

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



***CARACTERIZACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS SILVESTRES CON  
ACTIVIDAD FUNGICIDA COMO POTENCIALES AGENTES PARA EL  
CONTROL BIOLÓGICO DEL HONGO FITOPATÓGENO BOTRYTIS  
CINEREA***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en  
Bioquímica área de Especialización en Bioquímica ambiental y Memoria para  
optar al Título de Bioquímico por:**

***CARLA MADELYN MUÑOZ VÁSQUEZ***

**Director de Tesis: Dr. Antonio Castillo Nara**

**SANTIAGO – CHILE**

**MARZO 2015**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por la candidata

**CARLA MADELYN MUÑOZ VÁSQUEZ**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Bioquímica Ambiental y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día

---

**Director de Tesis:**

**Dr. Antonio Castillo Nara** \_\_\_\_\_

**Co-director de Tesis:**

**Dr. Mario Chiong Lay** \_\_\_\_\_

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dr. Davor Cotorás Tadic** \_\_\_\_\_

**Dr. Sergio Álvarez Armijo** \_\_\_\_\_

**Dr. Ruben Polanco Opazo** \_\_\_\_\_

## **Dedicatoria**

Primero que nada agradezco a las personas más importantes en mi vida, mi madre y tío que sin su cariño, consejos y amparo jamás hubiese alcanzado este logro. También agradezco a mi pequeña familia Ximena, Peyuco y Constanza. Me siento muy afortunada y agradecida de tener esta familia que jamás me ha abandonado en los momentos difíciles. Infinitas gracias por todo el amor que me han dado.

A mis tutores de tesis Antonio Castillo y Mario Chiong por ser mis guías y orientadores durante este proceso. También al profesor Alejandro Urzúa por su orientación en el área química de esta tesis.

A Luis cottet, Loreto Villegas y Rocio Santander por su admirable paciencia y consideración. Por responder todas mis preguntas con amabilidad y por todo su apoyo.

A mis compañeros de laboratorio, Carol, Gabo, Juan, Roberto, Carlos y Esteban por hacer mi estadía en el laboratorio muy divertida y alegre.

A mis amigas que han estado toda la vida conmigo, Pilar, Melissa, Massiel y Gabriela. A los amigos que he tenido la suerte de conocer durante este extenso proceso universitario, Presi, Javier, Claudia, Fabiola, Rocio y Paulina. También a Milena, Katherine y Micaela que me dieron ánimo y comprensión durante este último tiempo, donde más lo necesite.

Por ultimo agradezco a todas las demás personas que me han ayudado durante la realización de esta tesis y por su comprensión.

## **Lugar de realización**

Laboratorio de Virología de Hongos

Departamento de Biología

Facultad de Química y Biología

Universidad de Santiago de Chile

## **Financiamiento**

Proyecto DGT-2014AC

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL .....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ABREVIATURAS.....	xi
RESUMEN.....	xiii
SUMMARY .....	xiv
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Importancia económica de la vid.....	1
1.2 <i>Botrytis cinerea</i> .....	1
1.2.1 Morfología .....	1
1.2.2 Ciclo de vida .....	2
1.2.3 Proceso de infección.....	2
1.3 Control fitosanitario .....	3
1.3.1 Control químico .....	3
1.3.2 Control biológico.....	4
1.4 Bacterias del género <i>Bacillus</i> como biocontroladores .....	5
1.4.1 Lipopéptidos antifúngicos.....	6
1.4.2 Moléculas antifúngicas: metabolitos secundarios y enzimas .....	8
1.4.3 Biocontrolador Serenade .....	8
1.5 Búsqueda de microorganismos con actividad fungicida contra <i>Botrytis cinerea</i> .....	8
2. HIPÓTESIS .....	10
3. OBJETIVOS.....	10
3.1 OBJETIVO GENERAL .....	10
3.1 OBJETIVO ESPECÍFICOS .....	10
4. METODOLOGÍA .....	11

4.1 Cepas fúngicas.....	11
4.2 Cepas bacterianas .....	11
4.3 Extracción del DNA genómico y PCR .....	12
4.4 Secuenciación y análisis filogenéticos .....	12
4.5 Ensayos bioquímicos.....	13
4.6 Microscopia electrónica de transmisión (TEM).....	14
4.7 Métodos de evaluación de actividad antagónica contra <i>B. cinerea</i> .....	15
4.7.1 Bioensayos <i>in vitro</i> .....	15
4.7.2 Bioensayos <i>in vivo</i> .....	16
4.8 Extracción de compuestos antifúngicos con solventes orgánicos .....	16
4.8.1 Extracción clorofórmica.....	16
4.8.2 Extracción con acetato de etilo .....	17
4.9 Cromatografía de alta eficiencia de fase reversa (HPLC) .....	17
4.10 Test agar CTAB-azul de metileno .....	17
4.11 Test de “drop collapsing” .....	18
4.12 Test agar-quitina.....	18
4.13 Test agar laminarina .....	18
4.14 Cromatografía en capa fina (TLC) .....	19
4.15 Espectroscopía infrarroja (IR) .....	19
4.16 HPLC asociado a espectrometría de masas (LC-MS/MS).....	19
4.16.1 Monitorización de todos los iones (full scan).....	20
4.16.2 Monitorización selectiva de iones (SIM).....	20
4.17 GC asociada a espectrometría de masas (GC-MS).....	21
5. RESULTADOS .....	22
5.1 Caracterización de las cepas bacterianas silvestres con propiedades antifúngicas contra <i>Botrytis cinerea</i> . .....	22
5.1.1 Caracterización filogenética .....	22
5.1.2 Caracterización bioquímica .....	28
5.1.3 Caracterización Morfológica de las colonias.....	29
5.1.4 Microscopía electrónica.....	30

<b>5.2 Evaluación de la capacidad antifúngica de las cepas bacterianas mediante ensayos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>.....</b>	<b>31</b>
<b>5.2.1 Bioensayos de enfrentamiento <i>in vitro</i> .....</b>	<b>31</b>
5.2.1.1 Variación de la fuente de carbono.....	31
5.2.1.2 Variación del pH.....	33
5.2.1.3 Variación de Temperatura.....	35
<b>5.2.2 Bioensayos <i>in vivo</i> .....</b>	<b>39</b>
5.2.2.1 Bioensayos en tejido vegetal.....	39
5.2.2.2 Bioensayos en bayas de uva de mesa.....	40
<b>5.2.3 Actividad antifúngica de las bacterias frente a distintas cepas de <i>B. cinerea</i> .....</b>	<b>42</b>
<b>5.3 Identificación de compuestos químicos con capacidad antifúngica secretados por las cepas bacterianas <i>B. subtilis</i> NB y <i>B. pumilus</i> G2.....</b>	<b>43</b>
<b>5.3.1 Extracción de compuestos antifúngicos.....</b>	<b>43</b>
<b>5.3.2 Identificación preliminar de los compuestos obtenidos por extracción orgánica.....</b>	<b>45</b>
5.3.2.1 Test agar CTAB-azul de metileno .....	45
5.3.2.2 Test “drop collapsing” .....	46
5.3.2.3 Test agar-quitina .....	46
5.3.2.4 Test agar laminarina.....	47
5.3.2.5 Cromatografía líquida de fase reversa (HPLC) .....	48
5.3.2.6 Cromatografía en capa fina (TLC).....	49
5.3.2.7 Espectroscopía infrarroja (IR).....	52
<b>5.4 Determinación de la estructura química de moléculas extracelulares con capacidad antifúngica secretadas por las cepas bacterianas.....</b>	<b>55</b>
<b>5.4.1 LC-MS/MS modo fullscan .....</b>	<b>55</b>
5.4.1.1 LC-MS/MS modo fullscan para la identificación de lipopéptidos presentes en el extracto de <i>B. subtilis</i> NB.....	55
5.4.1.2 LC-MS/MS modo fullscan para la identificación de iturinas presentes en el extracto de <i>B. subtilis</i> NB.....	57
5.4.1.3 LC-MS/MS modo fullscan para la identificación de surfactinas presentes en el extracto de <i>B. subtilis</i> NB.....	58

5.4.1.4 LC-MS/MS modo fullscan para la identificación de lipopéptidos presentes en el extracto de <i>B. pumilus</i> G2.....	59
5.4.2 LC-MS/MS modo SIM .....	60
5.4.2.1 LC-MS/MS modo SIM para el análisis estructural de los lipopéptidos presentes en el extracto de <i>B. subtilis</i> NB.....	60
5.4.2.1.1 Fengicinas.....	61
5.4.2.1.2 Surfactinas .....	65
5.4.2.1.3 Iturinas .....	70
5.4.2.2 LC-MS/MS modo SIM para el análisis estructural de los lipopéptidos presentes en el extracto de <i>B. pumilus</i> G2.....	73
5.4.3 Cromatografía de gases asociada a espectrometría de masas (GC-MS) para <i>B. subtilis</i> NB y <i>B. pumilus</i> G2 .....	77
6. DISCUSIÓN .....	81
7. CONCLUSIONES.....	88
8. BIBLIOGRAFÍA.....	89



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Familia de lipopéptidos cíclicos.....	7
Figura 2. Bioensayos de enfrentamiento entre <i>B. cinerea</i> 149 y distintas cepas bacterianas silvestres.....	9
Figura 3. <i>Primers</i> utilizados en la amplificación y secuenciación del gen del rDNA 16S.....	13
Figura 4. Condiciones de temperatura y tiempo utilizados en GC-MS.....	21
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) de los fragmentos de DNA obtenidos por PCR.....	22
Figura 6. Árbol filogenético de las cepas bacterianas silvestres.....	23
Figura 7. Representación filogenética de las secuencias del clade A <sub>1</sub> comparadas con las secuencias de la base de datos GenBank.....	24
Figura 8. Representación filogenética de las secuencias del clade A <sub>2</sub> comparadas con las secuencias de la base de datos GenBank.....	25
Figura 9. Representación filogenética de las secuencias del clade B comparadas con las secuencias de la base de datos GenBank.....	25
Figura 10. Bioensayos de enfrentamiento entre <i>B. cinerea</i> 149 y cepas bacterianas del clade A <sub>1</sub> .....	26
Figura 11. Bioensayos de enfrentamiento entre <i>B. cinerea</i> 149 y las cepas del clade A <sub>2</sub> .....	27
Figura 12. Bioensayos de enfrentamiento entre <i>B. cinerea</i> 149 y las cepas bacterianas del clade B.....	27
Figura 13. Visualización al microscopio óptico de las cepas bacterianas.....	29
Figura 14. Visualización macroscópica de las colonias bacterianas.....	29
Figura 15. Microfotografías electrónicas de <i>B. subtilis</i> NB.....	30
Figura 16. Microfotografías electrónicas de <i>B. pumilus</i> G2.....	30
Figura 17. Influencia de la fuente de carbono sobre la inhibición del crecimiento de <i>B. cinerea</i> 149 enfrentado a distintas cepas bacterianas.....	32
Figura 18. Influencia de la variación de la fuente de carbono sobre el crecimiento bacteriano.....	33
Figura 19. Influencia del pH sobre la inhibición del crecimiento de <i>B. cinerea</i> 149 enfrentado a distintas cepas bacterianas.....	34
Figura 20. Influencia del pH sobre el crecimiento bacteriano.....	35

<b>Figura 21. Bioensayos de enfrentamiento entre <i>B. cinerea</i> 149 y las cepas bacterianas, realizados a distintas temperaturas.</b> .....	36
<b>Figura 22. Influencia de la temperatura en la inhibición del crecimiento de <i>B. cinerea</i> 149 enfrentada a distintas cepas bacterianas.</b> .....	37
<b>Figura 23. Influencia de la temperatura en el crecimiento de las cepas bacterianas</b> .....	38
<b>Figura 24. Bioensayos de protección <i>in vivo</i> del ataque de <i>B. cinerea</i> 149 sobre hojas de plantas de poroto</b> .....	39
<b>Figura 25. Bioensayos de protección <i>in vivo</i> al ataque de <i>B. cinerea</i> 149 sobre racimos de la variedad Thompson seedless utilizando <i>B. pumilus</i> G2.</b> .....	41
<b>Figura 26. Bioensayos de protección <i>in vivo</i> al ataque de <i>B. cinerea</i> 149 sobre racimos de la variedad Thompson seedless utilizando <i>B. subtilis</i> NB.</b> .....	42
<b>Figura 27. Efecto de la acción inhibitoria de los biocontroladores sobre distintas cepas de <i>B. cinerea</i> 149</b> .....	43
<b>Figura 28. Ensayos de actividad antifúngica de moléculas extracelulares de <i>B. pumilus</i> G2 contra <i>B. cinerea</i> 149</b> .....	44
<b>Figura 29. Ensayos de actividad antifúngica de moléculas extracelulares de <i>B. subtilis</i> NB contra <i>B. cinerea</i> 149</b> .....	44
<b>Figura 30. Ensayos en agar CTAB para detectar la presencia de biosurfactantes</b> .....	45
<b>Figura 31. Test “drop collapsing” realizado con los sobrenadantes de cultivos bacterianos.</b> .....	46
<b>Figura 32. Test agar quitina con las cepas bacterianas.</b> .....	47
<b>Figura 33. Test de agar laminarina con las cepas bacterianas.</b> .....	47
<b>Figura 34. Cromatograma obtenido mediante HPLC del extracto metanólico de <i>B. subtilis</i> NB</b> .....	48
<b>Figura 35. Cromatograma obtenido mediante HPLC del extracto metanólico de <i>B. pumilus</i> G2</b> .....	49
<b>Figura 36. TLC para los extractos metanólicos obtenidos desde cultivos de <i>B. pumilus</i> G2 y <i>B. subtilis</i> NB.</b> .....	49
<b>Figura 37. TLC para identificar lipopéptidos presentes en los extractos metanólicos de las cepas bacterianas</b> .....	51
<b>Figura 38. Espectro infrarrojo de los extractos orgánicos obtenidos de las cepas bacterianas</b> .....	53
<b>Figura 39. LC-MS/MS del extracto crudo disuelto en metanol de <i>B. subtilis</i> HC8</b> .....	55
<b>Figura 40. Cromatograma obtenido mediante LC-MS/MS para el análisis del extracto metanólico de <i>B. subtilis</i> NB.</b> .....	56

<b>Figura 41. Cromatograma obtenido mediante LC-MS/MS modo fullscan para identificar los lipopéptidos presentes en el extracto de <i>B. subtilis</i> NB utilizando el programa de elución para la familia de las iturinas.....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 42. Cromatograma obtenido mediante LC-MS/MS modo fullscan para identificar los lipopéptidos presentes en el extracto de <i>B. subtilis</i> NB utilizando el programa de elución para la familia de las surfactinas .....</b>	<b>58</b>
<b>Figura 43. Cromatograma obtenido mediante LC-MS/MS modo fullscan del extracto metanólico de <i>B. pumilus</i> G2.....</b>	<b>59</b>
<b>Figura 44. Representación esquemática de la fragmentación de péptidos .....</b>	<b>60</b>
<b>Figura 45. Estructura péptidica de la familia de las fengicinas.....</b>	<b>61</b>
<b>Figura 46. LC-MS/MS modo SIM del ión con m/z de 1492, del extracto de <i>B. subtilis</i> NB.....</b>	<b>62</b>
<b>Figura 47. LC-MS/MS modo SIM del ión con m/z de 1505,9 del extracto de <i>B. subtilis</i> NB .....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 48. LC-MS/MS modo SIM del ión con m/z de 1478, del extracto de <i>B. subtilis</i> NB .....</b>	<b>64</b>
<b>Figura 49. LC-MS/MS modo SIM del ión con m/z de 1464, del extracto de <i>B. subtilis</i> .....</b>	<b>65</b>
<b>Figura 50. Estructura péptidica de la familia de las surfactinas .....</b>	<b>65</b>
<b>Figura 51. LC-MS/MS modo SIM del ión con m/z de 1043, del extracto de <i>B. subtilis</i> NB.....</b>	<b>67</b>
<b>Figura 52. LC-MS/MS modo SIM del ión con m/z de 994,86 del extracto de <i>B. subtilis</i> NB .....</b>	<b>68</b>
<b>Figura 53. LC-MS/MS modo SIM del ión con m/z de 1037, del extracto de <i>B. subtilis</i> NB .....</b>	<b>69</b>
<b>Figura 54. Estructura péptidica de la familia de las iturinas.....</b>	<b>70</b>
<b>Figura 55. LC-MS/MS modo SIM del ión con m/z de 1079, del extracto de <i>B. subtilis</i> NB .....</b>	<b>71</b>
<b>Figura 56. LC-MS/MS modo SIM del ión con m/z de 1094, del extracto de <i>B. subtilis</i> NB.....</b>	<b>72</b>
<b>Figura 57. LC-MS/MS modo SIM del ión con m/z de 1056,6 del extracto de <i>B. subtilis</i> NB .....</b>	<b>73</b>
<b>Figura 58. LC-MS/MS modo SIM del ión con m/z de 1083,6 del extracto de <i>B. pumilus</i> G2 .....</b>	<b>74</b>
<b>Figura 59. LC-MS/MS modo SIM del ión con m/z de 1017, del extracto de <i>B. pumilus</i> G2 .....</b>	<b>75</b>
<b>Figura 60. Cromatograma (GC-MS) del extracto obtenido a partir del cultivo de <i>B. pumilus</i> G2.....</b>	<b>77</b>
<b>Figura 61. Cromatograma (GC-MS) del extracto obtenido a partir del cultivo de <i>B. subtilis</i> NB .....</b>	<b>78</b>
<b>Figura 62. Espectro obtenido de la fragmentación de la molécula pyrrolo [1,2-a]pyrazine 1,4-dione,hexahydro 3-(phenylmethyl).....</b>	<b>79</b>

