015).

#### **6.4 Citometría de flujo**

En el primer ensayo llevado a cabo en el citómetro de flujo Amnis ImageStream®X Mark II, se utilizaron los cromóforos Syto 9 Green y Ioduro de propido (PI) de “LIVE/DEAD™ FungaLight™ Yeast Viability Kit” (Molecular Probes, Invitrogen, L34952) en una muestra de esporas de *C. gloeosporioides* 09 tratadas con el homólogo bacilomicina D 1044 Da C<sub>14</sub> a una concentración, correspondiente a la MIC<sub>100</sub> y superiores, haciendo un seguimiento del cambio de fluorescencia a través del tiempo.

Los controles (sin presencia del lipopéptido) usados en esta técnica fueron muestras de 1mL de esporas ( $1 \times 10^7$  cel/mL) vivas teñidas con SYTO 9 Green, otra con PI y finalmente una muestra teñida con los dos cromóforos, así como muestras con esporas muertas (las cuales fueron desactivadas por tratamiento térmico a 90°C durante 50 min) utilizando la misma concentración y mismo procedimiento de tinción que las esporas vivas. Todos los controles tuvieron el mismo tiempo de exposición a los cromóforos (15 min) antes de ser introducidos al citómetro.

Para llevar a cabo las tinciones de los ensayos con el lipopéptido, se añadió 1µL de cada solución de cromóforos (SYTO 9 Green y PI) a 1mL de muestra de esporas,

teniendo el mismo tiempo de exposición, finalizado este tiempo fue agregado el lipopéptido para obtener una concentración correspondiente a la MIC<sub>100</sub> o superior. Se introdujo la muestra al citómetro de manera inmediata, para obtener los resultados del tiempo cero. Dicha muestra fue sometida al análisis de citometría cada diez minutos durante hora y media.

El segundo ensayo, llevado a cabo en el citómetro de flujo, fue similar al descrito anteriormente, sin embargo en esta ocasión solo se utilizó el PI. Teniendo como control esporas vivas teñidas con PI y esporas muertas teñidas con PI. Y para el ensayo con exposición a bacilomicina D, se utilizó el mismo procedimiento con la misma concentración de bacilomicina D 1044 Da C<sub>14</sub> y con un tiempo de exposición al lipopéptido de 1.5 h.

Para el análisis de los resultados emitidos por el citómetro, fue empleado el programa Image Data Exploration and Analysis Software (IDEAS®).

### **6.5 Microscopía de fluorescencia**

El ensayo de integridad de la membrana fue llevado a cabo mediante tinciones con PI. El PI fue obtenido del "LIVE/DEAD™ FungaLight™ Yeast Viability Kit" (Molecular Probes, Invitrogen, L34952). Para estos ensayos las esporas fueron sujetas a concentraciones inhibitorias del homólogo bacilomicina D 1044 Da C<sub>14</sub> (50μM). Las imágenes de contraste de fase (PhC, por sus siglas en inglés) y fluorescencia (F) fueron tomadas a las 80 min después de la adición del lipopéptido. Para llevar a cabo las tinciones, se añadió 1μL de la solución PI a 1mL de la suspensión de células ( $1 \times 10^7$  cel/mL) y el tiempo de exposición con el cromóforo fue de 15 min. El microscopio utilizado fue un Zeiss Axioskop (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany), el cual tenía objetivos Zeiss de 20X/0.5 y 40X/0.75. El set de filtros utilizados para la fluorescencia tenía un rango de longitud de ondas compatibles para tomar las imágenes fluorescentes con PI (BP 546 FT 580 LP 590). Tanto las imágenes de PhC como de F fueron tomadas con una cámara CCD Photometrics CoolSnapcf Monochromatic. Las imágenes fluorescentes fueron tomadas en escala de grises y para su posterior visualización fueron transformadas a pseudo color en escala de rojos utilizando el programa ImageJ.

La autofluorescencia de las esporas fue cuantificada para confirmar que no hubiera interferencia con la emitida por el cromóforo (PI), sin embargo no hubo detección de autofluorescencia.

### **6.6 Análisis estadístico**

Los análisis de varianza (ANOVA) y los análisis de comparación de medias (prueba de Tukey) se realizaron en el programa estadístico Minitab 18 ( $\alpha$  0.05).

## 7. Resultados y Discusiones

### 7.1 Comparación de la actividad antifúngica entre bacilomicina D y anfotericina B mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria

Para comprobar que el solvente (DMSO) utilizado en los ensayos de anfotericina B no tenía efecto sobre la generación de biomasa de *C. gloeosporioides* 09 se compararon y analizaron los resultados obtenidos del control absoluto y del control negativo, dichos resultados demostraron no tener una diferencia estadística significativa; indicando que el solvente empleado no tiene efecto sobre el peso seco de *C. gloeosporioides* 09. Asegurando que el empleo del DMSO como solvente es una elección adecuada.

Los datos en biomasa (g/L) generados por *C. gloeosporioides* 09 que se obtuvieron mediante los ensayos a diferentes concentraciones de anfotericina B se muestran en la figura 4.

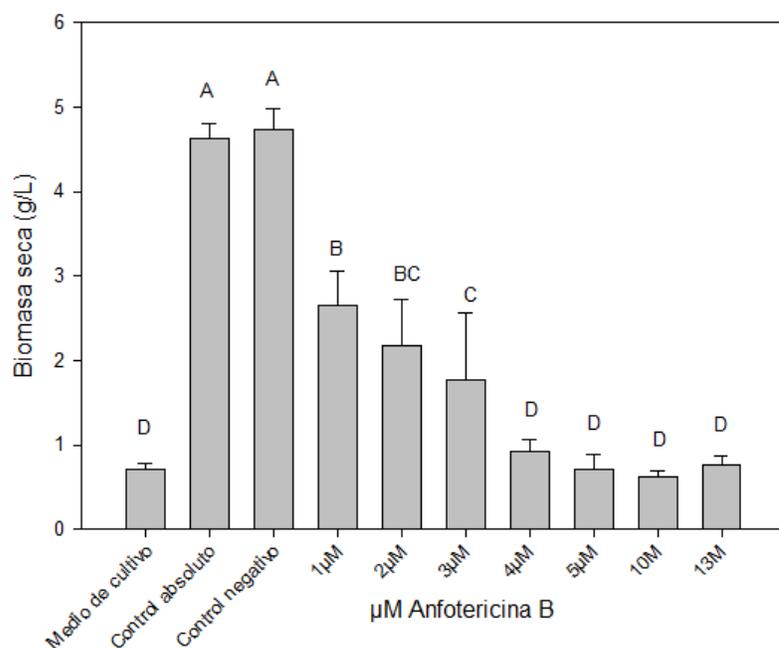


Figura 4. Efecto de la concentración de anfotericina B sobre el peso seco de *C. gloeosporioides* 09 a las 58 h de cultivo.

En la figura 4, se observa claramente que el mayor efecto inhibitorio de la anfotericina B sobre el peso seco ocurre a las concentraciones de entre 1 a 4 µM, teniendo una relación indirectamente proporcional; es decir a mayor concentración de anfotericina B menor crecimiento celular. A partir de la concentración de 4µM no hay diferencia significativa con respecto al empleo de concentraciones más altas, por lo tanto esta es la concentración a partir de la cual ya no hay producción significativa de biomasa.

Se ha demostrado en otros microorganismos tal como *Candidia albicans* que al estar en presencia de concentraciones subinhibitorias de anfotericina B afecta la formación de conidios e hifas, así como su adherencia a distintas superficies (Nugent & Couchot, 1986).

Dichas afecciones a las hifas también se pueden observar en *C. gloeosporioides* 09 a distintas concentraciones de anfotericina B (figura 5).

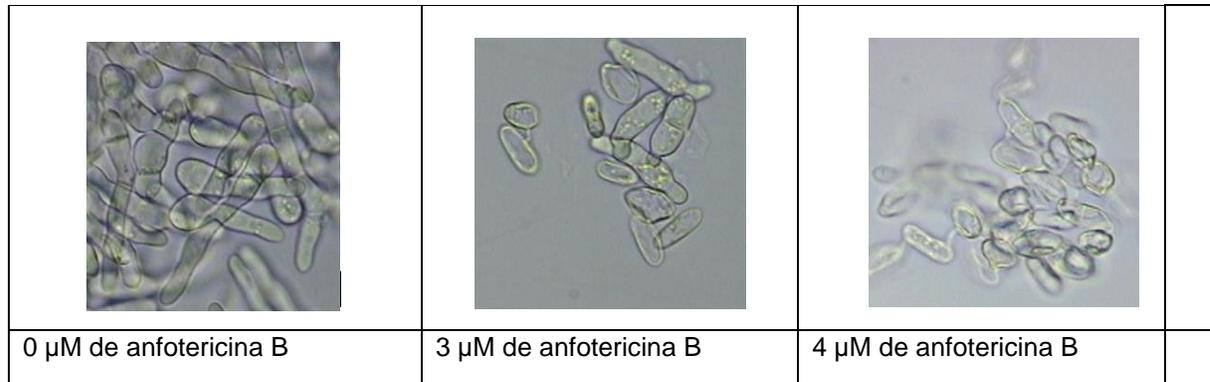


Figura 5. Afección en tubos germinativos a distintas concentraciones de anfotericina B en *C. gloeosporioides* 09 a 8 h de cultivo (TG: tubos germinativos).

Observándose que a una concentración de 3μM de anfotericina B, las esporas aún generan hifas, sin embargo, difieren en morfología respecto a las esporas que no han sido expuestas a anfotericina B (control negativo). Por otra parte a una concentración de 4μM no hay presencia de hifas en ninguna espora, solo se observan esporas con una morfología distinta a una espora sana de *C. gloeosporioides*.

La disminución de la germinación de las esporas con respecto al control se debe a que en presencia de anfotericina B se aumenta la permeabilidad de la membrana, y comienza la pérdida de  $K^+$  y  $Mg^{++}$  fuera de las células y por lo consiguiente se produce la lisis celular provocando su muerte (Nugent & Couchot, 1986).

Considerando que la  $MIC_{100}$  es la disminución en un cien por ciento del crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* 09 con respecto al control negativo; 4μM resulta ser la concentración de anfotericina B donde ya no se observa un crecimiento significativo del hongo, por tanto corresponde a la  $MIC_{100}$  de este antibiótico, dicho fenómeno se puede observar en la figura 6, donde se han convertido los datos de peso seco a porcentaje de crecimiento ajustando los datos a un modelo de tipo logístico.

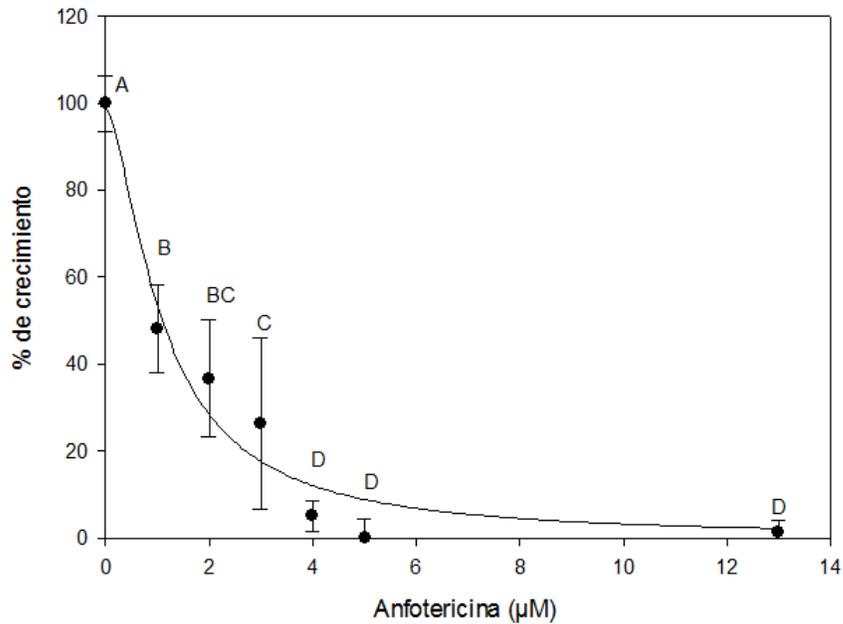


Figura 6. Porcentaje de crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* 09 (a las 58 h) con respecto a un control, en función de la concentración de anfotericina B

Esta deducción puede ser corroborada de manera visual en la figura 7, donde se muestran las fotografías de los pellets formados a diferentes concentraciones de anfotericina B.

A partir de la concentración de 4 µM de anfotericina B, la presencia de pellets es casi nula, esto confirma lo mencionado anteriormente, ya que la biomasa visualizada en las fotografías de la figura 7 a concentraciones de 4 y 5 µM, no tiene diferencia significativa en porcentaje de crecimiento con respecto a los tratamientos de 10 y 13 µM, donde ya no se observa presencia de pellets.

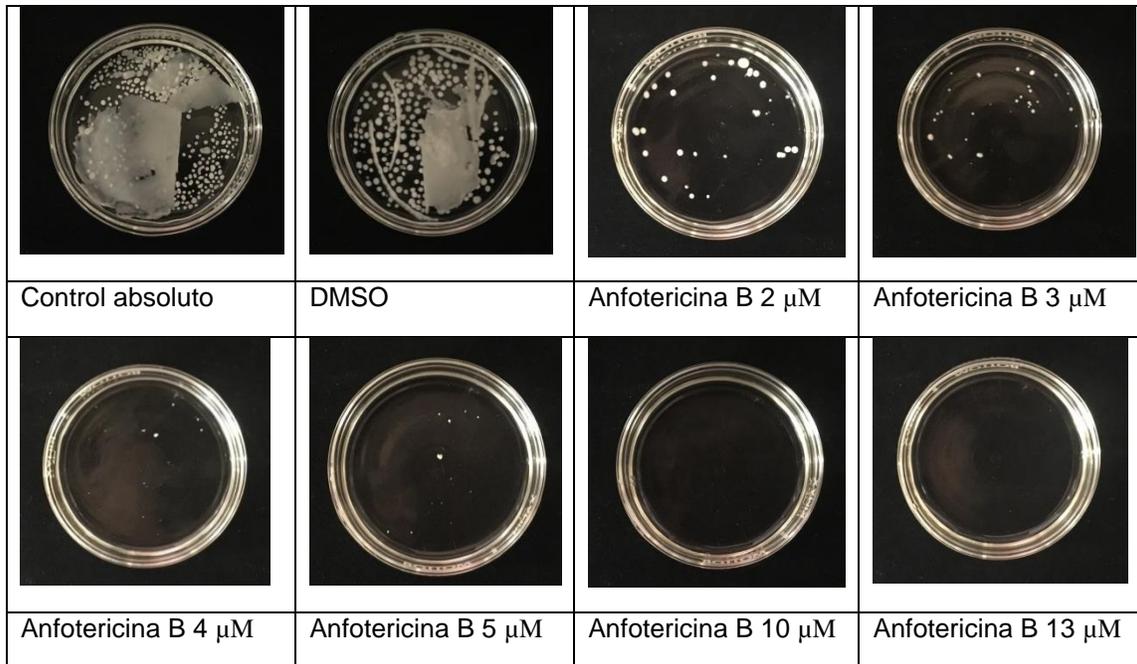


Figura 7. Pellets de *C. gloeosporioides* 09 formados a diferentes concentraciones de anfotericina B a las 58 h.

Comparando las concentraciones necesarias de bacilomicina D 1044 Da C<sub>14</sub> (22.5  $\mu\text{M}$ ) y anfotericina B (4 $\mu\text{M}$ ) para la inhibición de las esporas de *C. gloeosporioides* 09, se deduce que a una menor concentración de anfotericina B se alcanza el mismo daño producido a la biomasa de *C. gloeosporioides* comparado con bacilomicina D 1044 Da C<sub>14</sub>. Cabe mencionar que en estudios anteriores (Zhang *et al.*, 2013) demuestran que bacilomicina a concentraciones de IC<sub>50</sub> (concentración requerida para obtener un 50% de inhibición) permeabilizaba ligeramente hifas del hongo, por el contrario, anfotericina B en las concentraciones de IC<sub>50</sub>, tenía una permeabilización mucho más intensa a pesar de que tenían un efecto fúngico similar.