<b>Figura 63. Representación esquemática de los fragmentos obtenidos para la molécula pyrrolo [1,2-a]pyrazine 1,4-dione,hexahydro 3-(phenylmethyl).....</b>	<b>79</b>
<b>Figura 64. Espectro obtenido de la fragmentación de la molécula pyrrolo [1,2-a]pyrazine 1,4 dione,hexahydro 3(2 methylpropyl) .....</b>	<b>80</b>
<b>Figura 65. Representación esquemática de la molécula pyrrolo [1,2-a]pyrazine 1,4 dione,hexahydro 3(2 methylpropyl) .....</b>	<b>80</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas de <i>Botrytis cinerea</i> .....	11
Tabla 2. Cepas silvestres aisladas desde un huerto orgánico .....	11
Tabla 3. <i>Primers</i> universales para eubacterias .....	12
Tabla 4. Parámetros utilizados para PCR .....	12
Tabla 5. <i>Primers</i> utilizados en la secuenciación de los amplicones .....	12
Tabla 6. Parámetros utilizados para LC-MS/MS .....	20
Tabla 7. Programa de elución utilizado en LC-MS/MS para la identificación de lipopéptidos. ....	20
Tabla 8. Programas de elución utilizados en los análisis de LC-MS/MS específico para cada familia de lipopéptidos .....	21
Tabla 9. Parámetros utilizados en los análisis de GC-MS .....	21
Tabla 10. Resultados de los ensayos bioquímicos de identidad .....	28
Tabla 11. Rf de extractos metanólicos de <i>B. subtilis</i> NB y <i>B. pumilus</i> G2 .....	51
Tabla 12. Asignación de los grupos funcionales a las bandas principales de los espectros IR de los extractos de <i>B. subtilis</i> NB y <i>B. pumilus</i> G2 .....	54
Tabla 13. Lipopéptidos identificados en el extracto metanólico de <i>B. subtilis</i> NB mediante el análisis de los espectros de masa adquiridos por LC-MS/MS modo fullscan. ....	56
Tabla 14. Lipopéptidos identificados en el extracto de <i>B. subtilis</i> NB mediante el análisis de los espectros de masas adquiridos por LC-MS/MS (fullscan) utilizando el programa de elución para la familia de las iturinas. ....	57
Tabla 15. Lipopéptidos identificados en el extracto metanólico de <i>B. subtilis</i> NB mediante el análisis de los espectros de masas adquiridos por LC-MS/MS (fullscan) utilizando el programa de elución para la familia de las surfactinas. ....	58
Tabla 16. Lipopéptidos identificados en el extracto metanólico de <i>B. pumilus</i> G2 mediante el análisis de los espectros de masa adquiridos por LC-MS/MS modo fullscan. ....	60
Tabla 17. Fragmentos del ión con m/z de 1492, identificados mediante LC MS/MS modo SIM del extracto metanólico de <i>B. subtilis</i> NB .....	62
Tabla 18. Fragmentos del ión con m/z de 1505,9 identificados mediante LC-MS/MS modo SIM del extracto metanólico de <i>B. subtilis</i> NB .....	63

<b>Tabla 19. Fragmentos del ión con m/z de 1478, identificados mediante LC-MS/MS modo SIM del extracto metanólico de <i>B. subtilis</i> NB.....</b>	<b>64</b>
<b>Tabla 20. Fragmentos del ión con m/z de 1043, identificados mediante LC-MS/MS modo SIM del extracto de <i>B. subtilis</i> NB.....</b>	<b>67</b>
<b>Tabla 21. Fragmentos del ión con m/z de 994,86 identificados mediante LC-MS/MS modo SIM del extracto de <i>B. subtilis</i> NB.....</b>	<b>68</b>
<b>Tabla 22. Fragmentos del ión con m/z de 1037, identificados mediante LC-MS/MS modo SIM del extracto de <i>B. subtilis</i> NB.....</b>	<b>69</b>
<b>Tabla 23. Fragmentos del ión con m/z de 1079, identificados mediante LC-MS/MS modo SIM del extracto de <i>B. subtilis</i> NB.....</b>	<b>71</b>
<b>Tabla 24. Fragmentos del ión con m/z de 1094, identificados mediante LC-MS/MS modo SIM del extracto de <i>B. subtilis</i> NB.....</b>	<b>72</b>
<b>Tabla 25. Fragmentos del ión con m/z de 1083,6 identificados mediante LC-MS/MS modo SIM del extracto de <i>B. pumilus</i> G2. ....</b>	<b>74</b>
<b>Tabla 26. Resumen de los lipopéptidos encontrados en los extractos de <i>B. subtilis</i> NB y <i>B. pumilus</i> G2.....</b>	<b>76</b>
<b>Tabla 27. TR de las señales cromatográficas obtenidas a partir del extracto obtenido de cultivos de <i>B. pumilus</i> G2. ....</b>	<b>78</b>
<b>Tabla 28. TR de las señales cromatográficas obtenidas a partir del extracto de <i>B. subtilis</i> NB....</b>	<b>78</b>

## ABREVIATURAS

ANOVA: *Analysis Of Variance.*

BCA: *Agentes de Control Biológico.*

BLASTn: *Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide.*

°C: Grados Celsius.

CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio.

DMI: inhibidor de la desmetilación.

GC: *Gas Chromatography.*

GC-MS: *Gas Chromatography - Mass Spectrometry.*

Glu-Fib: glutamina-fibrinopéptido B.

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography.*

HR: Respuesta de Hipersensibilidad.

IR: *Infrared spectroscopy.*

IE: *Ionización Electrónica.*

ISR: *Resistencia Sistémica Inducida.*

FAO: *Food and Agriculture Organization.*

LC-MS/MS: *Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry.*

LB: Luria Broth.

MTA: *Malt Extract Tryptone Agar.*

MEGA: *Molecular Evolutionary Genetics Analysis.*

MS: *Mass Spectrometry.*

NIST: *National Institute of Standards and Technology.*

Orn: Ornitina.

PCR: *P*olymerase *C*hain *R*eaction.

PDA: agar papa dextrosa.

PR: Proteínas relacionadas con la patogénesis.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

Rf: *R*etention *F*actor.

rRNA: Ácido ribonucleico ribosomal.

RT: *R*etention *T*ime.

SOD: Superóxido dismutasa.

SAR: *R*esistencia *S*istémica *A*dquirida.

SDS: Dodecilsulfato sódico.

SIM: *S*elective *I*on *M*onitoring.

TEM: *M*icroscopia *E*lectrónica de *T*ransmisión.

TLC: *T*hin-*L*ayer *C*hromatography.

U.C.F: Unidades formadores de colonias.



## RESUMEN

El mercado de la uva de mesa en Chile es una importante fuente de ingreso económico, siendo nuestro país catalogado como líder exportador de esta fruta. Sin embargo, el principal problema de índole fitopatológico que afecta la uva de mesa son las infecciones producidas por el hongo *Botrytis cinerea*, que se caracterizan por generar pudriciones o atizonamientos de las partes florales, brotes y bayas, causando importantes pérdidas económicas. Su control incluye un manejo integrado del cultivo, además de un tratamiento químico preventivo mediante el uso de fungicidas. No obstante, aunque se realicen todas estas prácticas el control total no resulta satisfactorio, debido al aumento de cepas fúngicas resistentes a la acción de los fungicidas. Frente a esta problemática, se han estudiado otras formas de control dentro de las que se incluye la utilización de microorganismos capaces de impedir la infección de *B. cinerea* sobre cultivos susceptibles, entre los cuales podemos destacar el biocontrolador comercial Serenade, que posee como ingrediente activo la cepa bacteriana *Bacillus subtilis* QST 713.

El objetivo principal de esta tesis fue **caracterizar cepas bacterianas silvestres con actividad antifúngica y determinar la capacidad protectora de las bacterias contra el ataque del hongo sobre el vegetal**. Se seleccionaron cepas bacterianas silvestres que al ser caracterizadas a nivel filogenético, bioquímico y ultraestructural, fueron clasificadas en el género *Bacillus* y en las especies *B. subtilis* y *B. pumilus*. Luego de evaluar su capacidad antifúngica mediante bioensayos *in vitro* e *in vivo*, se seleccionaron las cepas *B. subtilis* NB y *B. pumilus* G2, las que fueron capaces de proteger al tejido vegetal de forma más eficiente que el producto comercial Serenade. Posteriormente, se realizó extracción orgánica de las moléculas secretadas por estas bacterias, determinándose preliminarmente su naturaleza y estructura química, utilizando las técnicas TLC, IR, HPLC, LC-MS/MS y GC-MS. Finalmente, con el uso de estas metodologías se pudo demostrar que *B. subtilis* NB y *B. pumilus* G2 secretan enzimas que degradan la pared celular fúngica, dipéptidos cíclicos ciclo-(Pro-Leu) y ciclo-(Pro-Phe) y lipopéptidos cíclicos (iturinas, fengicinas y surfactinas).

Estas bacterias poseen un gran potencial para controlar infecciones producidas por *B. cinerea* en las variedades de uva de mesa afectadas por este hongo. Sin embargo, se requieren estudios posteriores que permitan confirmar y ampliar los resultados de esta tesis, antes que se pueda desarrollar un producto comercial.

## SUMMARY

Chile is a leading exporter of table grapes, and this market is an important source of income for the country. However, infection with the fungus *Botrytis cinerea*, characterized by the rotting of grape flowers, buds, and berries, causes important economic losses. Fungus control includes integrated crop management and preventive chemical fungicide treatments. Despite these practices, overall control is unsatisfactory as fungal strains become increasingly resistant to fungicides. Alternative control methods have been studied, including the use of microorganisms capable of preventing *B. cinerea* infection on susceptible cultivars. Among these is the commercial biocontrol Serenade, which contains the *Bacillus subtilis* QST 713 bacterial strain as the main active ingredient.

The main objectives of this thesis were **to characterize wild bacterial strains with antifungal activity and determine the protective ability of these strains for table grape vines challenged by *B. cinerea***. Wild bacterial strains were characterized at the phylogenetic, biochemical, and ultrastructural levels and classified in the genus *Bacillus* and species *B. subtilis* and *B. pumilus*. After evaluating antifungal capacities through *in vitro* and *in vivo* bioassays, the *B. subtilis* NB and *B. pumilus* G2 strains were selected. These strains were able to more efficiently protect plant tissue than the commercial product Serenade. Subsequently, the molecules secreted by these bacteria were organically extracted, and their chemical structures and natures were determined using the techniques TLC, IR, HPLC, LC-MS/MS, and GC-MS. These methodologies revealed that *B. subtilis* NB and *B. pumilus* G2 secreted enzymes that degraded the fungal cell wall, the cyclic dipeptides cyclo-(Pro-Leu) and cyclo-(Pro-Phe), and cyclic lipopeptides (iturins, fengycins, and surfactins).

These bacteria show promising potential in controlling *B. cinerea* infections among affected Chilean table grape species. However, further studies are required to expand upon the present results before a product can be developed for commercial use.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Importancia económica de la vid

La uva de mesa (*Vitis vinifera*) es una planta originaria de Asia y se caracteriza por poseer un tronco retorcido, hojas alternas, pecioladas y partidas en cinco lóbulos puntiagudos. La vid es una de las especies vegetales más cultivadas a nivel mundial, principalmente en regiones donde predominan climas templados (Staats *et al*, 2005).

Según datos entregados por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, de sus siglas en inglés Food and Agriculture Organization), al año 2011 Chile era el séptimo productor mundial de uva de mesa. Sin embargo, en ese mismo período era el principal exportador de este producto con 853.000 toneladas anuales, con una valorización de US\$ 1.500 millones. Según datos de la misma organización, la superficie plantada con parronales para uva asciende a 202.000 hectáreas de cultivos. Además, Chile es el segundo productor de uva a nivel nacional después del trigo (Bravo, 2013).

Sin embargo, la vid se puede ver amenazada por diversos factores abióticos y bióticos, destacando en estos últimos los patógenos fúngicos principalmente *Botrytis cinerea*, siendo el que produce las mayores pérdidas al afectar la fruta en cualquier fase de su desarrollo, incluso durante los períodos de transporte en postcosecha, causando gran impacto económico a nivel mundial (Latorre *et al*, 2001)

## 1.2 *Botrytis cinerea*

### 1.2.1 Morfología

*B. cinerea* es un hongo patógeno cosmopolita, ubicuo y polífago que es capaz de infectar a un amplio espectro de hospedadores, contabilizando a la fecha a más de 200 especies susceptibles, entre las cuales se encuentran las hortalizas (tomate, pepino y lechuga), plantas ornamentales (rosa y gerbera) y frutas (uvas, frambuesas y kiwi) (Choquer *et al*, 2007).

Este hongo presenta una fase sexual (teleomorfo) denominada *Botryotinia fuckeliana*, caracterizada por la producción de esporas meióticas y la formación de estructuras reproductivas denominadas apotecios. Además, presenta una fase asexual (anamorfo) denominada *Botrytis cinerea*,

que presentan las siguientes estructuras: hifas vegetativas, esclerocios y conidias. Los daños provocados por *B. cinerea* aparecen en forma de tizones de inflorescencias y pudriciones, tanto del fruto como también del tallo, bulbo y raíces, además produce anegamiento de plántulas y manchas foliares. Cabe destacar que en condiciones de alta humedad, este hongo genera un micelio abundante, de color blanquecino y de aspecto lanoso en el tejido infectado, el cual se vuelve gris durante la esporulación, debido a esto la enfermedad se denomina “pudrición gris” (Have *et al*, 2010).

### **1.2.2 Ciclo de vida**

El ciclo de vida de *B. cinerea* consta de una época invernal, donde es posible encontrar al hongo sobre restos de tejidos vegetales en proceso de descomposición, bajo la corteza o en yemas durmientes, apareciendo en forma de micelio que está constituido por un conjunto de hifas o filamentos septados. También se puede encontrar en forma de esclerocios, que son estructuras de resistencia que se forman por el entrecruzamiento y fusión de hifas lo que produce un tejido compacto cuyo medio intracelular posee una reserva de nutrientes que le permite sobrevivir en condiciones climáticas adversas (Zervoudakis *et al*, 2003). Pasado el invierno, el micelio y los esclerocios infectan nuevo tejido vegetal, produciendo nuevas hifas, las que se especializan en estructuras largas y ramificadas llamadas conidióforos, cuyas células apicales redondeadas producen racimos de conidios ovoides (esporas asexuales), los que son fácilmente liberados hasta llegar a un nuevo hospedador, y bajo condiciones climáticas favorables (clima húmedo y moderadamente frío, 18 a 25 °C), germinan y se desarrollan, comenzando así el proceso de infección (Williamson *et al*, 2007) .

### **1.2.3 Proceso de infección**

Una vez que los conidios entran en contacto con el tejido vegetal comienza la infección por parte del hongo con la penetración de la planta, la que se puede realizar a través de las aberturas naturales (estomas), heridas con células muertas expuestas, que no ponen resistencia a la invasión del patógeno y de manera directa mediante estructuras de penetración especializadas llamadas apresorios, los que corresponden a estructuras hinchadas de hifas y que permiten traspasar las barreras estructurales de la planta (Jurick and Rollins, 2007). Sin embargo, *B. cinerea* también es capaz de secretar enzimas degradativas que facilitan el proceso de penetración, tales como cutinasas y pectinasas (Ponce de León *et al*, 2012). Luego que el hongo ingresa a la célula, se produce la etapa de

destrucción del tejido, donde *B. cinerea* produce fitotoxinas que pueden ser clasificadas en dos grupos: i) sesquiterpeno botridial y compuestos derivados, ii) ácido botcínico y sus derivados (Tani *et al*, 2006). El botridial induce clorosis (insuficiencia clorofílica) y colapso celular (Collemare *et al*, 2008), mientras que el ácido botcínico induce clorosis y necrosis en el tejido (Sakuno *et al*, 2007). Adicionalmente, el hongo libera especies reactivas de oxígeno (ROS), principalmente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado por la enzima superóxido dismutasa (SOD) que produce cambios en el potencial redox de las células infectadas, lo que produce un desequilibrio y posterior daño de diversas estructuras celulares. Una vez establecida la infección, el hongo procede a la formación de conidios y conidióforos sobre la superficie de la planta, lo que genera la coloración característica de la enfermedad (Choquer *et al*, 2007).

Cuando el hongo infecta el tejido vegetal se produce la activación del sistema de defensa temprano de la planta, conocido como respuesta de hipersensibilidad (HR), la que induce la producción de altas concentraciones de ROS, activando mecanismos de defensa que llevan a la necrosis local del tejido. Luego se produce la activación de la resistencia sistémica adquirida (SAR) por parte de la planta, la que viene acompañada por la síntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), la que está constituida por varios tipos de enzimas que reconocen y destruyen a los patógenos (Mohamed *et al*, 2011). Pero dado que *B. cinerea* es necrótrofo, el sistema de defensa vegetal no es eficaz en detener su desarrollo, incluso se ha propuesto que este sistema de defensa por parte de la planta podría ser necesario para una óptima patogenicidad del hongo (Van Kan, 2006).

### **1.3 Control fitosanitario**

#### **1.3.1 Control químico**

Frente a la casi nula capacidad de las plantas para defenderse de *B. cinerea*, es necesaria la utilización de tratamientos externos para proteger los cultivos de interés económico, tales como fungicidas químicos o agentes biológicos para su control. El uso de fungicidas para el control químico del hongo continúa siendo el principal método para reducir la incidencia de infección. Estos están compuestos por moléculas sintéticas que afectan el crecimiento y desarrollo del hongo mediante la inhibición de la germinación de conidias y/o el crecimiento del micelio, de esta forma impidiendo la proliferación de la infección (Tellier *et al*, 2008). Varias familias de botricidas sintéticos están disponibles en el mercado y se pueden clasificar de acuerdo a su modo de acción, en cinco categorías (Leroux, 2007):

- 1.- Fungicidas que afectan la respiración fúngica
- 2.- Fungicidas que inhiben la polimerización de los microtúbulos
- 3.- Fungicidas que afectan la osmoregulación
- 4.- Fungicidas que inhiben la biosíntesis de esteroides
- 5.- Fungicidas cuya actividad es revertida por metionina

Sin embargo, se ha observado una dramática reducción a nivel mundial en la efectividad de estas moléculas, debido a que *B. cinerea* es capaz de generar modificaciones genéticas que le otorgan una menor sensibilidad y una mejor adaptación frente a los compuestos (Kretschmer *et al*, 2009; Walker *et al*, 2013). La situación en Chile no escapa a esta realidad, ya que en investigaciones realizadas durante los años 2007-2009 y 2011 se analizaron 214 aislados de *B. cinerea* provenientes de 36 viñedos de la zona central del país, presentando la mayoría de ellos resistencia a fungicidas inhibidores de la desmetilación (DMIs), anilino pirimidinas, hidroxianilidas y fenilpirroles (Latorre y Torres, 2012).

Sumado a lo anterior, se ha restringido el uso de fungicidas debido a la preocupación que existe por su potencial toxicidad para animales y los efectos que pudieran tener en la salud del ser humano, su acumulación en el medio ambiente y el aumento en la frecuencia de aparición de cepas fúngicas resistentes. Debido a lo anterior, los mercados internacionales están exigiendo mínima o nula cantidad de residuos químicos presentes en los frutos de exportación. Una solución factible para cumplir con estas demandas, es usar biofungicidas para el control de hongos fitopatógenos en general, y específicamente de *B. cinerea* (Cazorla *et al*, 2007).