Así mismo en distintos estudios se sugiere que el mecanismo antimicótico de anfotericina B es mediante la formación de canales o poros acuosos en la membrana plasmática de la célula, siendo el ergosterol (esterol más abundante en las membranas de los hongos) la molécula de anclaje de este antibiótico (Krull & Bley, 2015). Proponiéndose a este mecanismo por el cual anfotericina B ha afectado a las esporas de *C. gloeosporioides* 09.

## 7.2 Efecto de bacilomicina D 1044 Da C<sub>14</sub> sobre el daño en las membranas de las esporas de *C. gloeosporioides* 09, analizado mediante citometría de flujo

Para llevar a cabo el análisis de la afección a la membrana de esporas de *C. gloeosporioides* 09 ocasionadas por bacilomicina D 1044 Da C<sub>14</sub> mediante citometría de flujo, se discernió entre las distintas morfologías de los objetos presentes en la muestra, para asegurar una la elección de esporas individuales, que tuvieran una forma fusiforme (semejante a un elipse), con una longitud de 12-18  $\mu\text{m}$  y un ancho de 4-4.5  $\mu\text{m}$  (dimensiones características de las esporas de *Colletotrichum gloeosporioides*, Weir *et al.*, 2012).

De todos los objetos que pudieron ser analizados en el citómetro sólo se consideraron los que están en la población seleccionada en rojo en la figura 8, ya que estos (esporas) cumplen con las características morfológicas mencionadas anteriormente.

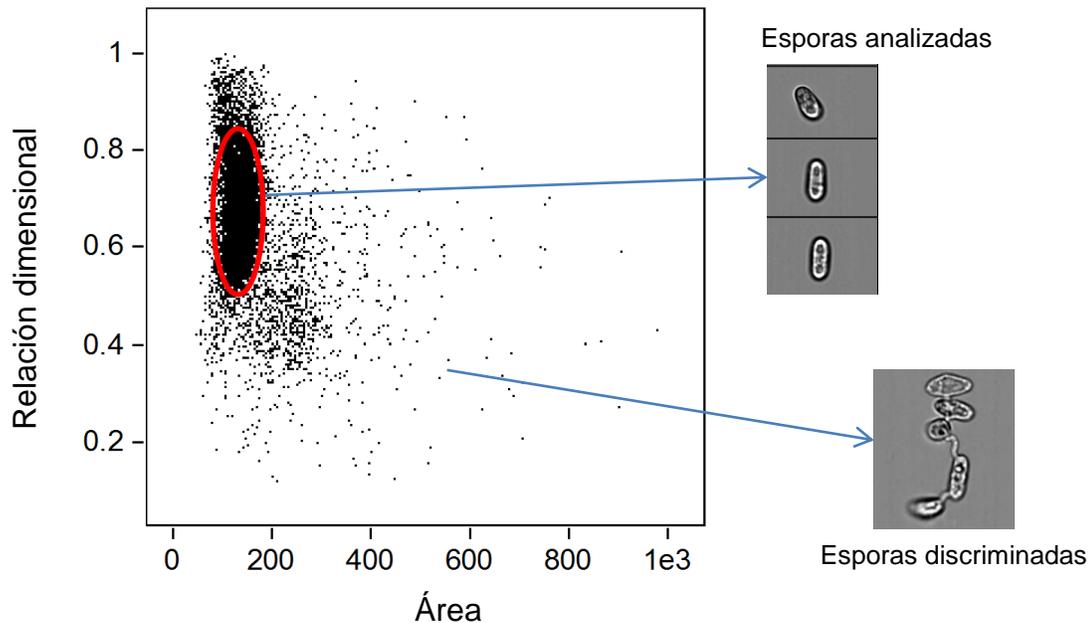


Figura 8. Histograma de morfología de esporas viables de *C. gloeosporioides* 09

Antes de llevar a cabo las tinciones con los cromóforos, una muestra de esporas de *C. gloeosporioides* 09 ( $1 \times 10^7$  esporas/ mL) recolectadas y re suspendidas en medio PDB fueron analizada en el citómetro, sin ningún tratamiento ni adición de cromóforos, para determinar la presencia o no de autofluorescencia (figura 9).

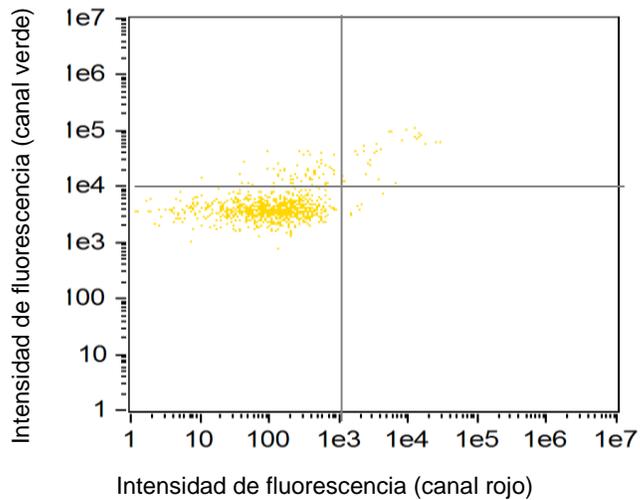


Figura 9. Autofluorescencia de esporas de *C. gloeosporioides* 09

Dichas esporas fueron analizadas en los dos distintos canales, rojo (donde se visualiza PI) y verde (donde se visualiza SYTO 9), evidenciando que las esporas de *C. gloeosporioides* 09 presentan autofluorescencia en distintas intensidades dependiendo del canal en donde fueron visualizadas (figura 9).

Al analizar estas esporas en el canal rojo (donde fluorescen las esporas con membranas comprometidas al ser teñidas por PI), se encontró un rango de intensidad de fluorescencia emitida igual o menor a  $1e^3$ , por lo tanto las emisiones de fluorescencia que se encuentren debajo de la intensidad de  $1e^3$  en el canal rojo, se discriminarán ya que no pertenece a la fluorescencia de PI, si no a la de la espora. Así mismo al analizarlas en el canal verde (canal donde se visualiza la fluorescencia de SYTO 9), la emisión de fluorescencia menor o igual a  $1e^4$ , se discriminará también para los posteriores análisis, ya que pertenece a la autofluorescencia de las esporas y no de SYTO 9.

En los primeros ensayos de doble tinción en esporas vivas (figura 10) analizadas en campo verde, estas emitieron una intensidad de fluorescencia en un rango de  $1e^5$ - $1e^6$ , superándose el rango de autofluorescencia en ese canal, confirmando que SYTO 9 está dentro de las esporas y está generando dicha emisión fluorescente. Sin embargo al analizar a estas mismas esporas en el canal rojo, hubo la aparición de intensidad de fluorescencia arriba de la autofluorescencia en este canal, esto da a entender que dentro de la población de esporas que nosotros consideramos vivas hay la existencia de esporas muertas y con membranas dañadas, siendo esta una aseveración no del todo incorrecta, ya que nunca se puede asegurar un 100% de viabilidad en todas las esporas.

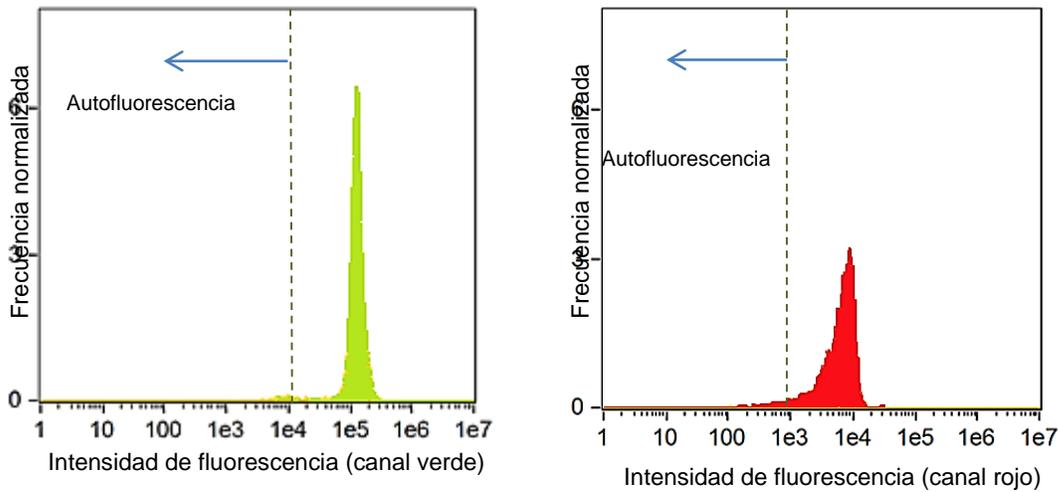


Figura 10. Análisis de fluorescencia con esporas vivas de *C. gloeosporioides* 09 con doble tinción, visualizadas en canal verde y canal rojo.

Este mismo análisis se llevó a cabo para esporas muertas de *C. gloeosporioides* 09 (desactivadas con calor, figura 11), con doble tinción. En donde se pudo observar que las esporas muertas visualizadas en el canal verde muestran la misma intensidad de fluorescencia que las esporas vivas visualizadas en el mismo canal, este fenómeno puede ser atribuido a la penetración indistinta SYTO 9 a la membrana, ya que este cromóforo tiene la capacidad de penetrar a las células con o sin membranas comprometidas. Así mismo, como era de esperarse, al ser visualizadas estas esporas en campo rojo, la intensidad de fluorescencia fue mayor que la emisión en autofluorescencia, por lo tanto, de esta manera se ratifica que el PI solo penetra a las esporas que tienen membranas comprometidas, puesto que esta molécula no puede penetrar a células con membranas intactas.

Cabe mencionar, que el análisis de las muestras de esporas muertas se llevaron a cabo inmediatamente terminados los 15 min de exposición a la mezcla cromóforos.

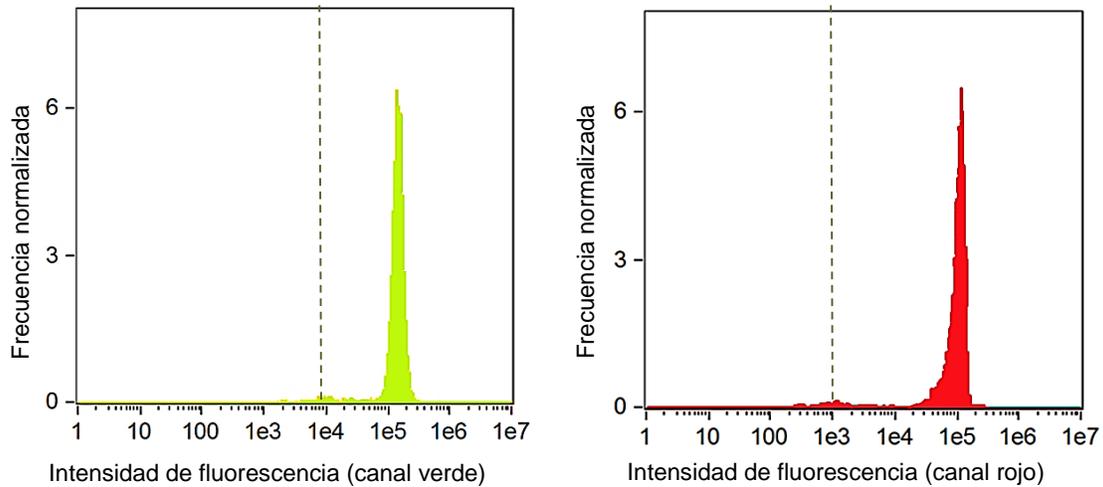


Figura 11. Análisis de fluorescencia con esporas muertas (desactivadas con calor) de *C. gloeosporioides* 09 con doble tinción, visualizadas en canal verde y canal rojo.

Sin embargo cuando se realizaron los análisis de esporas de *C. gloeosporioides* 09 con doble tinción expuestas a concentraciones inhibitorias de bacilomicina D 1044 Da C<sub>14</sub> (50µM) y a un tiempo de exposición al lipopéptido de 1.5 h, se observó que estas esporas tenían una intensidad fluorescente mayor en el canal verde que las esporas vivas, así como nula existencia de fluorescencia en el canal rojo en comparación a la intensidad de fluorescencia emitida en las esporas muertas. Esperándose en este ensayo una mayor intensidad de fluorescencia en el canal rojo, ya que se asumía que a ese tiempo el homólogo bacilomicina D 1044 Da C<sub>14</sub> ya hubiera permeado en algún porcentaje las membranas de las esporas de *C. gloeosporioides* 09, suponiendo también la disminución de la intensidad de fluorescencia en el canal verde, por el fenómeno FRED que ocurre entre estos dos cromóforos al estar en contacto.

Por lo que se decidió plantear un ensayo diferente, donde esporas vivas y muertas (desactivadas por calor) fueran expuesta únicamente a un cromóforo, en este caso SYTO 9 (Figura 12), para poder argumentar porque el aumento de fluorescencia en campo verde de las esporas expuestas a bacilomicina D 1044 Da C<sub>14</sub>.

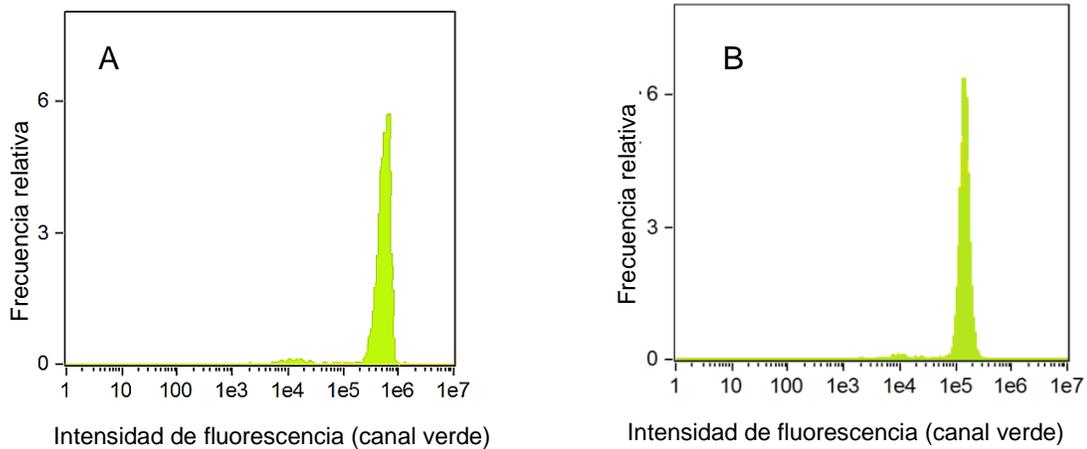


Figura 12. Análisis de fluorescencia con esporas vivas (A) y muertas (B) de *C. gloeosporioides* 09 teñidas con SYTO 9, visualizadas en el canal verde

Demostrándose que efectivamente las esporas muertas teñidas con SYTO 9 y visualizadas en el canal verde muestran una emisión de fluorescencia mayor ( $10^6$ ) a las esporas vivas bajo las mismas condiciones ( $10^5$ ). Sugiriendo que las esporas muertas están siendo mayormente penetradas por SYTO 9 a comparación de las células vivas. Ocurriendo este mismo fenómeno en el estudio hecho por Zhang *et al* (2013) donde a mayor afección a la membrana mayor fluorescencia verde emitida por SYTOX.

Por esta razón se optó por la utilización el PI de manera individual en las muestras, ya que de esta manera se evitará el inconveniente de tener una mayor fluorescencia verde que roja cuando las esporas se encuentren con las membranas comprometidas.