### **1.3.2 Control biológico**

El control biológico se basa en la utilización de organismos vivos, o de moléculas secretadas por éstos, para evitar o reducir el daño y las consecuentes pérdidas causadas por los organismos patógenos. Entre los agentes de control biológico (BCAs) reportados se encuentran hongos filamentosos de los géneros *Trichoderma* (Nawrocka and Malolepsza, 2013), *Gliocladium* y *Ulocladium*, bacterias de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Serratia* (Ekmer and Reglinski, 2006) y levaduras de los géneros *Pichia* y *Candida* (Buck, 2004).

Los productos comerciales para el biocontrol de *B. cinerea* corresponden a un pequeño porcentaje dentro del mercado de los fungicidas. Sin embargo, en los últimos años se han incrementado las investigaciones sobre este tema y se espera un continuo crecimiento de este tipo de productos. Entre los controladores biológicos diseñados contra este hongo y que ya se encuentran en el mercado, podemos mencionar Serenade (AgraQuest, USA) que se basa en la utilización de *Bacillus subtilis* QST 713, TRICHODEX (Makhteshim, Israel) es un producto que utiliza *T. harzianum* (T39), Botry-Zen (Botry-Zen Ltd, Nueva Zelanda) producto basado en *Ulocladium oudemansii*.

El principal mecanismo de acción propuesto para los biocontroladores fúngicos es la competencia por los nichos ecológicos, especialmente por nutrientes tales como nitrógeno, carbono y microelementos (Lindow and Brandl, 2003; Sharma *et al*, 2009). Otro método de biocontrol es la antibiosis, que corresponde a la inhibición de la acción del hongo mediante la síntesis de compuestos antifúngicos, mecanismo descrito para hongos como *Trichoderma* y *Gliocladium*, o bacterias como *Bacillus subtilis*. La resistencia sistémica inducida (ISR) en plantas también es reconocida como un importante modo de biocontrol, este mecanismo puede ser inducido por compuestos químicos denominados elicitores y que constituyen un variado tipo de moléculas tales como ácido salicílico, ácidos grasos, carbohidratos y glicoproteínas. Este último método ha sido atribuido a una gran cantidad de microorganismos no patógenos como los saprófitos y microbios que promueven el crecimiento de plantas (Mohamed *et al*, 2011). En general, los microorganismos no poseen sólo un sistema de ataque, sino que presentan una combinación de varios de los mecanismos anteriormente mencionados, con lo que se reduce el riesgo de resistencia en el patógeno (Alamri *et al*, 2012).

#### **1.4 Bacterias del género *Bacillus* como biocontroladores**

*Bacillus subtilis* es una bacteria Gram positivo perteneciente a la familia *Bacillaceae* y al género *Bacillus*. Se encuentra ampliamente distribuida en el medioambiente, principalmente en los suelos y se caracteriza por producir esporas y no ser patogénica para los humanos.

Una característica importante de los miembros del género *Bacillus*, es su capacidad de secretar una amplia gama de moléculas bioactivas, que poseen propiedades antifúngicas, antimicrobianas e insecticidas. Adicionalmente, estas moléculas poseen una baja toxicidad para animales y humanos, y poseen la ventaja de presentar alta biodegradabilidad, por lo que no representan un peligro para el medioambiente a diferencia de los fungicidas químicos (Stein, 2005).

### 1.4.1 Lipopéptidos antifúngicos

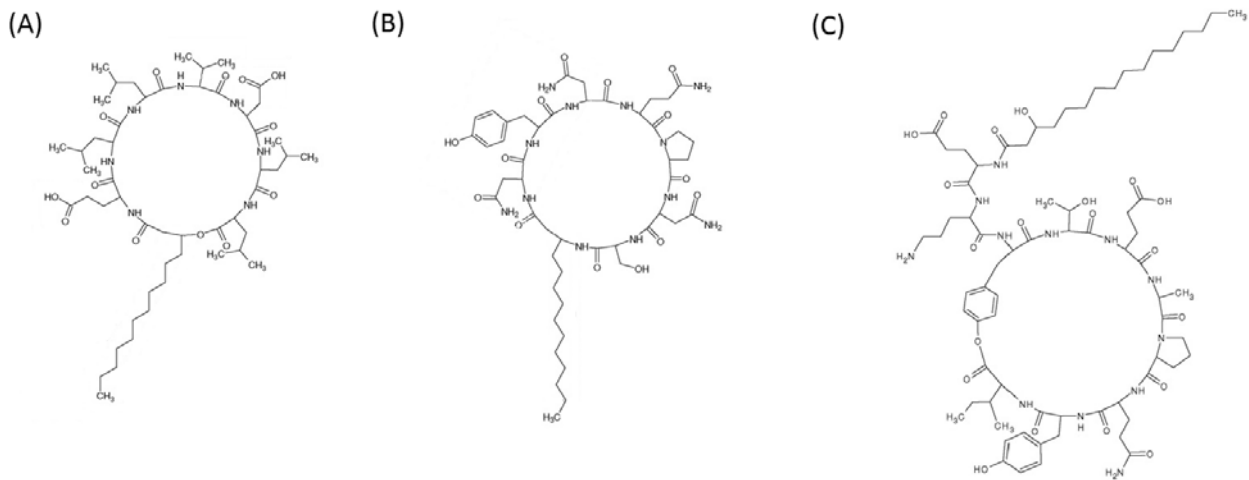
Entre las moléculas con capacidad antifúngica mejor caracterizadas se encuentran los lipopéptidos cíclicos (figura 1), los que se clasifican principalmente en tres familias: iturinas, fengicinas y surfactinas. Los lipopéptidos cíclicos están formados por un anillo peptídico unidos a una cadena de ácidos grasos, y una característica importante es que dentro de cada familia de lipopéptidos existen distintos homólogos, que difieren en la composición aminoacídica y longitud de la cadena de ácidos grasos (Aeguelles-Arias *et al*, 2009).

Las fengicinas son decapeptidos cíclicos que en general poseen la secuencia Glu-Orn-Tyr-Thr-Glu-Ala/Val-Pro-Gln-Tyr-Ile unido a un ácido graso de C14 a C18  $\beta$ -hidroxilado. Se ha observado que estas moléculas poseen una alta actividad antifúngica, especialmente contra hongos filamentosos. Los distintos homólogos pertenecientes a esta familia, presentan 4 características principales de heterogeneidad: i) longitud e insaturación de la cadena de ácido graso, ii) posición aminoacídica 6 (Ala/Val/Ile/Leu), iii) posición aminoacídica 10 (Val/Ile) y iv) posición aminoacídica 8 (Gln/Glu). Los principales miembros de esta familia se clasifican como fengicinas A o B, las que se diferencian en el residuo aminoacídico en la posición 6 (Ala/Val) (Pathak *et al*, 2012; Pecci *et al*, 2010).

Las surfactinas son heptapeptidos cíclicos, con una secuencia Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu unidos a una cadena de ácido graso  $\beta$ -hidroxilado, con longitud de 13C a 16C. Este tipo de moléculas se destacan por ser biosurfactantes con excepcionales propiedades emulsificantes, hemolíticas y antivirales, pero poseen una baja fungitoxicidad. Los distintos homólogos pertenecientes a esta familia pueden presentar 4 sitios distintos de heterogeneidad: i) longitud e insaturación de la cadena de ácido graso, ii) posición aminoacídica 1 (Gln/Glu), iii) posición aminoacídica 2 (Leu/Ile) y iv) posición aminoacídica 4 y 7 (Val/Ile) (Kowall *et al*, 1998).

Las iturinas son heptapeptidos cíclicos con una secuencia Asn-Tyr-Asn-Gln-Pro-Asn-Ser que se encuentran unidos a un ácido graso  $\beta$ -aminado de 14C a 17C. Se caracterizan por ser altamente fungitóxicos contra una gran variedad de hongos y levaduras, sin embargo poseen una baja actividad antibacteriana. Los miembros de esta familia presentan seis sitios de heterogeneidad: i) longitud e insaturación de la cadena de ácido graso, ii) aminoácido de la posición 1 (Asn/Asp), iii) aminoácido de la posición 4 (Ser/Pro/Gln/Glu), iv) aminoácido de la posición 5 (Glu/Gln/Pro), v) posición 6 (Ser/Asn/Asp) y vi) aminoácido de la posición 7 (Thr/Ser/Asn) (Gong *et al*, 2006).





**Figura 1. Familia de lipopéptidos cíclicos. (A) Surfactina, (B) Iturina y (C) Fengicina.**

Los mecanismos de acción de los lipopéptidos cíclicos se basan principalmente en su naturaleza anfipática, lo que les permite interactuar de manera directa con la membrana celular. Es así como las surfactinas y fengicinas producen la desestabilización y alteran la curvatura de la membrana, causando una alteración estructural de la célula (Heerklotz and Seelig, 2007). Por otra parte, las iturinas son capaces de formar poros en la membrana citoplasmática, lo que produce la salida de iones y la posterior fuga de macromoléculas esenciales para la supervivencia del hongo. Según lo reportado, la unión de los lipopéptidos cíclicos con la membrana es poco específica, por lo que su acción estaría condicionada por los siguientes parámetros: i) composición de esteroides y/o fosfolípidos de la membrana (Buchoux *et al*, 2008), ii) la concentración de lipopéptidos (Shen *et al*, 2010) y iii) capacidad de asociarse entre los lipopéptidos de una misma y/o distinta familia (Romero *et al*, 2007).

Adicionalmente, se ha reportado que los lipopéptidos pueden actuar de manera indirecta en la protección del tejido vegetal. Es así como las surfactinas y las fengicinas son capaces de producir perturbaciones de manera transitoria en la membrana de las células vegetales produciendo la activación de cascadas de señalización mediadas por la hormona ácido jasmónico y etileno que permiten la activación de la ISR. La respuesta de defensa inducida por los lipopéptidos produce un aumento en la síntesis de compuestos fenólicos y fitoalexinas. Además, se generan modificaciones en la pared celular vegetal, tales como el engrosamiento y lignificación del tejido (Ongena *et al*, 2005).

#### **1.4.2 Moléculas antifúngicas: metabolitos secundarios y enzimas**

Las moléculas orgánicas antifúngicas de menor peso molecular y más volátiles, pueden influenciar el crecimiento del hongo, la deformación de esporas e hifas o promover el crecimiento vegetal. La cantidad y naturaleza de los compuestos orgánicos varía según el aislado bacteriano del cual sean extraídos. Las moléculas más efectivas en el control de hongos fitopatógenos son las derivadas de fenoles (2,3,6-dimetilfenol y benzotiazol) y cetonas (2-decanona y 2-nonanona) (Zhang *et al*, 2013). Adicionalmente, se han descrito cepas bacterianas del género *Bacillus* que también pueden secretar enzimas antifúngicas con capacidad de degradar la pared celular del hongo, destacando las quitinasas y las  $\beta$ -1,3-glucanasas (Liu *et al*, 2010).

#### **1.4.3 Biocontrolador Serenade**

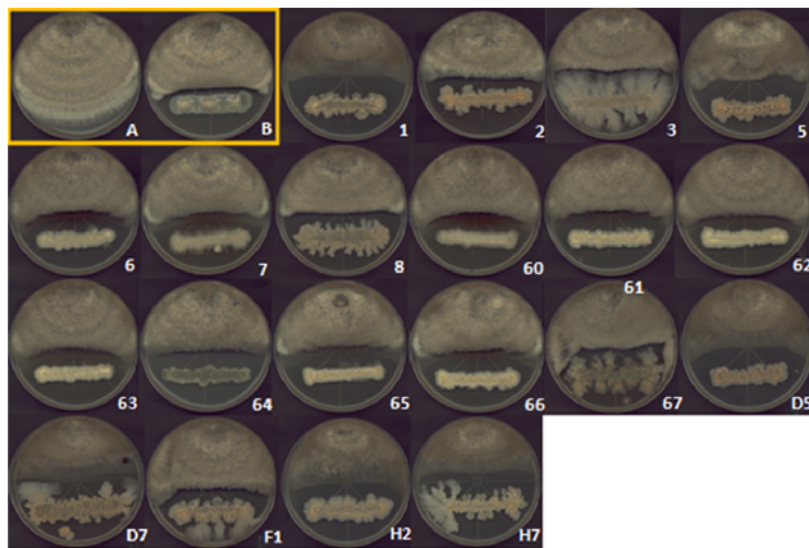
Serenade es un biocontrolador comercial utilizado actualmente para el control de *B. cinerea* y *Uncinula necator* en uva de mesa. También es capaz de proteger a otras especies vegetales contra otros hongos patógenos, tales como *Mycosphaerella fijensis*, *Alternaria solani* y *Sclerotinia seclerotiorum*. El principio activo de este producto corresponde a la cepa QST713 de *B. subtilis*, el que al ser aplicado cubre el tejido vegetal impidiendo la adherencia de las esporas y la posterior infección del tejido. Su modo de acción corresponde a la secreción de las siguientes moléculas: i) lipopéptidos cíclicos (fengicinas, iturinas y surfactinas), ii) péptidos antimicrobianos (macrolactinas, bacilicina y difícidina) y iii) moléculas que activan la respuesta ISR (2,3-butanodiol y ácido indolacético) (Marrone, 2002).

#### **1.5 Búsqueda de microorganismos con actividad fungicida contra *Botrytis cinerea***

Una de las principales desventajas en la utilización de los BCAs es que su efectividad en el campo no es equivalente al control químico y necesitan ser apoyados por fungicidas. Para superar este problema, se ha propuesto el uso de agentes químicos en bajas dosis junto con el biocontrolador, lo que busca generar un efecto sinérgico o aditivo contra el patógeno. Otra propuesta es la aplicación de una mezcla de BCAs que puedan ser capaces de atacar diferentes estados fisiológicos del ciclo de vida de *B. cinerea*. Es por ello que se ha sugerido que la aplicación de más de un antagonista que posean diferentes requerimientos ecológicos y distintos mecanismos de biocontrol, puede incrementar la eficacia del biocontrol (Guetsky *et al*, 2001).

Frente a la problemática económica que representa *B. cinerea* para el mercado de la uva de mesa, se convierte en una necesidad la búsqueda de nuevas alternativas que permitan controlar de manera eficiente a este patógeno. Bajo esta premisa, en nuestro laboratorio se han aislado cepas bacterianas provenientes de huertos orgánicos de la Región Metropolitana. En la figura 2 se observan los bioensayos de enfrentamiento entre *B. cinerea* 149 y las cepas bacterianas silvestres, las que presentan distintos grados de actividad antifúngica. Se utilizó como control positivo la cepa *Serratia plymuthica* CCGG2742 que corresponde a un biocontrolador de *B. cinerea* analizado en el laboratorio.

Para el posterior análisis y desarrollo de un biofungicida es necesario determinar el género y especie al cual pertenecen estos aislados bacterianos. Actualmente, Serenade se utiliza como biofungicida contra *B. cinerea*, por lo tanto es imprescindible realizar diversos análisis que permitan comparar la acción antifúngica de los aislados bacterianos silvestres con este biocontrolador para determinar la viabilidad de estos aislados como potenciales controladores de *B. cinerea*.



**Figura 2. Bioensayos de enfrentamiento entre *B. cinerea* 149 y distintas cepas bacterianas silvestres. A) *B. cinerea* 149, control negativo. B) *Serratia plymuthica* CCGG2742, control positivo.**

## **2. HIPÓTESIS**

“Cepas bacterianas silvestres secretan moléculas con actividad antifúngica contra *Botrytis cinerea*, cuya acción protege al hospedador vegetal del ataque por este hongo fitopatógeno, siendo más eficaces que el biocontrolador comercial Serenade.”

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar cepas bacterianas silvestres con actividad antifúngica y determinar su capacidad protectora contra el ataque del hongo sobre el vegetal.

### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Caracterizar a nivel filogenético, bioquímico y morfológico las cepas bacterianas silvestres con propiedades antifúngicas contra *Botrytis cinerea*.
2. Evaluar la capacidad antifúngica de las cepas bacterianas mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* y comparar su acción antifúngica con Serenade.
3. Identificar los compuestos químicos con capacidad antifúngica secretados por las cepas bacterianas.
4. Realizar un análisis parcial de la estructura de moléculas con capacidad antifúngica secretadas por las cepas bacterianas.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Cepas fúngicas

Las cepas de *Botrytis cinerea* se obtuvieron de un viñedo ubicado en la Región Metropolitana, y fueron mantenidas en medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) a 20°C (tabla 1).

**Tabla 1. Cepas de *Botrytis cinerea***

Cepas	Referencia
149	Stock del laboratorio
GG02	Stock del laboratorio
CD9	Stock del laboratorio
Rho21	Stock del laboratorio

### 4.2 Cepas bacterianas

Las 26 cepas bacterianas se aislaron de muestras de suelo obtenidas de un huerto orgánico de la región Metropolitana (tabla 2) y fueron mantenidas en medio de cultivo LB (triptona 1%, NaCl 1% y extracto de levaduras 0,5%) a 25°C.

**Tabla 2. Cepas silvestres aisladas desde un huerto orgánico**

Cepas Bacterianas		
1(2)	G1(2)	D7 (1)
3(2)	G2	D7 (3)
5(1)	G3(2)	F1 (2)
6(1)	G4 x(1)	F1 (3)
7(1)	G4 x(2)	H2 (1)
7(2)	G6	H2 (3)
7(22)	G7 (1)	H7
8(2)	G7 (2)	NB
G0(3)	D5 (3)	

### 4.3 Extracción del DNA genómico y PCR

Se aisló DNA genómico bacteriano según el protocolo de extracción con fenol-cloroformo (Klotz and Zimm, 1972). Para determinar la integridad del DNA genómico obtenido, se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) y se visualizó en un trans-iluminador UV, después de teñir el gel con bromuro de etidio. Luego, se realizó la amplificación del rDNA 16S utilizando *primers* universales para eubacterias denominados 8F y 1492R (Maiwald *et al*, 1994) (tabla 3), cuyas secuencias se indican a continuación:

**Tabla 3. *Primers* universales para eubacterias**

8F	5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'
1492R	5' ACGGGCGGTGTGTAC 3'

Las condiciones del PCR (tabla 4) que se utilizaron son las siguientes:

**Tabla 4. Parámetros utilizados para PCR**

Desnaturación inicial	95°C	2 min	
Desnaturación	95 °C	0,5 min	34 ciclos
Apareamiento de los <i>primers</i>	55° C	0,5 min	
Extensión	72°C	0,83min	
Extensión final	72°C	5 min	

Los productos de PCR obtenidos se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v).