Dado a lo anterior, se planteó un análisis diferente, donde las esporas expuestas concentraciones inhibitorias de bacilomicina D 1044 Da C<sub>14</sub> (50  $\mu$ M) por 1.5 h, como esporas vivas y muertas fueran teñidas únicamente con PI (figura 13), para evitar el fenómeno generado por la fluorescencia emitida por SYTO, cuando las membranas se ven comprometidas.

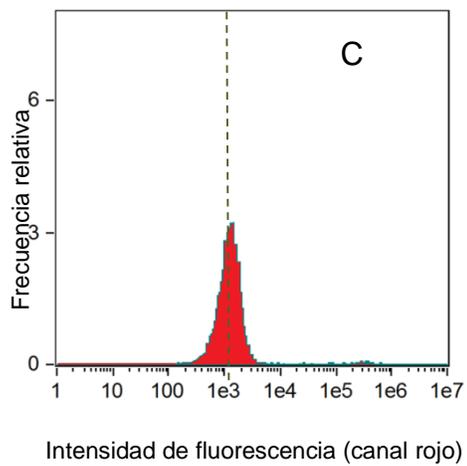
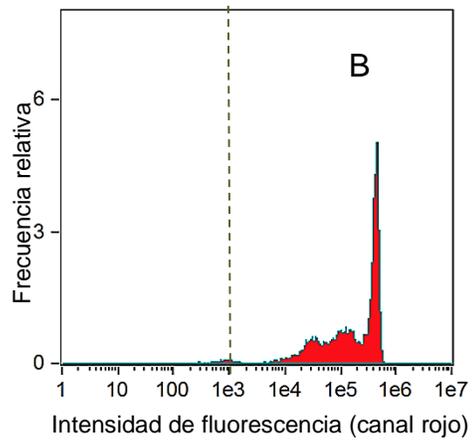
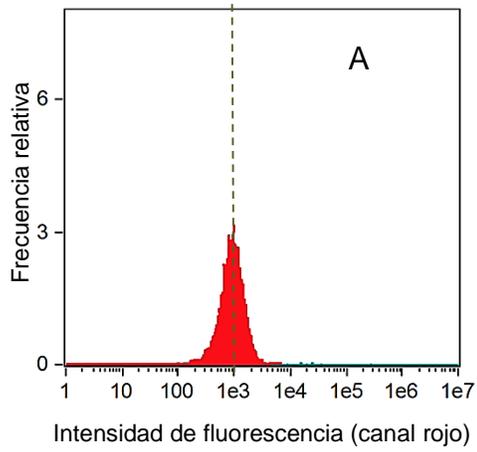


Figura 13. Análisis de fluorescencia con: A) esporas vivas, B) esporas muertas y C) esporas expuestas a concentraciones inhibitorias de bacilomicina D 1044 Da C14 (50  $\mu$ M). Únicamente teñidas con IP.

Como era de esperarse en este ensayo, las células vivas no presentan fluorescencia roja (la intensidad de fluorescencia visualizada en el histograma está dentro del rango de autofluorescencia en el canal de PI) y las células muertas sí. No obstante, el exponer a las esporas a una concentración inhibitoria de bacilomicina D 1044 Da C<sub>14</sub> durante 1.5 h no fue suficiente para que éstas emitieran fluorescencia roja debido a la presencia de daño a la membrana, (la intensidad de fluorescencia visualizada en el histograma está dentro del rango de autofluorescencia en el canal de PI) sugiriendo que el tiempo de exposición no es suficiente para presentar algún efecto en la permeabilidad de la membrana de las esporas de *C. gloeosporioides* 09, ya que a esta concentración a 58 h de exposición no se presenta germinación ni desarrollo de biomasa de *C. gloeosporioides* 09 (Luna Bulbarela, 2015).

Por lo tanto se monitoreó durante el tiempo la fluorescencia roja emitida por las esporas de *C. gloeosporioides* 09 en el canal rojo después de una exposición de 1.5 h al lipopéptido en el citómetro, sin embargo, se presentó la aglomeración de las esporas, debido a lo cual, fue complejo el análisis de fluorescencia mediante citometría de flujo, ya que el tamaño de estos aglomerados impedían su paso por el aparato.

De tal forma que para visualizar la aparición de fluorescencia color rojo (PI) como consecuencia de la pérdida de la integridad de la membrana de las esporas de *C. gloeosporioides* 09 por la interacción de bacilomicina D 1044 C<sub>14</sub> fue necesaria la implementación de otra técnica de análisis de fluorescencia, como la microscopía.

### **7.3 Efecto de bacilomicina D sobre la integridad de la membrana de las esporas de *C. gloeosporioides* 09 analizado mediante microscopía**

Las esporas de *C. gloeosporioides* 09 que fueron expuestas a concentraciones inhibitorias (50 µM) de bacilomicina D 1044 Da C<sub>14</sub> teñidas solo con PI durante un tiempo de exposición de 80 min, mostraron fluorescencia color rojo, esto evidencia que particularmente este homólogo daña a la membrana celular de la espora, haciéndola más permeable, ya que el Ioduro de propicio solo llega a permear a las células cuando sus membranas están comprometidas (Ricciardi & Nicoletti, 2006; Martinez Salazar, 2009)

Este resultado, se puede comparar con lo reportado por Zhang *et al*, (2013) quienes realizaron ensayos de SEM y TEM para analizar la fluorescencia emitida por las esporas de *Rhizoctonia solani* al ser expuestas a bacilomicina L, los autores pudieron confirmar la existencia de afecciones a las paredes y membranas de las hifas de este hongo, mostrando cambios en la morfología y citología en las células, así mismo hubo daños en las membranas nucleares, indicando que bacilomicina L probablemente fue capaz de interactuar con estructuras citoplasmáticas.

En la figura 14, se pueden observar las fotografías tomadas por la cámara CCD Photometrics CoolSnappcf Monochromatic en el microscopio Zeiss Axioskop, transformadas a pseudo color en escala de rojos utilizando el programa de ImageJ.

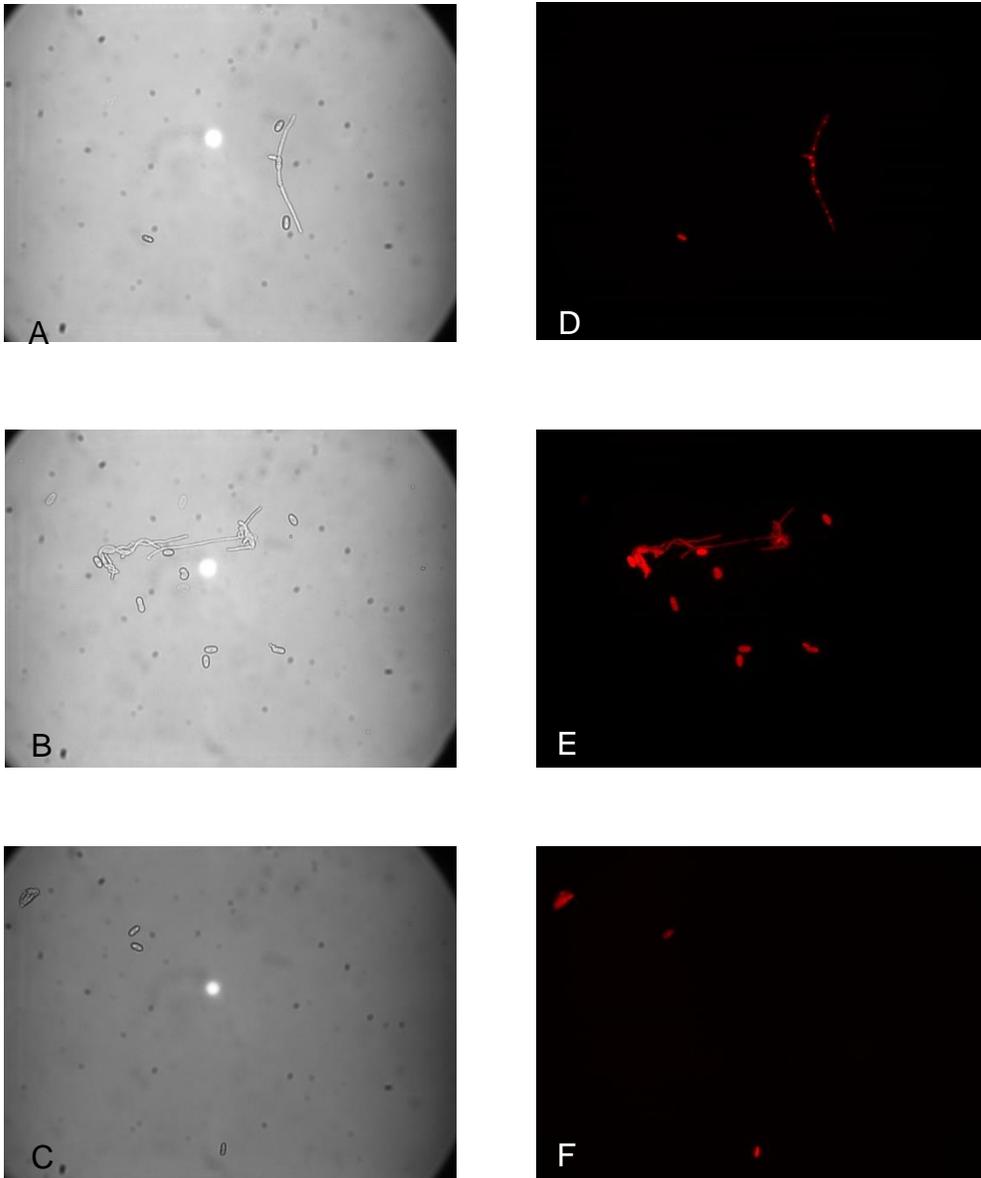


Figura 14. Microscopía de fluorescencia de esporas de *C. gloeosporioides* 09 expuestas a 50 $\mu$ M de bacilomicina D a 80 min en campo claro (A a C) y en campo fluorescente rojo (D a F).

Donde a 80 min de exposición con bacilomicina D 1044 Da C<sub>14</sub> a una concentración de 50  $\mu$ M las esporas individuales de *C. gloeosporioides* 09 ya manifiestan

permeabilización en la membrana, siendo este fenómeno evidente ya que puede ser visualizada la fluorescencia color rojo debido a la presencia intracelular de PI.

En trabajos anteriores se menciona que la capacidad de la bacilomicina para afectar a las membranas de las hifas de *R. solani* se debe a que este lipopéptido no está restringido a la interacción solo con ergosterol, sino también con otros esteroides y fosfolípidos, provocando alteraciones en las membranas de las hifas del hongo en proporción de la concentración de bacilomicina. Esto sustenta que la disrupción de la membrana por el lipopéptido juega un rol importante en la actividad antifúngica. Igualmente los resultados de este trabajo indicaron que la bacilomicina tenía la capacidad de unirse al ADN de las células de hifas de *R. solani* sugiriendo que este lipopéptido interactúa con algunos objetivos intracelulares a través de la unión al ADN, después de penetrar las membranas celulares, teniendo como resultado la muerte celular de las hifas (Zhang *et al.*, 2013).

Así mismo Gu *et al* (2017) sugieren que la permeabilización de membrana no es el único mecanismo por el cual bacilomicina D afecta a las esporas del hongo *Fusarium graminearum*, ya que este lipopéptido demostró que promueve la acumulación de especies reactivas de oxígeno (EOR) causando la muerte de las conidias y de las hifas del hongo, y por consecuencia el citoplasma sale de la membrana celular como resultado del tratamiento con el lipopéptido. Presentándose también alteraciones en el metabolismo del hongo, ya que éste en presencia del lipopéptido disminuyó la regulación de los genes implicados en la eliminación de las EOR, mientras que los genes implicados en la síntesis de deoxinivalenol (citotoxina) fueron aumentados, siendo estas manifestaciones de la acción antifúngica de bacilomicina D en *F. graminearum*.

## 8. Conclusiones y recomendaciones

Durante la realización del presente proyecto, se logró obtener, la concentración mínima inhibitoria ( $MIC_{100}$ ) de anfotericina B para *C. gloeosporioides* 09, siendo  $4\mu M$ . Así mismo para llevar a cabo la metodología de gravimetría empleando papel filtro, se propone que después de filtrar la muestra realizar lavados de la biomasa con agua destilada hasta eliminar las partículas ajenas a la biomasa del hongo, antes de disponerlas al secado en el horno hasta peso constante. De esta forma evitar el error que el medio de cultivo tiene en biomasa y porcentaje de crecimiento.

Así mismo gracias a los ensayos realizados en el citómetro Amnis ImageStream®X Mark II, se llegó a la conclusión de que este instrumento aun siendo un equipo útil para la medición de distintas variables morfológicas y fluorescentes de partículas individuales, no es recomendado para la cuantificación de fluorescencia en esporas de *C. gloeosporioides* 09, ya que estas tienden a aglomerarse, y debido al tamaño de los agregados es complicado su paso por el citómetro. No obstante, gracias a al análisis de las imágenes con doble tinción mediante la utilización del programa IDEAS, se pudo determinar que es conveniente el empleo de Ioduro de propidio sin la presencia de SYTO 9 para los posteriores ensayos de integridad de membrana que deberán llevarse a cabo con anfotericina B y bacilomicina D 1044 Da  $C_{14}$  a concentraciones subinhibitorias, a sus respectivas  $MIC$ 's e inhibitorias, para poder comparar entre estos antibióticos el modo de acción para la inhibición de *C. gloeosporioides* 09, puesto que no se ha encontrado en la literatura el efecto que tiene este homólogo de bacilomicina D en específico en las membranas de esporas, sin embargo ya es ampliamente conocido el modo de acción de anfotericina B (antibiótico formador de poros en membranas) razón por la cual es un excelente control positivo.

Así también mediante el mismo análisis llevado a cabo en el programa IDEAS, se llegó a la conclusión que SYTO 9 presenta una mayor intensidad de fluorescencia verde en esporas muertas durante las primeras 2 horas de ser expuestas a la mezcla de cromóforos. En vista de que a mayor permeabilidad de membrana hay una mayor penetración de SYTO 9 en las esporas.

Es por eso que se sugiere el empleo de diferentes proporciones de los cromóforos para poder utilizar el "LIVE/DEAD™ FungaLight™ Yeast Viability Kit" en su totalidad y visualizar en tiempo real la disminución de fluorescencia verde y el aumento de fluorescencia roja por las afecciones provocadas a la membrana de las esporas de *C. gloeosporioides* 09 en presencia de bacilomicina D 1044 Da  $C_{14}$  y anfotericina B.

Al estar presentes los agregados de esporas de *C. gloeosporioides* 09, se optó por la técnica de microscopía de fluorescencia utilizando el microscopio Zeiss Axioskop, ya que esta técnica ha sido utilizada para la visualización de hongos filamentosos, por lo que fue posible observar la aparición de fluorescencia roja en las esporas de *C. gloeosporioides* 09 expuestas a  $50\mu M$  de bacilomicina D 1044 Da  $C_{14}$  durante un periodo de 80 min. Confirmando de esta manera que este lipopéptido es capaz

de generar daños a nivel membrana en las esporas a esa concentración y tiempo de exposición. Sin embargo debido al tamaño de los agregados al momento de enfocar una zona en particular, se pierde el enfoque de otra, por lo tanto el análisis de fluorescencia se dificulta, ya que un solo objeto de estudio puede tener distintos puntos de enfoque y en consecuencia se obtienen distintas unidades de fluorescencia en un objeto analizado. Por esta razón para eficientar esta técnica, se sugiere determinar algún procedimiento para evitar la formación de agregados, ya sea mediante la filtración de las esporas después de haber sido expuestas a cualquiera de los antibióticos y de esta manera evitar los inconvenientes de los agregados y analizar solo las que se encuentren de manera individual, o adicionar algún compuesto inerte sobre la integridad de la membrana que impida la agregación de esporas.