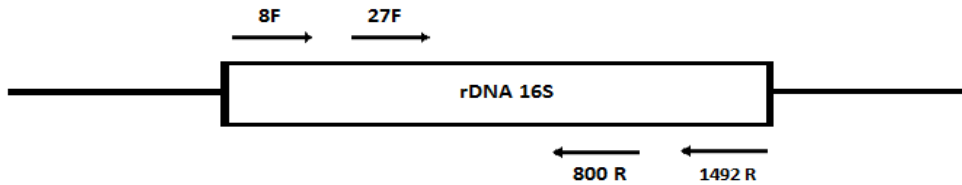
### 4.4 Secuenciación y análisis filogenéticos

Los productos de PCR se enviaron a secuenciar a la empresa Macrogen (Rockvill, MD, USA). Para ello se utilizaron los *primers* universales 27F y 800R, cuyas secuencias se indican a continuación (tabla 5):

**Tabla 5. *Primers* utilizados en la secuenciación de los amplicones**

27F	5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3'
800R	5' TACCAGGGTATCTAATCC 3'

Las regiones de los fragmentos de PCR que se secuenciaron, se muestran en la figura 3:



**Figura 3. Primers utilizados en la amplificación y secuenciación del gen del rRNA 16S.** Las flechas indican la posición relativa de los primers utilizados.

A partir de la secuencia de los fragmentos, se procedió a generar la secuencia del rDNA para cada bacteria utilizando el programa AlignX, de la suite bioinformática Vector NTI. Luego, mediante BLASTn se compararon las secuencias de las cepas silvestres con las secuencias que se encuentran en la base de datos GenBank (Sato, 2013). Por último, las secuencias obtenidas se sometieron a un análisis filogenético usando el programa MEGA versión 5.1 (Tamura, 2011), donde se realizó un análisis de máxima verosimilitud y se utilizó el modelo evolutivo de Kimura. La solidez estadística de los árboles se evaluaron por 1000 réplicas de bootstrap (Soltis and Soltis, 2003).

#### 4.5 Ensayos bioquímicos

Para la clasificación de la especie a la cual pertenecen las cepas bacterianas aisladas en nuestro laboratorio, se utilizó la metodología implementada por Norris et al (1981). Mediante 4 ensayos bioquímicos se identificó y diferenció entre las especies *B. subtilis* y *B. pumilus*. Los ensayos correspondientes fueron:

i) **Actividad catalasa:** Se colocó una alícuota de suspensión bacteriana de cada cepa sobre un portaobjeto, luego se agregó una gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se observó el burbujeo debido a la liberación de oxígeno por parte de las bacterias catalasa positivo.

ii) **Prueba de Voges-Proskauer:** Las bacterias se inocularon en un medio de cultivo conteniendo peptona 0,7%, glucosa 0,5% y fosfato dipotásico 0,5% y se incubaron por 24 horas a 25°C, para luego

revelar con  $\alpha$ -naftol al 5% en etanol y KOH al 40%. La aparición de una coloración roja indicó la fermentación de la glucosa por parte de la bacteria generando 2,3-butanediol.

iii) **Anaerobiosis:** Se determinó si las cepas bacterianas tenían la capacidad de crecer en medio sólido en ausencia de oxígeno mediante la utilización de una jarra de anaerobiosis.

iv) **Hidrólisis de almidón:** Las cepas bacterianas se cultivaron por 24 horas en medio sólido conteniendo almidón (agar-agar 1,5%, almidón 0,2%, NaCl 0,5% y peptona 1%). El revelado se realizó con lugol, observándose la aparición de un halo claro en el medio donde se sembraron bacterias amilasa positivo (Slepecky and Hemphill, 2006).

Además se realizaron pruebas adicionales características para el género *Bacillus*, las que permitieron complementar la identificación de las cepas: i) capacidad de cada cepa de crecer a 55° C; ii) crecimiento a distintas concentraciones de NaCl (1, 5, 7 y 10% p/v); iii) hidrólisis de caseína, utilizando medio de cultivo agar-caseína (agar 1,5%, leche descremada 7% y peptona 0,5%). En este último medio, si el resultado es positivo, se observa un halo claro luego de un período de incubación de 2 días a 25°C, (Logan and De Vos, 2009).

#### **4.6 Microscopia electrónica de transmisión (TEM)**

Para los análisis estructurales de las bacterias, se utilizó un microscopio electrónico de transmisión (TEM), Philips Tecnai 12 (Eindhoven, The Netherlands) a 80 kV. Para la visualización de las células se utilizó la metodología de tinción negativa, para lo cual las bacterias se fijaron a grillas de cobre de 200 mesh, las que estaban cubiertas de carbono y formvar, y luego se tiñeron con fosfotungstato de potasio pH 7.0 o acetato de uranilo.



## **4.7 Métodos de evaluación de actividad antagónica contra *B. cinerea***

### **4.7.1 Bioensayos *in vitro***

Los bioensayos de enfrentamiento *in vitro* entre dos microorganismos se realizaron en una placa de Petri, donde se inoculó *B. cinerea* con un sacabocado (5 mm) en el centro de esta y en los cuatro extremos se inoculó la bacteria, incubándose por 7 días a 20 °C. Se realizaron los bioensayos con las siguientes variaciones en el medio de cultivo:

**i) variación de fuente de carbono:** los bioensayos se realizaron en el medio MTA (extracto de malta 2%, triptona 0,1%, y agar-agar 1,5%) y para determinar el efecto de la fuente de carbono sobre la producción de moléculas con capacidad antifúngica, se utilizó medio MTA suplementado con sacarosa, sorbitol, glicerol, glucosa o maltosa al 2% (p/v). Sumado a lo anterior, para determinar si la concentración de los nutrientes tenía algún efecto en la secreción de moléculas antifúngicas, se utilizó el medio MTA con la mitad de la concentración de sus componentes, el que se denominó MTA/2 (extracto de malta 1%, triptona 0,05% y agar-agar 1,5%).

**ii) variación de pH:** el ajuste se realizó con distintos amortiguadores dependiendo del pH al que se quería ajustar el medio. Se utilizó acetato de sodio 0,1 M (pH 5); fosfato de sodio 0,1 M (pH 6, 7 y 8) y Tris-HCl 0,1M (pH 9).

**iii) variación de temperatura:** Se realizaron los bioensayos a 15, 20, 25 y 30 °C.

En los bioensayos se midió el halo de inhibición que producían las bacterias sobre el crecimiento del micelio fúngico. Para los análisis estadísticos se utilizó ANOVA de una vía con un n=4 (Islam, 2012). Adicionalmente, para determinar la influencia que posee la variación de la fuente de carbono, el pH y la temperatura en el crecimiento bacteriano, se midieron las unidades formadoras de colonias (U.C.F.) de cada bacteria luego de incubarse por 16 h en medio líquido. Para los análisis estadísticos se utilizó ANOVA de una vía con un n=3.

#### **4.7.2 Bioensayos *in vivo***

Para visualizar el efecto inhibitorio por parte de las bacterias sobre el hongo en tejido vegetal, se realizaron bioensayos *in vivo* utilizando hojas y frutos. En el primer caso, los bioensayos se realizaron en hojas de plantas de porotos (*Phaseolus vulgaris* L) en triplicado. Para ello, el material vegetal se desinfectó previamente con hipoclorito de sodio al 0,1% (v/v). Luego, las hojas se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se inocularon por aspersión con 1 mL de suspensión de cada cepa bacteriana por separado ( $10^8$  ufc/mL), las que previamente se cultivaron en medio LB durante 16 h a 25°C. Posteriormente, a las hojas se les aplicó por aspersión 1 mL de una suspensión de esporas ( $10^6$  esporas/mL). Las esporas se obtuvieron a partir de cultivos de *B. cinerea* en matraces con medio King-B (peptona 2%, glicerol 1%,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  0,16 % y agar-agar 1,6%) que se incubaron por 7 días a 20° C. Luego, se agregó a los matraces una solución detergente (Triton X-100 al 0,5%) y se agitó para desprender los conidios. Antes de su utilización, las suspensiones se filtraron y las esporas se cuantificaron en cámara de Neubauer (Rodríguez-Tudela, 2003). Finalmente, las hojas sometidas a los distintos tratamientos se incubaron a 20°C por 7 días, obteniéndose registros fotográficos cada 24 h (Cotorás *et al*, 2004).

Para los bioensayos en fruto, se utilizaron bayas de uva de mesa Thompson seedless (6 a 7 bayas) en triplicado. Para la esterilización y aplicación de las bacterias e infección con el hongo, se utilizó el mismo protocolo descrito para las hojas. Las bayas tratadas se incubaron a 20°C por 12 días obteniendo registros fotográficos cada 4 días.

### **4.8 Extracción de compuestos antifúngicos con solventes orgánicos**

#### **4.8.1 Extracción clorofórmica**

La extracción de moléculas con actividad antifúngica secretadas por las cepas bacterianas se realizó a partir de 100 placas de Petri con medio MTA, las que se incubaron por 5 días a 25°C. El medio sólido fue transferido a 1 L de cloroformo y después de agitar vigorosamente, la solución orgánica se filtró en gasa para descartar el agar. Posteriormente, la solución orgánica se llevó a sequedad por evaporación en un rotavapor (Buchi waterbath B-480) a 45°C y -20 mm de Hg. El residuo sólido obtenido se disolvió en 100  $\mu$ L de cloroformo: hexano (1:1) y se realizaron ensayos de

inhibición del crecimiento de *B. cinerea* 149 en medio PDA suplementado con ampicilina (100 µg/mL) (Dandurishvili *et al*, 2010).

#### **4.8.2 Extracción con acetato de etilo**

Las bacterias se incubaron en 1 L de medio líquido MTA a 25°C por 4 días. Las células se sedimentaron por centrifugación a baja velocidad y se descartaron. Por cada volumen de sobrenadante, se agregaron tres volúmenes de acetato de etilo y la extracción se realizó en un embudo de decantación. Después de agitar vigorosamente durante 20 min, se obtuvieron 3 fases, de las cuales se recuperó la correspondiente a la fase superior orgánica. Esta fase se llevó a sequedad por evaporación en un rotavapor (Buchi waterbath) a 40°C y -20 mm de Hg. El residuo sólido se disolvió en 100 µL de acetato de etilo y se realizaron ensayos de inhibición del crecimiento de *B. cinerea* 149 en medio PDA suplementado con ampicilina (100 µg/mL) (Islam *et al*, 2012).

#### **4.9 Cromatografía de alta eficiencia de fase reversa (HPLC)**

Los extractos obtenidos a partir de los cultivos bacterianos se analizaron en un equipo de CLAE analítico (Waters 600) equipado con una columna Symmetry (5µm; 15 x 3,9 cm). Se usó como fase móvil ácido acético 0,1% en agua (A) y ácido acético 0,1% en acetonitrilo (B) con la siguiente gradiente de elución: 0-10 min, elución isocrática constante con 90% A/ 10% B; 10-45 min, gradiente lineal que varía desde 90% A/ 30% B a 55% A/ 45% B. La detección se realizó con un detector Water 2996 con arreglo de fotodiodos (DAD) (Burin *et al*, 2011).

#### **4.10 Test agar CTAB-azul de metileno**

Para observar la presencia de biosurfactantes o lipopéptidos se utilizó el medio agar MTA suplementado con azul de metileno 5 µg/mL y CTAB 0,2 mg/mL. Posteriormente, las bacterias se inocularon en este medio y se incubaron a 25°C por 24 horas. La presencia de biosurfactantes se puede observar por la aparición de un halo azul oscuro en el agar, debido a la interacción entre el biosurfactante y el CTAB (Siegmod and Wagner, 1991).

#### **4.11 Test de “drop collapsing”**

Para determinar la presencia de biosurfactantes o lipopéptidos se cultivaron las cepas bacterianas en 1 mL de medio MTA por 48 h a 25°C y 150 rpm. Luego, los cultivos se centrifugaron a 9000 rpm por 10 min para sedimentar las células y obtener el sobrenadante líquido, del cual se adicionaron 40 µL sobre una placa de vidrio previamente embebida con aceite vegetal (Jain *et al*, 1991). La presencia de biosurfactantes se puede observar por el colapso de la gota del sobrenadante líquido sobre la placa hidrofóbica, debido a su propiedad emulsificante que permite la interacción entre la fase hidrofóbica e hidrofílica.

#### **4.12 Test agar- quitina**

Para determinar la capacidad de las bacterias de secretar la enzima quitinasa, el medio de cultivo MTA se suplementó con quitina coloidal al 3% y azul de toluidina al 0,001%. Las bacterias se inocularon en este medio y se incubaron por 5 días a 25°C. La presencia de quitinasa se observa por la aparición de zonas claras alrededor del inóculo bacteriano que indican que la quitina ha sido hidrolizada (Patil *et al*, 2000).

#### **4.13 Test agar laminarina**

En el caso de la detección de glucanasas secretadas, se utilizó un medio suplementado con el polímero laminarina (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5%, KCl 0,1%, MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O 0,5%, extracto de levadura 0,5% y laminarina 0,4%), para determinar la presencia de la enzima β-1,3-glucanasa. Las bacterias se incubaron por 24 h a 25°C, luego las placas fueron teñidas con una solución de rojo congo (0,03%) y posteriormente se lavaron con una solución de NaCl (1M) para observar las zonas claras alrededor de las colonias bacterianas que indican la hidrólisis de laminarina (Teather and Wood, 1982).

#### **4.14 Cromatografía en capa fina (TLC)**

Los extractos metanólicos de las bacterias se cargaron sobre una placa de sílica gel de 10 x 3 cm y 0,5 mm de espesor (Merck). Para separar los compuestos desconocidos se utilizó diclorometano como solvente. Sin embargo, si bajo estas condiciones, los componentes migran hasta llegar a la parte superior de la placa (Rf: 1), la polaridad del solvente se disminuye agregando hexano. En caso contrario, si la muestra permanece en la línea de origen de la placa (Rf: 0), se aumenta la polaridad del solvente adicionando metanol (Cserháti and Forgács, 1997). Para la visualización del cromatograma se utilizó luz UV (254 nm y 365 nm), mientras que para la detección de compuestos que no absorben la luz UV, se utilizaron agentes reveladores tales como ácido sulfúrico al 25% (v/v) y 4-anisaldehído, para visualizar los compuestos orgánicos de naturaleza terpenoide y los derivados del ciclopentano perhidro fenantreno, respectivamente (Mukherjee *et al*, 2014).

Para la búsqueda de lipopéptidos antifúngicos, los extractos orgánicos se separaron mediante TLC con una fase móvil de cloroformo: metanol: agua (65:25:4) y para la visualización del cromatograma se utilizó luz UV (254 y 365 nm) y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 25% (v/v).

#### **4.15 Espectroscopía infrarroja (IR)**

Los extractos obtenidos de las bacterias se analizaron en un espectrofotómetro infrarrojo con transformadas de Fourier (Bruker FT-IFS 66v). El compartimiento de las muestras varió dependiendo del estado físico de esta. Para las muestras líquidas, se depositaron entre dos discos de KBr mientras que, la muestra sólida fue redisuelta en el hidrocarburo nujol.

#### **4.16 HPLC asociado a espectrometría de masas (LC-MS/MS)**

Se utilizó LC-MS/MS para identificar los lipopéptidos cíclicos presentes en las muestras. Los análisis se realizaron en el equipo Dionex Ultimate 3000 Thermo Scientific y los parámetros utilizados se muestran en la Tabla 6. Se inyectaron 10 µL de las muestras disueltas en metanol y se eluyeron utilizando la siguiente fase móvil: i) agua acidificada con ácido fórmico 0,1% (solvente A) y ii) acetonitrilo acidificado con ácido fórmico 0,1% (solvente B) (Aeguelles – Arias *et al*, 2009).

**Tabla 6. Parámetros utilizados para LC-MS/MS**

HPLC		MS	
<b>Columna</b>	Hypersil gold 50 x 2,1 mm C18	<b>Modo de ionización</b>	Electrospray
<b>Temperatura</b>	25°C	<b>Polaridad del ión</b>	Positiva
<b>Flujo de flujo</b>	0,3 mL/min	<b>Rango de masas</b>	200-2000 m/z
<b>Gas</b>	He	<b>Tiempo de escaneo</b>	0,2 s

La adquisición de los espectros de masas se realizó en dos modalidades:

#### 4.16.1 Monitorización de todos los iones (full scan)

Este modo comprende la adquisición de todas las moléculas que se ionizan en la interfase y que llegan a la trampa de iones donde se produce su fragmentación. Posteriormente, todos los iones producidos llegan al detector para ser analizados.

#### 4.16.2 Monitorización selectiva de iones (SIM)

Este análisis permite al equipo seleccionar el ion de interés, este se fragmenta por colisión con un gas inerte (He) en una celda y posteriormente se realiza el análisis de los fragmentos producidos.

Se utilizó un programa de elución general para la identificación de los lipopéptidos (Tabla 7). También se utilizó un programa de elución cromatográfica específico para iturinas, surfactinas y fengicinas (Tabla 8), con el fin de obtener señales más distantes que permitieran una mejor visualización y análisis de estas (Aeguelles – Arias *et al*, 2009).

**Tabla 7. Programa de elución utilizado en LC-MS/MS para la identificación de lipopéptidos.**

Tiempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	57	43
1,5	57	43
17	37	63
17,5	20	80
26	0	100
27	57	43
35	57	43

**Tabla 8. Programas de elución utilizados en los análisis de LC-MS/MS específicos para cada familia de lipopéptidos**

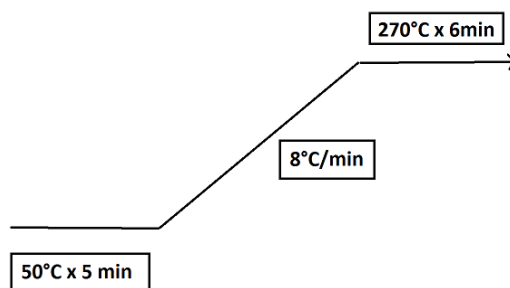
Iturinas		
Tiempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	62	38
20	55	45
25	50	50
27	0	100
32	0	100
33	62	38
40	62	38

Surfactinas		
Tiempo (min)	A (%)	B (%)
0	22	78
20	22	78

Fengicinas		
Tiempo (min)	A (%)	B (%)
0	60	40
20	35	65
21	0	100
26	0	100
27	60	40
40	60	40

#### 4.17 GC asociada a espectrometría de masas (GC-MS)

Para el análisis de GC-MS, se utilizó un equipo Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra, con el software Xcalibur y la base de datos NIST. La rampa de temperatura utilizada para la columna de GC se describe en la figura 4 y los parámetros del equipo se muestran en la tabla 9.