Cabe mencionar, que para confirmar que efectivamente la afección a la membrana provocada por bacilomicina B 1044 Da C<sub>14</sub> cuantificada mediante la utilización de PI y la técnica de microscopía es proporcional a la pérdida de su viabilidad, es necesario comparar con otra técnica que cuantifique viabilidad celular, y por lo tanto poder relacionar los resultados obtenidos.

Finalmente, por los resultados obtenidos en citometría y microscopía, no fue factible la comparación de bacilomicina D 1044 Da C<sub>14</sub> con anfotericina B, ya que al encontrarse los imprevistos antes mencionados (principalmente la formación de agregados por las esporas) no fue posible comparar cuantitativamente la afección a membranas entre estos antibióticos.

## 9. Referencias

- Ambreen , A., & Shahida, H. (2010). Auxin Production Bacillus sp: Auxin quantification and effect on the growth of Solanum tuberosum. Pure and Applied Chemistry, 82(1), 313-319.
- Babu Sekar, R., & Periasamy, A. (2003). Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. The Journal of Cell Biology, 160(5), 629-633.
- Bailey, J. A., and Jeger, M. J. (1992). Colletotrichum: Biology, Pathology and Control. CAB International, Wallingford.
- Bais, H. P., Fall, R., & Vivanco, J. M. (2004). Biocontrol of Bacillus subtilis against infection of Arabidopsis roots by Pseudomonas syringae is facilitated by biofilm formation and surfactin production. Plant Physiol, 2004, 307-319.
- Banik, S., & Dey, B. K. (1982). Available phosphate content of an alluvial soil is influenced by inoculation of some isolated phosphatesolubilizing microorganism. Plant and Soil, 69(3), 353-364.
- Barkai-Golan, R. (2001) "Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables: Biological Control", Elsevier Sciences, Amsterdam, p. The Netherlands. doi: 10.1016/B978-0-444-50584-2.50011-3.
- Barrera Ramírez, L. M., Drago Serrano, M. E., Zamora , A. C., Arroto Gómez , F., Sainz Espuñes, T., & Mendoza Pérez, F. (2004). Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, 17(1), 42-55.
- Béchet, M., Castéra-Guy, J., Guez, J., Chihib, N., Coucheney, F., Coutte, F., . . . Jacques, P. (2012). Structure, biosynthesis, and properties of kurstakins, nonribosomal lipopeptides from Bacillus spp. Applied Microbiology and Biotechnology, 95(3), 593-600.
- Biocontrol News and Information. (Septiembre de 2013). Bringing a New Biofungicide to the Market in Mexico. Biocontrol News and Information, 34(3), 19-26.
- Branda, S. S., Gonzales-Pastor , J. E., Ben-Yehuda, S., Losick , R., & Kolter, R. (2001). Fruiting body formation by Bacillus subtilis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 11621-11626.
- Cannon, P. F., Damm, U., Johnston, P. R., & Weir, B. S. (2012). Colletotrichum - current status and future directions. Studies in Mycology, 73, 181–213. <https://doi.org/10.3114/sim0014>

Chen, X. H., Koumoutsis, A., Scholz, R., & Borriss, R. (2008). More than anticipated - Production of antibiotics and other secondary metabolites by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 16(1–2), 14–24. <https://doi.org/10.1159/000142891>

Correa, O. S., & Soria, M. A. (2010). Potential of Bacilli for Biocontrol and Its Exploitation in Sustainable Agriculture. In: Maheshwari, D.K. 2010 Plant Growth and Health Promoting Bacteria. *Microbiology Monographs*, 18, 197–209. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-13612-2>

Dean, R., A.L. J., Kan, V., A. Z., Pretorius, E, K.,... Foster. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414–430. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2011.00783.X>

DeBach, P., & Rosen, D. (1991). *Biological control by natural enemies*. New York: CUP Archive.

De-Boer Sietske, A., & Diderichsen, B. (1991). On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens*: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36, 1–4. <https://doi.org/10.1007/BF00164689>

Freeman, S., Katan, T., & Shabi, E. (1998). Characterization of *Colletotrichum* Species Responsible for Anthracnose Diseases of Various Fruits. *Plant Disease*, 82(6), 596–605. <https://doi.org/doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.6.596>

G. Calich, V. L., Purchio, A., & R. Paula, C. (1978). A new fluorescent viability test for fungi cell. *Mycopathologia*, 66(3), 175-177.

Gilber, G., Parke, J., Clayton, M., & Handelsman, J. (1993). Effects of an introduced bacterium on bacterial communities on roots. *Ecology*, 74, 840-854.

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.

Grangemard, I., Bonmatin, J. M., Bernillon, J., Das, B. C., Peypoux, F., & Luchenysins, G. (1999). A novel family of lipopeptide biosurfactants from *Bacillus licheniformis* IM 1307: production, isolation and structural evaluation by NMR and mass spectrometry. *J. Antibiot*, 52, 363-373.

Grangemard, I., Wallach, J., Maget-Dana, R., & Peypoux, F. (2001). Lichenysin: a more efficient cation chelator than surfactin. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 90, 199-210.

Grau, A., Gomez-Fernandez, J., Peypoux, F., & Ortiza, A. (2001). Aggregational behavior of aqueous dispersions of the antifungal lipopeptide iturin A. *Peptides*, 22(1), 1-5.

- Green, V. S., Scott, D. E., & Diack, M. (2005). Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(4), 693-701.
- Gu, Q., Yang, Y., Yuan, Q., Shi, G., Wu, L., Lou, Z., . . . Gao, X. (2017). Bacillomycin D Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* Is Involved in the Antagonistic Interaction with the Plant-Pathogenic Fungus *Fusarium graminearum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(19), 1-7.
- Handelsman, J., Raffel, S., Mester, E., Wunderlich, L., & Grau, C. (1990). Zwittermicin A, an antifungal and plant protection agent from *Bacillus cereus*. *Tetrahedron Lett*, 35, 2499-2502.
- He, H., Silo-Suh, L. A., Lethbridge, B. J., Raffel, S. J., Clardy, J., & Handelsman, J. (1994). Zwittermicin A, an antifungal and plant protection agent from *Bacillus cereus*. *Tetrahedron Lett*, 35, 2499-2502.
- Hosono, K., & Susuki, H. (1983). Acylpeptides, the inhibitors of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase. I. Purification, physicochemical properties and structures of fatty acid residues. *The Journal of Antibiotics*, 36(6), 667-673.
- Isogai, I., Takayama, S., Murakoshi, S., & Suzuki, A. (1982). Structure of  $\beta$ -amino acids in antibiotics iturin A. *Tetrahedron Lett*, 23, 3065-3068.
- Jacas Miret, J. (2005). El control biológico de plagas y enfermedades. Publicaciones de la Universitat Jaume.
- Jacques P. (2011) Surfactin and Other Lipopeptides from *Bacillus* spp.. In: Soberón-Chávez G. (eds) Biosurfactants. Microbiology Monographs, vol 20. Springer, Berlin, Heidelberg
- Jarnagin J. L & Luchsinger D. W. (1980) The Use of Fluorescein Diacetate and Ethidium Bromide as a Stain for Evaluating Viability of Mycobacteria, *Stain Technology*, 55 (4), 253-258
- Jiménez, D. I., Medina, S. A., & Gracida, J. N. (2010). Propiedades, aplicaciones y producción de biotensoactivos. *Rev. Int. Contam.Ambient.*, 26(1), 65-84.
- Julkowska, D., Obuchowski, M., Holland, I. B., & Seror, S. J. (2005). Comparative analysis of the development of swarming communities of *Bacillus subtilis* 168 and a natural wild type: critical effects of surfactin and the composition of the medium. *J. Bacteriol*, 187, 65-76.
- Julkowska, D., Obuchowski, M., Holland, I. B., & Seror, S. J. (2005). Comparative analysis of the development of swarming communities of *Bacillus subtilis* 168 and a natural wild type: critical effects of surfactin and the composition of the medium. *J. Bacteriol*, 187, 65-76.

Kearns, D. V., & Losick, R. (2003). Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol*, 49, 581-590.

Kenny, M. K., Galea, V. J., & Price, T. V. (2012). Germination and growth of *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from coffee in Papua New Guinea and their pathogenicity to coffee berries. *Australasian Plant Pathology*, 41(5), 519–528. <https://doi.org/10.1007/s13313-012-0117-7>

Klar, T. A., Jakobs, S., Dyba, M., Egnér, A., & Hell, S. W. (2007). Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(15), 8206-8210.

Koglin, A., & Walsh, C. T. (2009). Structural insights into nonribosomal peptide enzymatic assembly lines. *Nat. Prod. Rep*, 26, 987-1000.

Kuhn, D. M., Balkis, M., Chandra, J., Mukherjee, P. K., & Ghannoum, M. A. (2003). Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1), 506-508.

Leclère, V. (2006). The lipopeptides mycosubtilin and surfactin enhance spreading of *Bacillus subtilis* by their surface-active properties. *Arch. Microbiol*, 186, 475-483.

Leclere, V., Marti, R., Bechet, M., Fickers, P., & Jacques, P. (2006). The lipopeptides mycosubtilin and surfactin enhance spreading of *Bacillus subtilis* strains by their surface-active properties. *Arch. Microbiol*, 186, 475-483.

Levitz, S. M., & Diamond, R. D. (1985). A Rapid Colorimetric Assay of Fungal Viability with the Tetrazolium Salt MTT. *The Journal of Infectious Diseases*, 152(5), 938-945.

López Jácome, L. E., Hernández-Durán, M., Colín Castro, C. A., Ortega Peña, S., Cerón González, G., & Franco Cendejas, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en Discapacidad*, 3(1), 10-18.

Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63(1), 541–556. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>

Luna Bulbarela, A. (2015). Evaluación del papel de los antibióticos lipopeptídicos producidos por *Bacillus* sp. 83 en la inhibición del crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* 09. Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.

M Mari, F Neri and P Bertolini (2007) “Novel approaches to prevent and control postharvest diseases of fruits”, *Stewart Postharvest Review*, 3(6), pp. 1–7. doi: 10.2212/spr.2007.6.4.

Maget-Dana, R., & Peypoux, F. (1994). Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. *Toxicology*, 87(1–3), 151–174.

Maget-Dana, R., & Ptak, M. (1990). Iturin lipopeptides: interactions of mycosubtilin with lipids in planar membranes and mixed monolayers. *BBA - Biomembranes*, 1023(1), 34–40.

Makovitzki, A., Avrahami, D., & Shai, Y. (2006). Ultrashort antibacterial and antifungal lipopeptides. *Proceedings of the national Academy of Sciences*, 103(43), 15997-16002.

Martinez Salazar, M. (2009). Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular in vitro y su importancia en biotecnología de la salud. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(2), 152-166.

Milner, J., Lethbridge, R., BJ, & HJ. (1995). Culture conditions that influence accumulation of zwittermicin A by *Bacillus cereus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 43, 685-691.

Molecular Probes. (2003). SYTO® Green-Fluorescent Nucleic Acid Stains. Product Information, 1-3.

Molecular Probes. (2005). LIVE/DEAD® FungaLight™ Yeast Viability Kit. Product Information, 1-4.

Monteiro, M.-d.-C., Martinez, M., & O'connor, J. E. (2002). La citometría de flujo en el análisis de plaquetas. II Aplicaciones clínicas. *Revista de Diagnóstico Biológico*, 51(3), 87-99.

Nagórska, K., Bikowski, M., & Obuchowski, M. (2007). Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. *Acta Biochimica Polonica*, 54(3), 495–508. <https://doi.org/20071510> [pii]

Nail-Nasir, M., & Besson, F. (2012). Interactions of the antifungal mycosubtilin with ergosterol-containing interfacial monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 5, 1302-1308.

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.

Nazari, M., Kurdi, M., & Heerklotz, H. (2012). Classifying surfactants with respect to their effect on lipid membrane order. *Biophysical Journal*, 102(3), 498-506.

Nishikiori, T., Naganawa, H., Muraoka, Y., Aoyagi, T., & Umezawa, H. (1986). Plipastatins: new inhibitors of phospholipase A2, produced by *Bacillus cereus* BMG302-fF67. III. Structural elucidation of plipastatins. *J. Antibiot*, 39, 755-761.

Nugent, K. M., & Couchot, K. R. (1986). Effects of Sublethal Concentrations of Amphotericin B on *Candida albicans*. *The journal of infectious diseases*, 154(4), 665-669.

Olivera, S. S., Seldin, L., & Bastes, M. C. (1993). Identification of structural nitrogen fixation (*nif*) genes in *Bacillus polymyxa* and *Bacillus macerans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9(3), 387-389.

Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., ... Thonart, P. (2007). Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*, 9(4), 1084–1090.

Ongena, M., & Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol|. *Trends Microbiol*, 16, 115-125.

Perfect, S. E., Hughes, H. B., O'Connell, R. J., & Green, J. R. (1999). *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. *Fungal Genetics and Biology*. <https://doi.org/10.1006/fgbi.1999.1143>

Raaijmakers, J. M., de Bruijn, I., Nybroe, O., & Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*; more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiol. Rev*, 34, 1037-1062.

Riccardi, C., & Nicoletti, I. (2006). Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature Protocol*, 1(3), 1458-1461.

Rivardo, F., Turner, R. J., Allegrone, G., Ceri, H., & Martinotti, M. G. (2009). Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 83, 541-553.

Roongsawang, N., Thaniyavarn, J., Thaniyavarn, S., Kameyama, T., Haruki, M., Imanaka, T., . . . Kanaya, S. (2002). Isolation and characterization of a halotolerant *Bacillus subtilis* BBK-1 which produces three kinds of lipopeptides: bacillomycin L, plipastatin, and surfactin. *Extremophiles*, 2002, 499-506.

Serrano Carreón, L., & Galindo Fentanes, E. (2007). Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. *Comunicaciones libres*, 77-88.

Shankar-Singh, J., Chandra-Pandey, V., & Singh, D. P. (2011). Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 140(3-4), 339-353.

Silo-Suh, L., Lethbridge, B., Raffel, S., He, H., Clardy, J., & Handelsman, J. (1994). Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 6(6), 2023-2030

Thaniyavarn, J., Roongsawang, N., Kameyama, T., Haruki, M., Imanaka, T., Morikawa, M., & Kanaya, S. (2003). Production and characterization of biosurfactants from *Bacillus licheniformis* F2.2. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 67, 1239-1244.

Vanittanakom, N., Loeffler, W., Koch, U., & Jung, G. (1986). Fengycin-a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. (39, Ed.) *J. Antibiot*, 888-901.

Vlamakis, H., Chai, Y., Beaugregard, P., Losick, R., & Kolter, R. (2013). Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nat Rev Microbiol*, 11(3), 157–168. <https://doi.org/10.1007/s10955-011-0269-9>. Quantifying

Volpon, L., Tsan, P., Majer, Z., Vass, E., Hollósi, M., Noguéra, V., . . . Besson, F. (2007). NMR structure determination of a synthetic analogue of bacillomycin Lc reveals the strategic role of L-Asn1 in the natural iturinic antibiotics. *Spectrochimica Acta*, 67(5), 1374-1380.

Volpon, L., Besson, F., & Lancelin, J. M. (2000). NMR structure of antibiotics plipastatins A and B from *Bacillus subtilis* inhibitors of phospholipase A(2). *FEBS Lett*, 485, 76-80.

Weir, B. S., Johnston, P. R., & Damm, U. (2012). The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology*, 73(1), 115–180.

Wilson, C., & Wisniewski, M. (1989). Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables: An Emerging Technology. *Annual Review of Phitopathology*, 27, 425-441.

Wisniewski, M. E. y Wilson, C. L. (1992) “Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: recent advances”, *HortScience*, 27(2), pp. 94–98.

Zhang, B., Dong, C., Shang, Q., Han, Y., & Li, P. (2013). New insights into membrane-active action in plasma membrane of fungal hyphae by the lipopeptide antibiotic bacillomycin L. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1828, 2230-2237.