**Figura 4. Condiciones de temperatura y tiempo utilizados en GC-MS**

**Tabla 9. Parámetros utilizados en los análisis de GC-MS**

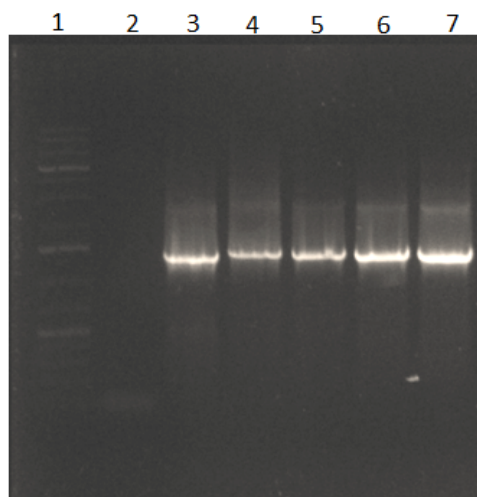
GC		MS	
Modo	Splitless	Modo de ionización	IE
Tiempo de splitless	7 min	Energía de ionización	70 eV
Flujo de flujo	1mL/min	Rango de masas	35 – 500 m/z
Columna	Rtx-5MS	Tiempo de escaneo	0,2 s

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Caracterización de las cepas bacterianas silvestres con propiedades antifúngicas contra *Botrytis cinerea*.

#### 5.1.1 Caracterización filogenética

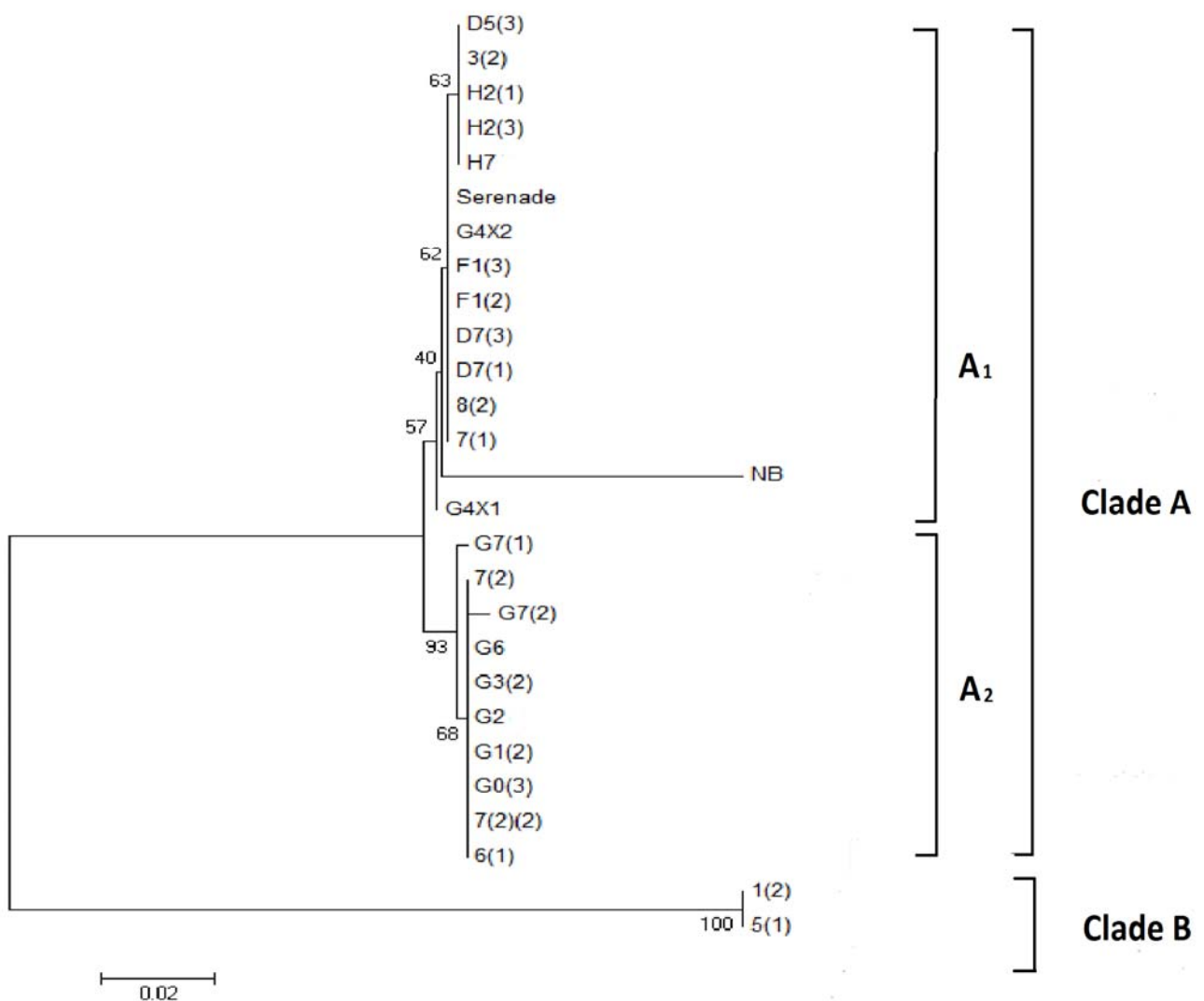
La identificación de las cepas bacterianas con actividad antifúngica, obtenidas desde un huerto orgánico, se realizó por secuenciación y análisis del rDNA 16S. Para esto se preparó DNA genómico de cada uno de ellos y de la cepa comercial *B. subtilis* QST 713 (Serenade). Luego, se amplificó por PCR la región del DNA que codifica para el rRNA 16S, los amplicones obtenidos se secuenciaron y con los datos de las secuencias se realizó un análisis filogenético comparándolos con secuencias depositadas en bases de datos. En la figura 5 se muestran las bandas de 5 amplicones correspondientes a las cepas 1(2), 2(1), 3(2), 5(1) y NB. Estos fragmentos poseen un tamaño de 1500 pb, lo que es coincidente con la región flanqueada por los *primers* universales utilizados que se diseñaron para amplificar esta región en eubacterias. Los 21 aislados restantes presentaron el mismo patrón que se observa en la figura 5.



**Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) de los fragmentos de DNA obtenidos por PCR. Carril 1, estándar de tamaño molecular. Carril 2 control negativo de PCR sin DNA. Carriles 3 a 7 resultados de la amplificación del DNA de las cepas 1(2), 2(1), 3(2), 5(1), NB respectivamente, utilizando los *primers* 8F/1492R.**



Para la reconstrucción filogenética se realizó un análisis de "neighbor joining" utilizando el programa MEGA versión 5.1 (Tamura *et al* 2011). Para esto, se utilizaron las secuencias obtenidas que se alinearon previamente con el programa Muscle. Se determinó que las cepas bacterianas aisladas se distribuían en dos clades denominados A y B y que a su vez el clade A se subdividía en dos subclades que se denominaron A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> (figura 6). Adicionalmente, se compararon las secuencias de los aislados bacterianos con la secuencia de *B. subtilis* QST 713 (Serenade) y se observó que esta cepa presenta similitud con las cepas del clade A<sub>1</sub>.



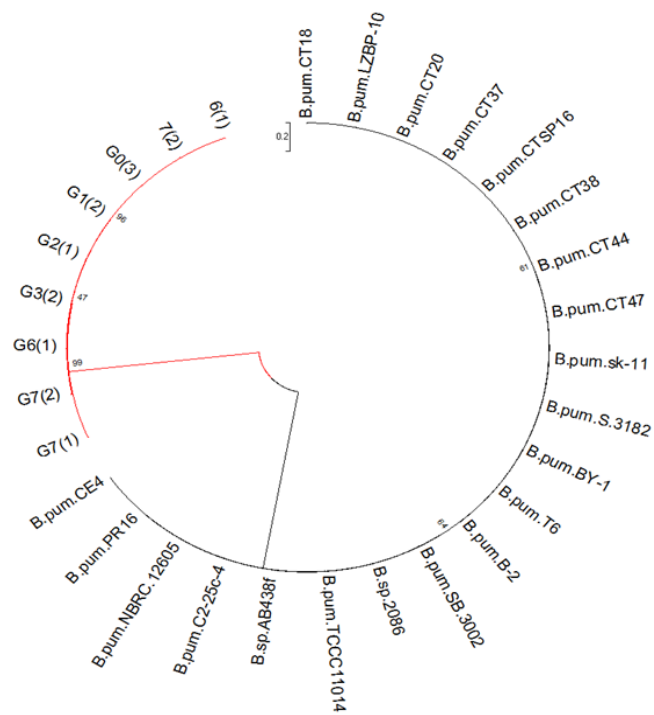
**Figura 6. Árbol filogenético de las cepas bacterianas silvestres.** Las secuencias se agrupan en dos clades principales (A y B) y uno de ellos se subdivide en dos subgrupos (A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>).

La comparación de las secuencias por BLAST con las almacenadas en la base de datos de Genbank, reveló que las cepas del grupo A<sub>1</sub> presentan similitud con bacterias de la especie *Bacillus subtilis*, mientras que las cepas del grupo A<sub>2</sub>, con *Bacillus pumilus*. En las figuras 7 y 8 se puede observar como las cepas aisladas se asocian a miembros de las familias antes mencionadas.

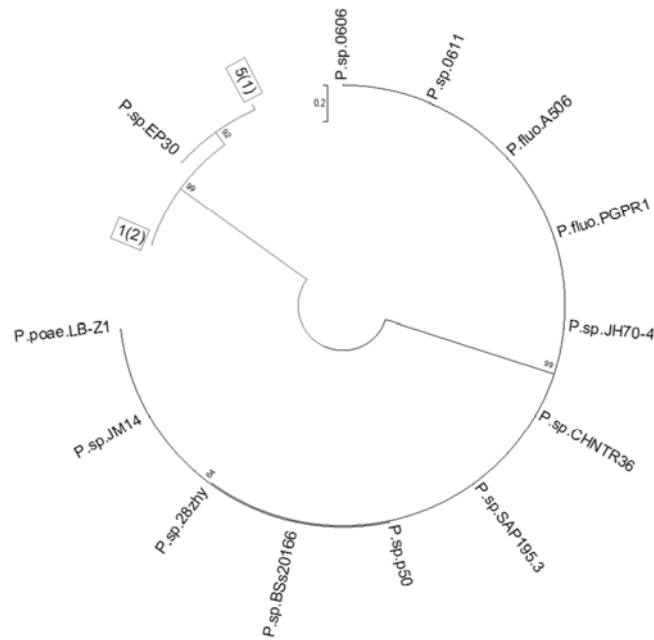
Finalmente, los miembros del grupo B presentaron similitud con miembros del género *Pseudomonas*, lo que se puede observar en el análisis de la figura 9.



**Figura 7. Representación filogenética de las secuencias del clade A<sub>1</sub> comparadas con las secuencias de la base de datos GenBank. En los cuadrados se indican las cepas bacterianas silvestres y Serenade.**

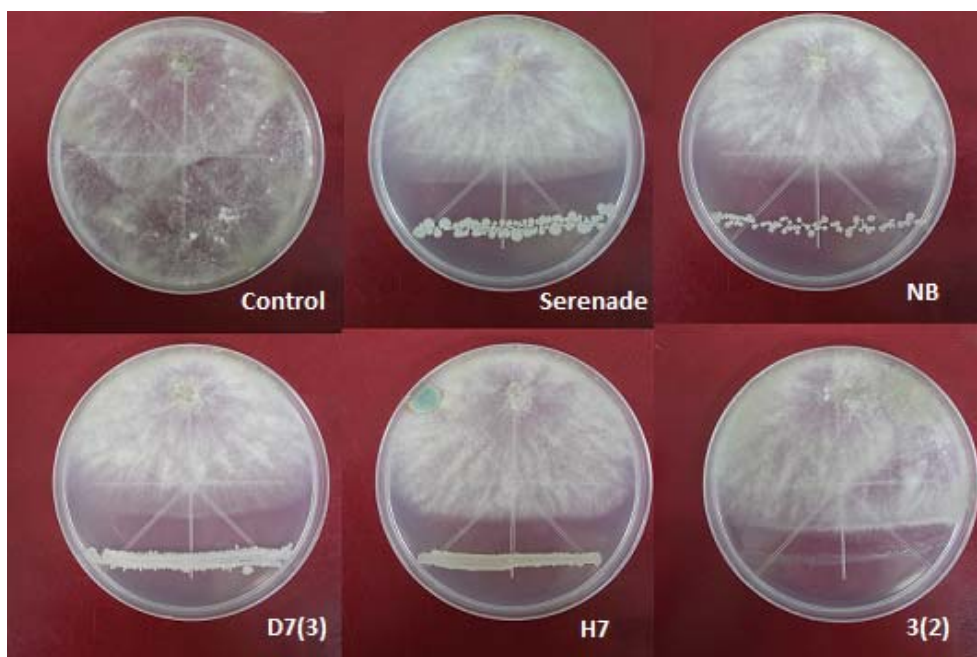


**Figura 8. Representación filogenética de las secuencias del clade A<sub>2</sub> comparadas con las secuencias de la base de datos GenBank. En rojo se indican las secuencias de los aislados bacterianos silvestres.**



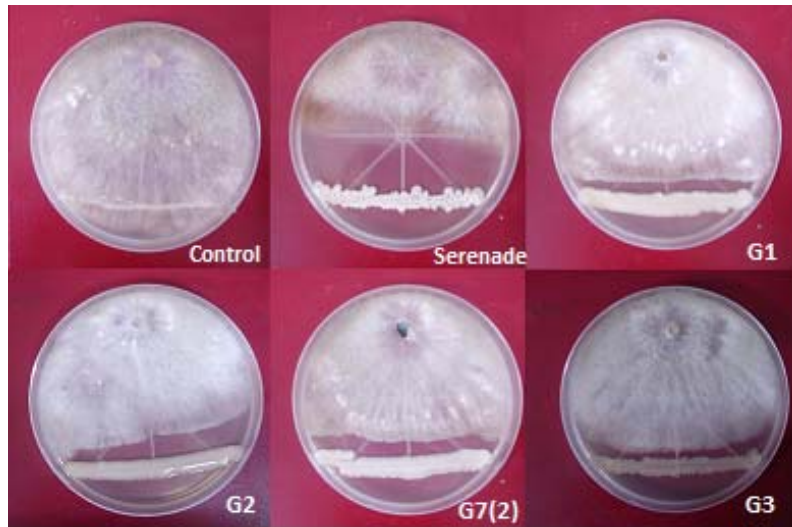
**Figura 9. Representación filogenética de las secuencias del clade B comparadas con las secuencias de la base de datos GenBank. En los cuadrados se indican las cepas bacterianas silvestres.**

Para la caracterización bioquímica y morfológica de las cepas, se seleccionaron aquellas que presentaron la mayor actividad antifúngica contra *B. cinerea*. Para la selección de las bacterias pertenecientes al clade A<sub>1</sub> (*B. subtilis*) se realizaron bioensayos en placas con agar papa-dextrosa, en donde se inoculó en un extremo micelio de *B. cinerea* 149 y en el otro extremo la cepa bacteriana a analizar. En la figura 10 se muestran las 4 cepas de *B. subtilis* que presentaron la mayor actividad antifúngica. Al compararlas con el principio activo del biocontrolador Serenade, las cepas aisladas en nuestro laboratorio presentan un efecto inhibitorio de magnitud similar a este biocontrolador comercial.



**Figura 10.** Bioensayos de enfrentamiento entre *B. cinerea* 149 y cepas bacterianas del clade A<sub>1</sub>. Control, bioensayo de enfrentamiento entre *B. cinerea* 149 y *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Serenade corresponde a la cepa *B. subtilis* QST 713.

Para los miembros del clade A<sub>2</sub>, los que corresponden a cepas de *B. pumilus*, se realizaron bioensayos en placas de agar LB para favorecer el crecimiento bacteriano. En la figura 11 se muestran las cepas de *B. pumilus* que presentaron mayor actividad antifúngica, siendo la cepa *B. pumilus* G2 la que presentó la mayor actividad del clade A<sub>2</sub>. Sin embargo, la capacidad inhibitoria del crecimiento fúngico de todas las cepas silvestres de *B. pumilus* aisladas en nuestro laboratorio fue más baja que la de *B. subtilis* QST 713, principio activo de Serenade.



**Figura 11. Bioensayos de enfrentamiento entre *B. cinerea* 149 y las cepas del clade A<sub>2</sub>.** Control, bioensayo de enfrentamiento entre *B. cinerea* 149 y *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Serenade corresponde a la cepa *B. subtilis* QST 713.

Finalmente, los ensayos para determinar la capacidad antifúngica de las cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* (grupo B), también se realizaron en medio LB, observándose que poseen una actividad antifúngica bastante menor que las cepas de *Bacillus*, por lo que no se consideraron para los análisis posteriores (figura 12).



**Figura 12. Bioensayos de enfrentamiento entre *B. cinerea* 149 y las cepas bacterianas del clade B.** Control, bioensayo de enfrentamiento entre *B. cinerea* 149 y *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Serenade corresponde a la cepa *B. subtilis* QST 713.

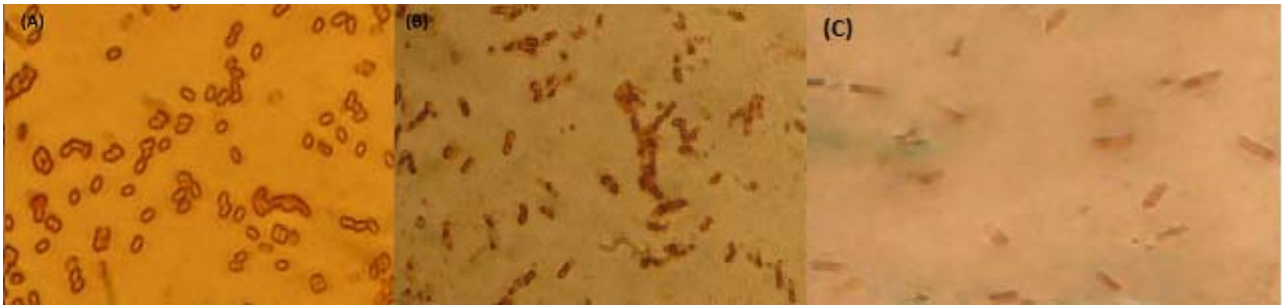
### 5.1.2 Caracterización bioquímica

Para la caracterización bioquímica se consideraron las bacterias que presentaron mayor actividad antifúngica en los bioensayos de antagonismo. Según estos datos, las cepas de *B. subtilis* seleccionadas fueron NB, D7(3) y H7 y las de *B. pumilus*, fueron G2 y G7(2). Se utilizó como control positivo a *B. subtilis* QST 713, principio activo del biocontrolador Serenade y a *E. coli* DH5 $\alpha$  como control negativo.

En la tabla 10 se puede observar que todas las bacterias cumplen con los requisitos para ser clasificadas en el género *Bacillus* según lo descrito en la literatura. Las bacterias seleccionadas son Gram (+), catalasa (+), formadoras de esporas, son capaces de crecer a 55°C y a altas concentraciones de NaCl (figura 13). Finalmente, la diferenciación en especie *B. subtilis* o *B. pumilus* se realizó gracias a la hidrólisis de almidón, ya que estas últimas no generan la enzima amilasa (tabla 10).

**Tabla 10. Resultados de los ensayos bioquímicos de identidad**

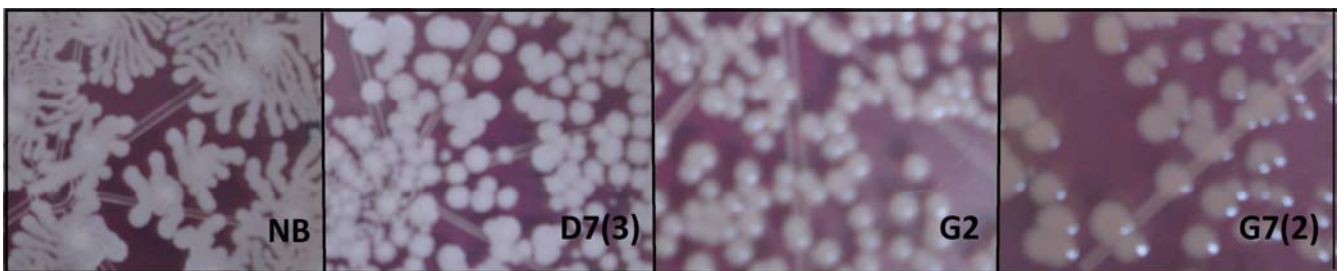
Cepa	Tinción Gram	Actividad Catalasa	VP	Anaerobiosis	Hidrólisis de Almidón	55°C	NaCl (1%)	NaCl (5%)	NaCl (7%)	NaCl (10%)	Caseinasa
DH5 $\alpha$	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
QST 713	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
NB	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
D7(3)	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
H7	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
G2	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
G7(2)	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-



**Figura 13. Visualización al microscopio óptico de las cepas bacterianas.** A) Tinción Gram de *B. pumilus* G7(2). B) Tinción Gram de *B. subtilis* D7(3). C) Tinción de endoesporas de *B. subtilis* NB.

### 5.1.3 Caracterización Morfológica de las colonias

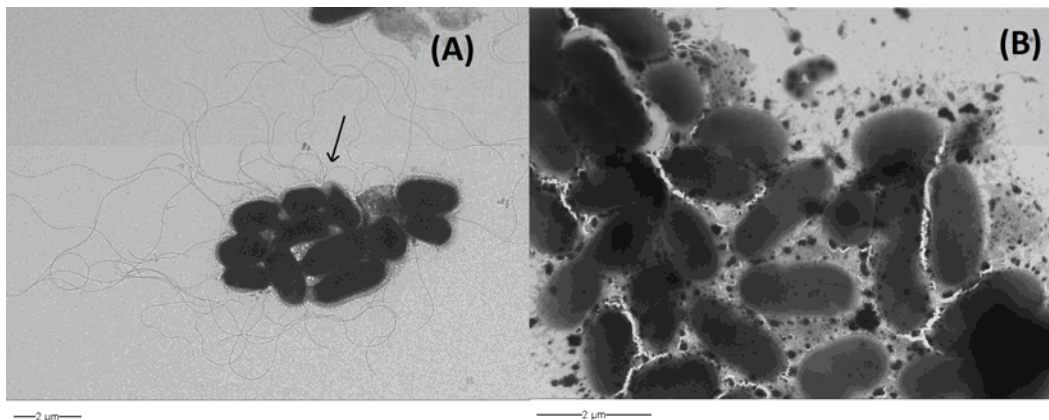
La visualización macroscópica de las colonias de cada aislado bacteriano permitió determinar su morfología. En la figura 14A y B se muestran las colonias de *B. subtilis* NB y D7(3). Se puede observar que presentan un color blanquecino, de apariencia rugosa, con bordes irregulares y de superficie opaca. Mientras que las figuras 14 C y D corresponden a *B. pumilus* G2 y G7(2), donde se pudo observar que las colonias presentan una morfología distinta a *B. subtilis*, ya que poseen una ligera pigmentación amarilla, de aspecto brillante y bordes regulares. Estas características corresponden a lo descrito en el Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology (Logan and De Vos, 2009).



**Figura 14. Visualización macroscópica de las colonias bacterianas.** Cepas bacterianas utilizadas: *B. subtilis* NB, *B. subtilis* D7(3), *B. pumilus*: G2 y *B. pumilus* G7(2).

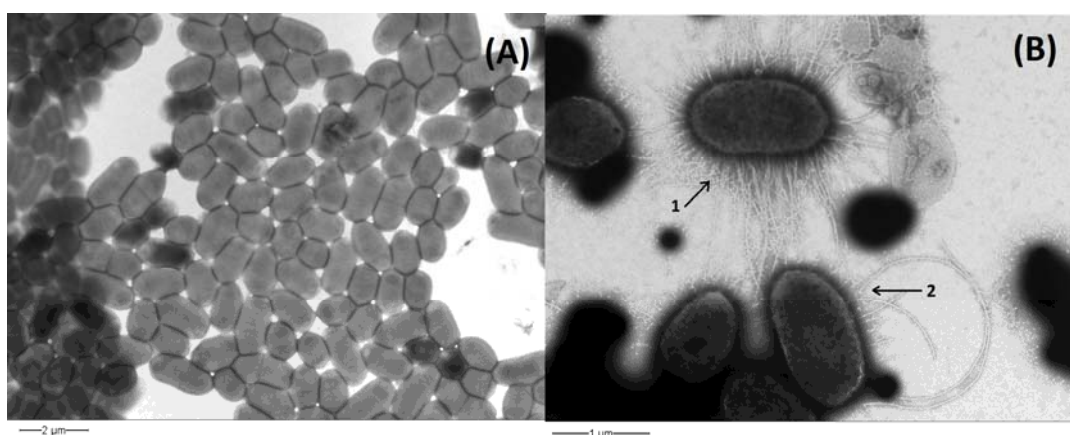
### 5.1.4 Microscopía electrónica

La caracterización estructural por microscopía electrónica de transmisión, se realizó con las bacterias *B. subtilis* NB y *B. pumilus* G2. Para su visualización las muestras se tiñeron negativamente con acetato de uranilo y fosfotungstato de potasio pH 7.0. En la figura 15 se puede observar que *B. subtilis* NB presenta forma de bacilo con una longitud aproximada de 2  $\mu\text{m}$  y un diámetro de 0,9  $\mu\text{m}$ . También, se observaron abundantes estructuras extracelulares tales como flagelos peritricos (figura 15A).



**Figura 15. Microfotografías electrónicas de *B. subtilis* NB.** (A) Tinción negativa con acetato de uranilo y (B) tinción negativa con fosfotungstato de potasio pH 7.0. La flecha indica flagelos peritricos.

Por otra parte, *B. pumilus* G2 posee una forma más ovalada, cuya longitud máxima es de aproximadamente 1,3  $\mu\text{m}$  y diámetro de 0,75  $\mu\text{m}$  (figura 16A). Además, fue posible visualizar apéndices bacterianos, tales como fimbrias y flagelos (figura 16B).



**Figura 16. Microfotografías electrónicas de *B. pumilus* G2.** (A) Tinción negativa con acetato de uranilo y (B) tinción negativa con fosfotungstato de potasio pH 7.0. Las flechas indican las estructuras extracelulares: (1) fimbrias y (2) flagelos.



## **5.2 Evaluación de la capacidad antifúngica de las cepas bacterianas mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*.**

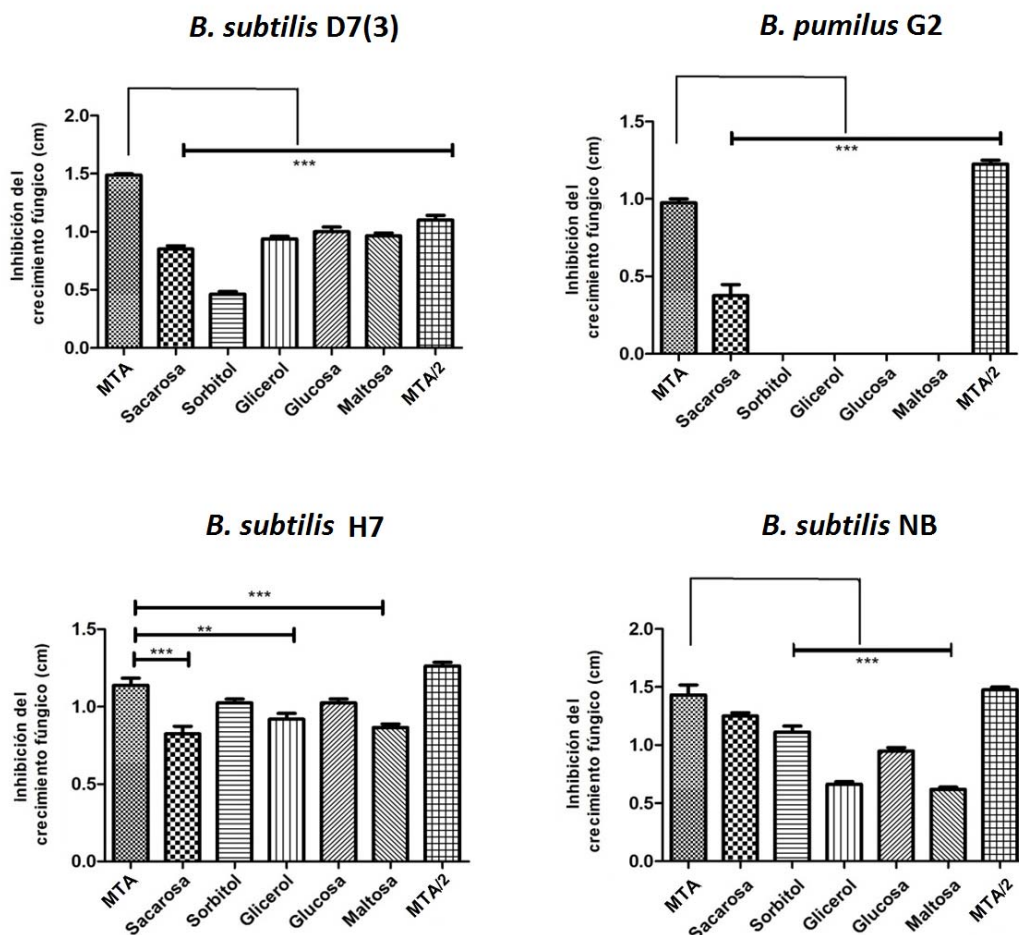
### **5.2.1 Bioensayos de enfrentamiento *in vitro***

Para cumplir con este objetivo, se realizaron bioensayos de enfrentamiento *in vitro* entre el hongo *B. cinerea* 149 y cada una de las bacterias por separado. En el centro de cada placa Petri se inoculó *B. cinerea* 149 en crecimiento activo y en los cuatro extremos de la placa se inoculó la bacteria. Estos bioensayos se realizaron bajo distintas condiciones de fuente de carbono, pH y temperatura, con el fin de determinar las condiciones óptimas para la producción de los compuestos antifúngicos y así obtener una mejor eficiencia para la extracción de estos.

#### **5.2.1.1 Variación de la fuente de carbono**

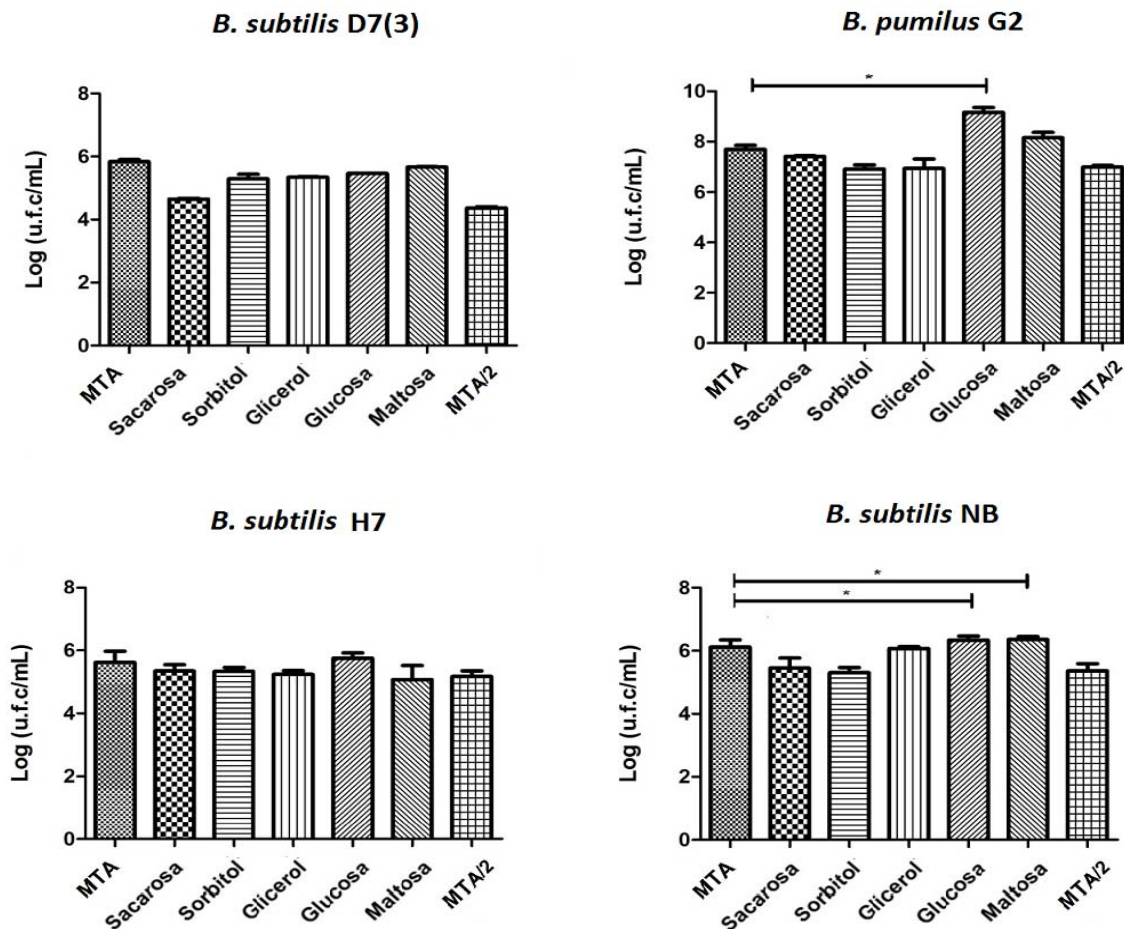
Los bioensayos se realizaron en el medio MTA y para determinar el efecto de la fuente de carbono sobre la producción de moléculas con capacidad antifúngica, se utilizó medio MTA suplementado con sacarosa, sorbitol, glicerol, glucosa y maltosa. Sumado a lo anterior, para determinar si la concentración de los nutrientes tenía algún efecto en la secreción de moléculas antifúngicas, se utilizó el medio MTA con la mitad de la concentración de sus componentes, el que se denominó MTA/2. En la figura 17A, se muestran los resultados de inhibición del crecimiento fúngico por *B. subtilis* D7(3) y se puede observar que al utilizar el medio MTA, se obtuvo la mayor inhibición del crecimiento del hongo, mientras que cuando se le adicionó cualquier fuente de carbono o se disminuyó la cantidad de los componentes del medio (MTA/2), se observó una disminución estadísticamente significativa de la inhibición del crecimiento fúngico. En la figura 17B, para el caso de *B. pumilus* G2, se observó una disminución drástica en su potencial antifúngico, cuando el medio MTA se suplementó con alguna fuente de carbono, mientras que al utilizar el medio MTA/2 se observó un aumento significativo en la inhibición del crecimiento del hongo. Para *B. subtilis* H7, los cambios producidos por la utilización de las distintas fuentes de carbono en la inhibición del hongo, no fueron tan drásticos como con las bacterias anteriores, ya que sólo presentó diferencias significativas con sacarosa, glicina y maltosa (figura 17C). Por último, para *B. subtilis* NB (figura 17D) la inhibición del crecimiento del hongo utilizando el medio MTA, sólo presentó diferencias significativas cuando se suplementó con sorbitol, glicerol, glucosa y maltosa. A pesar que con algunas fuentes de carbono se observó el mismo

grado de inhibición del crecimiento fúngico que con el medio MTA, en ninguno de los medios suplementados con distintas fuentes de carbono se obtuvo un mayor grado de antagonismo.



**Figura 17. Influencia de la fuente de carbono sobre la inhibición del crecimiento de *B. cinerea* 149 enfrentado a distintas cepas bacterianas.** Cepas bacterianas utilizadas: *B. subtilis* D7 (3), *B. pumilus* G2, *B. subtilis* H7 y *B. subtilis* NB. Los asteriscos señalan la significación estadística de las diferencias observadas entre los medios ( $p < 0.05$ ).

Para determinar la influencia que podría tener la variación de la fuente de carbono en el crecimiento bacteriano se cuantificaron unidades formadoras de colonias (U.F.C) de cada bacteria. Los resultados revelaron que el crecimiento bacteriano es relativamente similar en todos los medios ensayados (figura 18). Sin embargo, se observó que *B. pumilus* G2 posee un mayor crecimiento cuando el medio es suplementado con glucosa (figura 18B), mientras que *B. subtilis* NB presenta un mayor crecimiento cuando el medio es suplementado con glucosa o maltosa (figura 18D).



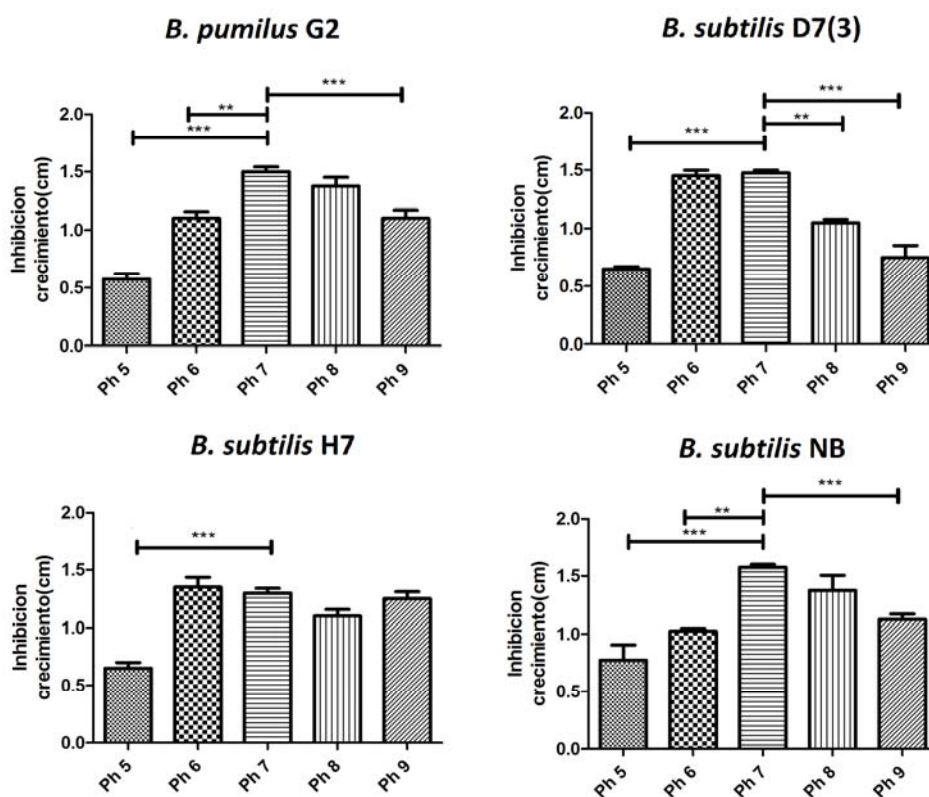
**Figura 18. Influencia de la variación de la fuente de carbono sobre el crecimiento bacteriano.** Cepas bacterianas utilizadas: *B. subtilis* D7, *B. pumilus* G2, *B. subtilis* H7 y *B. subtilis* NB. Los asteriscos señalan la significación estadística de las diferencias observadas entre los medios de cultivo ( $p < 0.05$ ).

### 5.2.1.2 Variación del pH

Para determinar si el pH del medio de cultivo afectaba la actividad antifúngica de las bacterias, se realizaron bioensayos en medio MTA en un rango de pH de 5 a 9. Los resultados revelaron que los bioensayos realizados con *B. pumilus* G2 a pH muy ácido o muy básico, disminuyó notablemente la inhibición del crecimiento fúngico (figura 19A). En los ensayos realizados a pH 6 y 7, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el potencial inhibitorio de la bacteria, aunque el mayor valor se encontró cuando se utilizó el medio ajustado a pH 7.

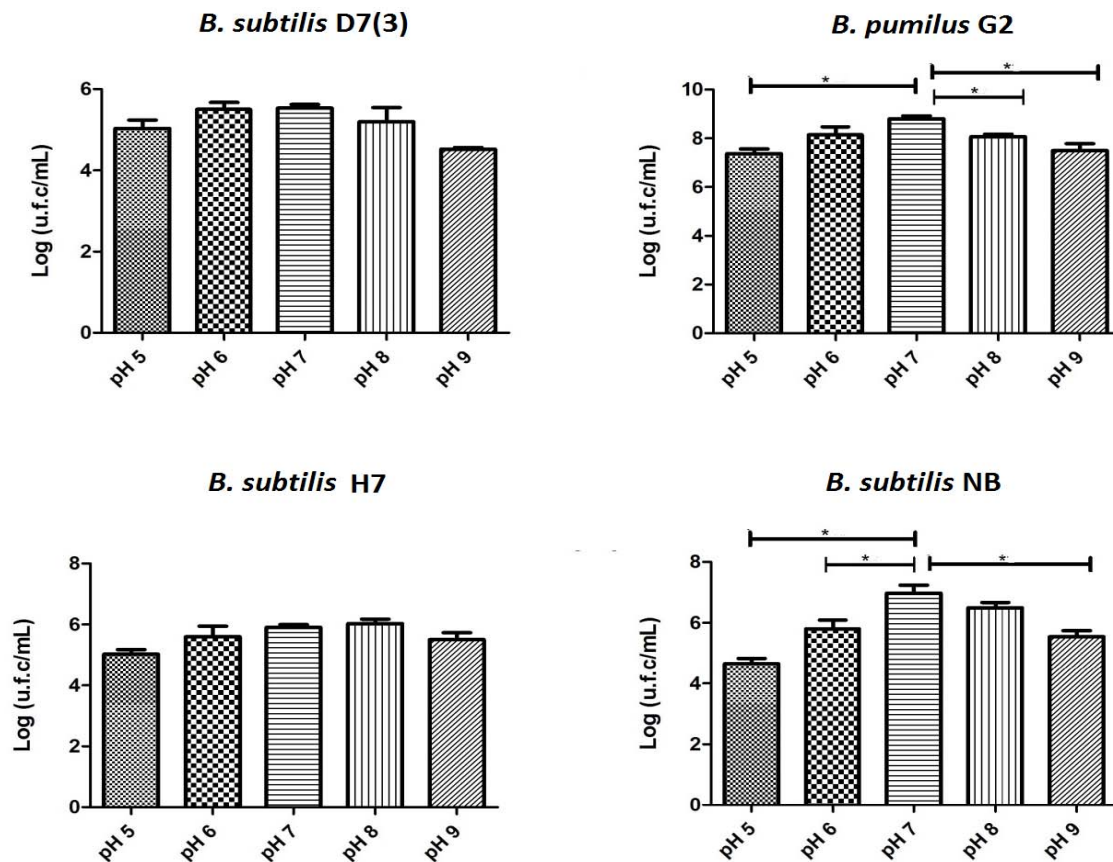
Los bioensayos realizados con *B. subtilis* D7(3), revelaron que existe una clara disminución del efecto antagonico a pH 5, existiendo diferencias significativas con los resultados de los ensayos

realizados entre pH 6 a 9 (figura 19B). Coincidente con los resultados obtenidos con *B. pumilus* G2, el mayor efecto antifúngico se obtuvo a pH 7 (figura 19B). La actividad antifúngica de *B. subtilis* H7 disminuyó cuando se utilizó medio de cultivo ajustado a pH 5, no existiendo diferencias significativas en la actividad antifúngica en los medios ajustados desde pH 6 a 9 (figura 19C). Por último, los resultados obtenidos con *B. subtilis* NB (figura 19D), revelaron que al aumentar el pH hasta 7, aumenta la inhibición del crecimiento fúngico, existiendo diferencias significativas entre estos valores de pH y que mientras el medio de cultivo se alcaliniza, disminuye nuevamente el grado de antagonismo, aunque solamente entre los pH 7 y 8 no se observaron diferencias estadísticamente significativas.



**Figura 19. Influencia del pH sobre la inhibición del crecimiento de *B. cinerea* 149 enfrentado a distintas cepas bacterianas.** Cepas bacterianas utilizadas: (A) *B. pumilus* G2, (B) *B. subtilis* D7, (C) *B. subtilis* H7 y (D) *B. subtilis* NB. Los asteriscos señalan la significación estadística de las diferencias observadas entre los medios de cultivo ( $p < 0.05$ ).

Para determinar la influencia que posee la variación del pH en el crecimiento bacteriano se determinó el número de unidades formadoras de colonias (U.F.C) de cada bacteria. Los resultados revelaron que las bacterias adoptan un comportamiento similar, donde el crecimiento bacteriano aumenta a medida que el pH se acerca a 7 y disminuye a medida que se alcaliniza el medio (figura 20).



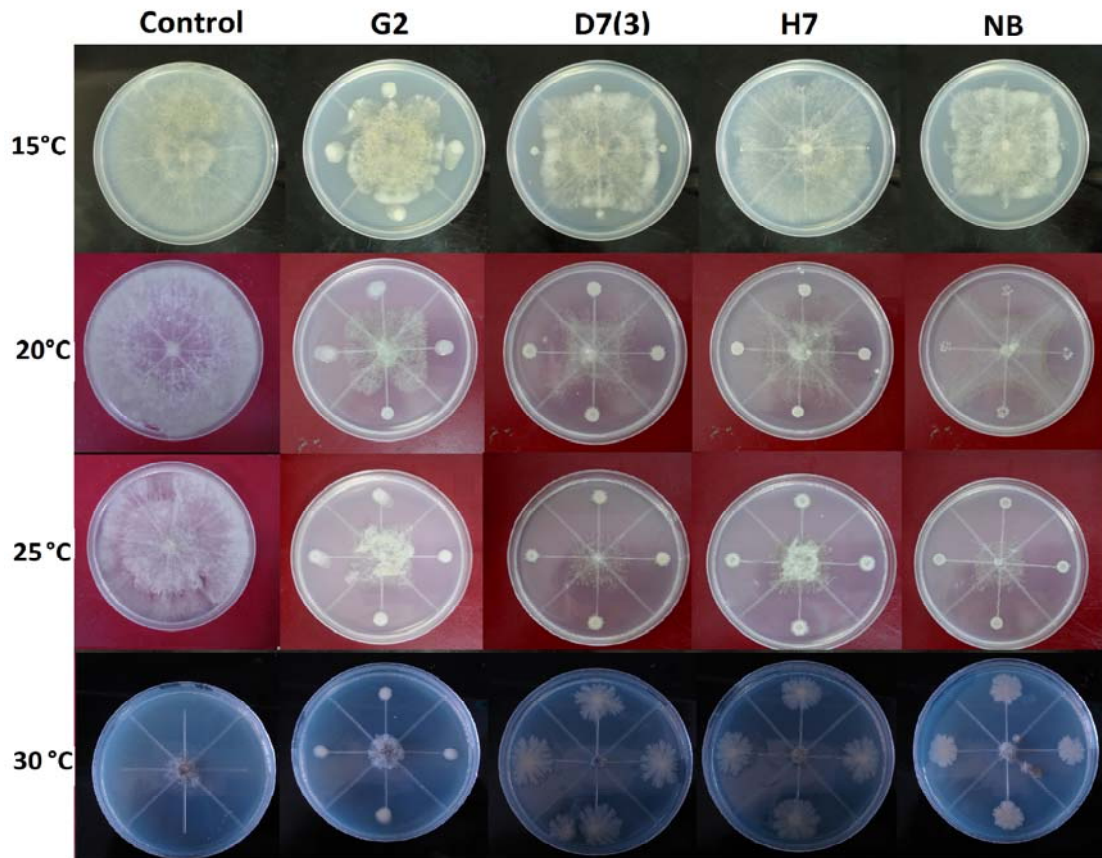
**Figura 20. Influencia del pH sobre el crecimiento bacteriano.** Cepas bacterianas utilizadas: *B. subtilis* D7, *B. pumilus* G2, *B. subtilis* H7 y *B. subtilis* NB. Los asteriscos señalan la significación estadística de las diferencias observadas entre los medios de cultivo ( $p < 0.05$ ).

### 5.2.1.3 Variación de Temperatura

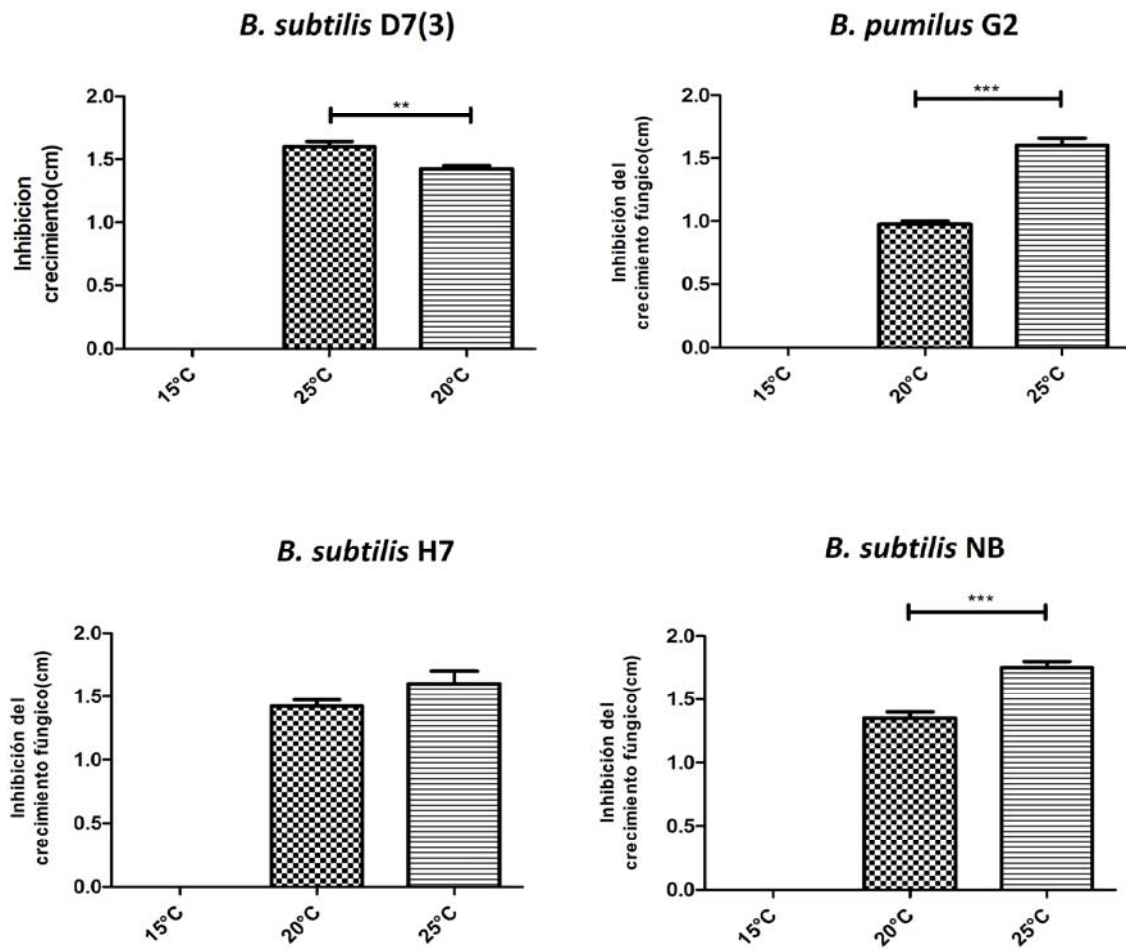
Para determinar el efecto de la temperatura sobre la producción de moléculas antifúngicas, se realizaron bioensayos en medio MTA a 15°C, 20°C, 25°C y 30°C. Se realizó un análisis estadístico ANOVA de una vía con un  $n=4$ .

Al realizar los ensayos a 15°C no se observó efecto inhibitorio por ninguna de las cuatro cepas bacterianas sobre el crecimiento del micelio fúngico, mientras que a 30 °C se observó que *B. cinerea* no se desarrolla a esta temperatura (figura 21). En el caso de los ensayos a 20 y 25 °C, se observó una mayor inhibición en el crecimiento a los 25°C (figura 21), obteniéndose diferencias significativas en la inhibición del crecimiento por las cepas bacterianas D7(3), H7 y NB, entre ambas

temperaturas (figura 22). A partir de este punto, se descartó *B. subtilis* H7 para los experimentos posteriores, debido a que fue la cepa bacteriana que presentó menor actividad antifúngica en los bioensayos previos (figuras 21 y 22).

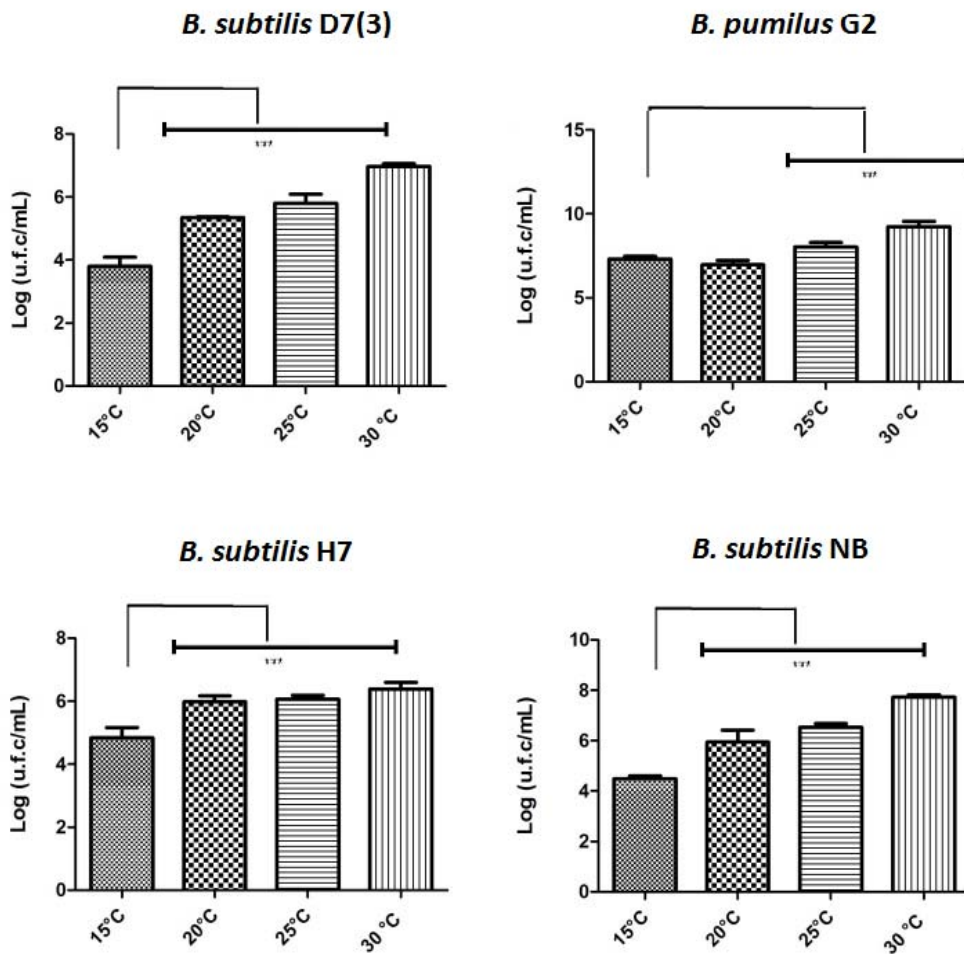


**Figura 21. Bioensayos de enfrentamiento entre *B. cinerea* 149 y las cepas bacterianas, realizados a distintas temperaturas** Los ensayos se realizaron a 15°C, 20°C, 25°C y 30°C entre *B. cinerea* 149 y las siguientes bacterias: *B. pumilus* G2, *B. subtilis* D7, *B. subtilis* H7, *B. subtilis* NB. Control, *B. cinerea* 149 incubada en el medio MTA.



**Figura 22. Influencia de la temperatura en la inhibición del crecimiento de *B. cinerea* 149 enfrentada con distintas cepas bacterianas.** Cepas bacterianas utilizadas: *B. subtilis* D7, *B. pumilus* G2, *B. subtilis* H7 y *B. subtilis* NB. Los asteriscos señalan la significación estadística de las diferencias observadas entre los medios de cultivo ( $p < 0.05$ ).

Para determinar la influencia que posee la variación de temperatura en el crecimiento bacteriano se determinó el número de unidades formadoras de colonias (U.C.F) de cada bacteria. Los resultados revelaron que aumenta el crecimiento bacteriano a medida que asciende la temperatura, en el rango de temperaturas ensayadas (figura 23).



**Figura 23. Influencia de la temperatura en el crecimiento de las cepas bacterianas.** Cepas bacterianas utilizadas: *B. subtilis* D7, *B. pumilus* G2, *B. subtilis* H7 y *B. subtilis* NB. Los asteriscos señalan la significación estadística de las diferencias observadas entre los medios de cultivo ( $p < 0.05$ ).

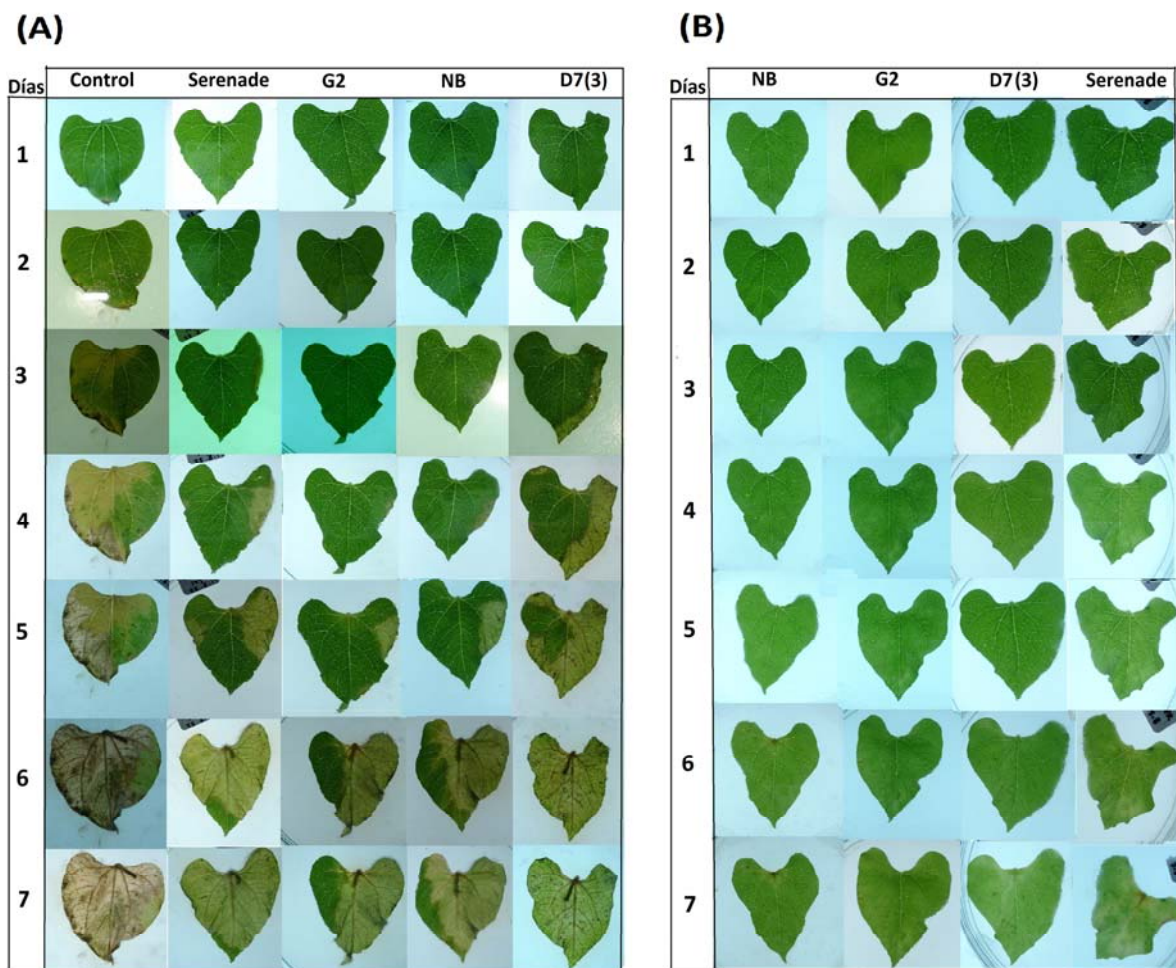
A partir de los resultados obtenidos en los bioensayos de enfrentamiento *in vitro* se pudo observar que las condiciones óptimas para la secreción de moléculas antifúngicas por las cepas bacterianas fueron: i) medio MTA, ii) pH 7 y iii) temperatura de incubación 25°C. En estas condiciones se logra extraer mayor cantidad de compuestos antifúngicos, lo que facilita su identificación y posterior análisis.



## 5.2.2 Bioensayos *in vivo*

### 5.2.2.1 Bioensayos en tejido vegetal

Para visualizar el efecto inhibitorio en tejido vegetal, se realizaron bioensayos *in vivo* sobre hojas y frutos. En el primer caso, los bioensayos se realizaron en hojas de plantas de porotos (*Phaseolus vulgaris* L) que se incubaron a 20°C por 7 días obteniéndose registros fotográficos cada 24 h (Cotorás *et al.*, 2004). Se utilizó como control positivo *B. subtilis* QST713, correspondiente al principio activo del producto comercial Serenade.

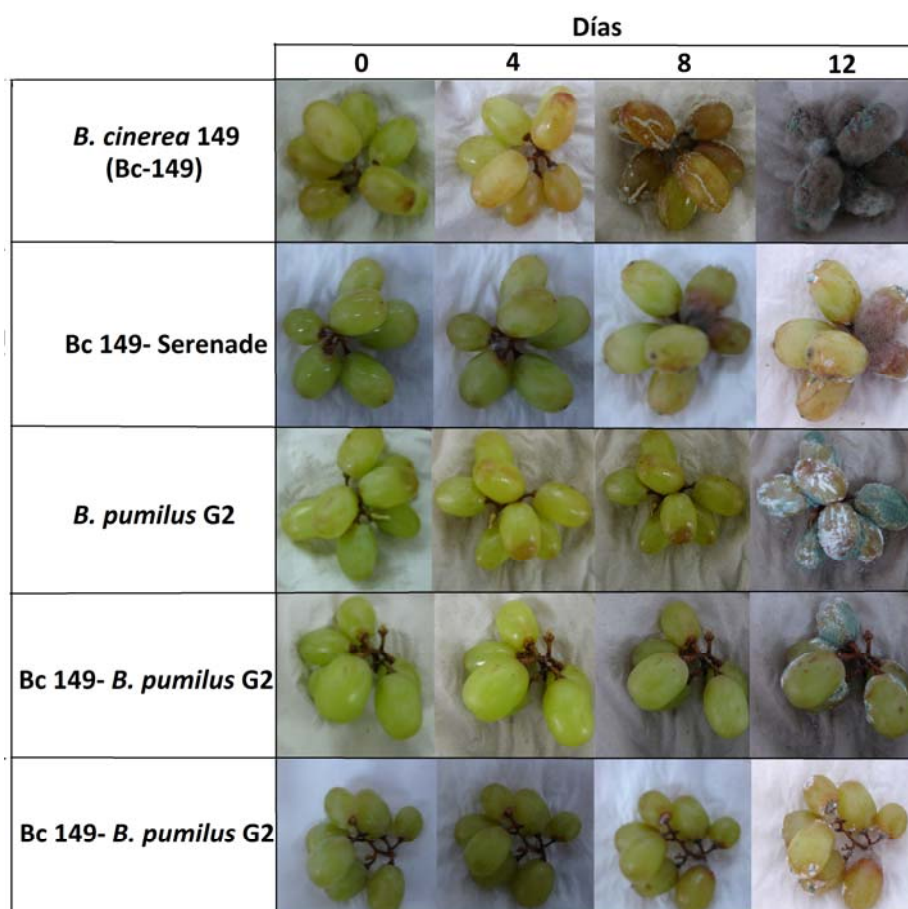


**Figura 24. Bioensayos de protección *in vivo* del ataque de *B.cinerea* 149 sobre hojas de plantas de poroto.** (A) hojas inoculadas con *B. cinerea* 149 y las siguientes bacterias: *B. subtilis* QST713 (Serenade), *B. pumilus* G2, *B. subtilis* NB y *B. subtilis* D7(3). Control, hojas inoculadas con *B. cinerea* 149 y H<sub>2</sub>O. (B) Hojas inoculadas con las siguientes bacterias: *B. subtilis* NB, *B. pumilus* G2, *B. subtilis* D7(3) y *B. subtilis* QST 713 (Serenade). Los números indican los días de incubación.

De las cuatro cepas bacterianas aisladas en nuestro laboratorio, se observó que *B. subtilis* NB y *B. pumilus* G2 poseían una mayor capacidad protectora que Serenade frente al ataque de *B. cinerea* 149, (figura 24A). Debido a que en las hojas inoculadas con estas bacterias la infección del hongo comienza en el quinto día de incubación, mientras que en las hojas inoculadas con Serenade la infección comienza en el cuarto día de incubación. Además, en el último día de incubación, el tejido inoculado con Serenade está prácticamente un 100% contaminado mientras que, *B. subtilis* NB y *B. pumilus* G2 aún son capaces de proteger parte del tejido, siendo *B. pumilus* G2 la que otorga una mayor protección (figura 24A). En el caso de *B. subtilis* D7(3) se observó que la infección comienza en el tercer día de incubación y su efecto protector fue menor que Serenade por lo tanto, *B. subtilis* D7(3) se descartó para los próximos análisis (figura 24A). En los controles sin aplicación de esporas fúngicas, se observó que las bacterias no produjeron ningún tipo de alteración en el tejido vegetal durante los 7 días de incubación (figura 24B).

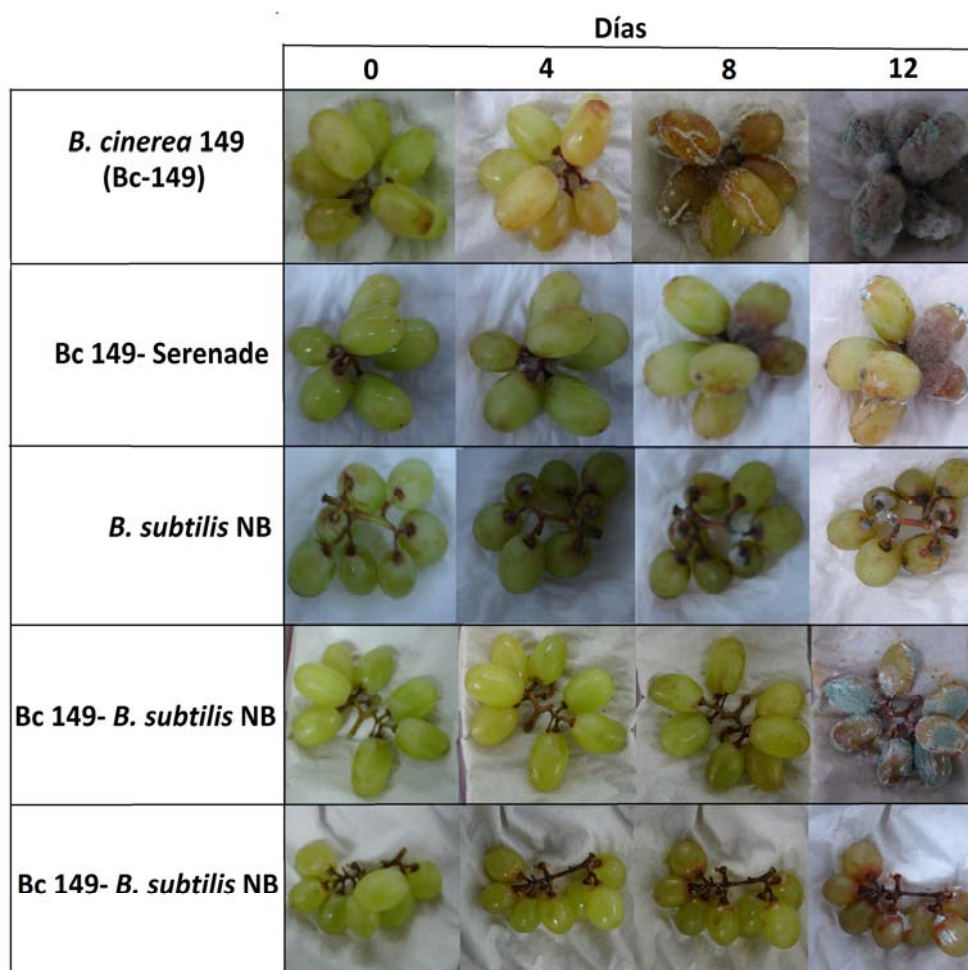
#### **5.2.2.2 Bioensayos en bayas de uva de mesa**

Se realizaron bioensayos *in vivo* en bayas de la variedad Thompson seedless durante 12 días. Estos bioensayos revelaron que después de 8 días comienza la aparición de micelio fúngico en las frutas tratadas sólo con *B. cinerea* 149 (figura 25, fila 1). En racimos tratados con Serenade, la aparición de signos de la infección se observó a los 12 días de incubación (figura 25, filas 4 y 5). Mientras que, en racimos tratados con *B. pumilus* G2, no se observó la aparición de *B. cinerea* durante todo el período de incubación, presentando una mayor eficacia que Serenade (figura 25, fila 4). Sin embargo, *B. pumilus* G2 no fue capaz de proteger al fruto de la infección por otros hongos, como *Penicillium sp.*, a diferencia de los racimos tratados con Serenade en los que no se observa infección por otros hongos (figura 25 fila 2).



**Figura 25. Bioensayos de protección *in vivo* al ataque de *B. cinerea* 149 sobre racimos de la variedad Thompson seedless utilizando *B. pumilus* G2.** Las filas representan los distintos tratamientos aplicados a las bayas y las columnas representan el número de días de incubación a 20°C.

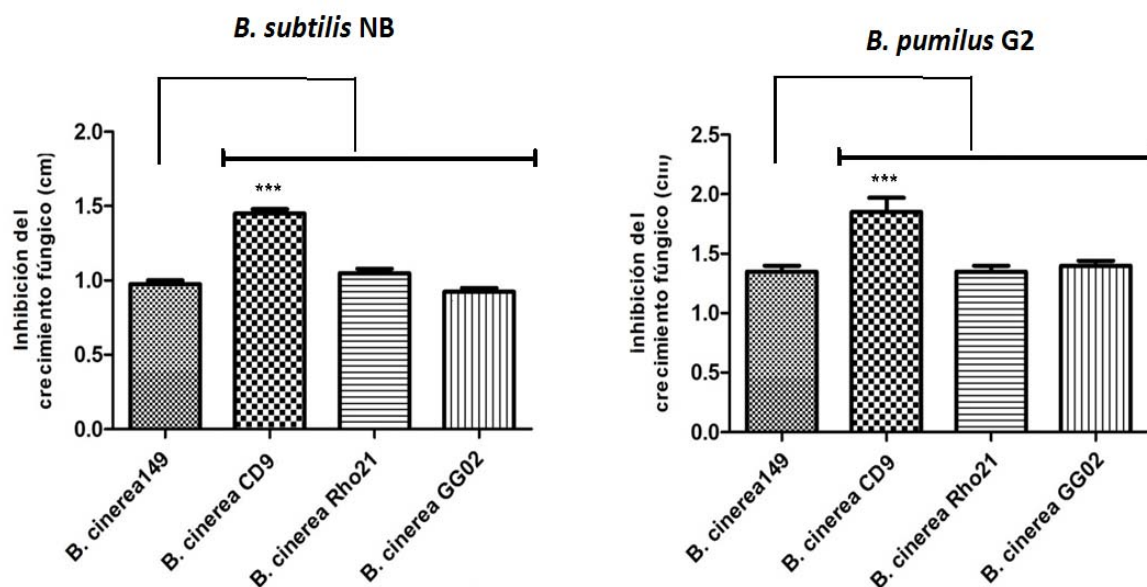
En el caso de los tratamientos con *B. subtilis* NB se observó un buen efecto protector de magnitud similar al obtenido con *B. pumilus* G2, (figura 26, filas 4 y 5). Al igual que en el caso anterior, el efecto protector fue mayor que el obtenido con Serenade (figura 26, fila 2). Como se observa en la figura 26, con Serenade al día 8 comienzan a aparecer signos de la infección, mientras que con *B. subtilis* NB no se observó la aparición de *B. cinerea* durante todo el período de incubación (figura 26, filas 4 y 5). Finalmente, y al igual que en el caso anterior, no se visualizaron alteraciones producidas sólo por las cepas bacterianas sobre el tejido vegetal (figura 26, fila 3), pero se pudo observar la aparición de otro hongo, posiblemente *Penicillium sp.*, sólo en las bayas que se inocularon con *B. subtilis* NB.



**Figura 26. Bioensayos de protección *in vivo* al ataque de *B. cinerea* 149 sobre racimos de la variedad Thompson seedless utilizando *B. subtilis* NB.** Las filas representan los distintos tratamientos aplicados a las bayas y las columnas representan el número de días de incubación a 20°C.

### 5.2.3 Actividad antifúngica de las bacterias frente a distintas cepas de *B. cinerea*

Todos los bioensayos *in vitro* e *in vivo* se realizaron con la cepa *B. cinerea* 149 debido a que es la cepa más virulenta que se encuentra disponible en el laboratorio. Por lo tanto, para observar la actividad antifúngica que poseen las bacterias *B. subtilis* NB y *B. pumilus* G2 frente a la acción de otras cepas de *B. cinerea*, se realizaron bioensayos de enfrentamiento con las cepas GG02, Rho21 y CD9. Los resultados revelaron que las bacterias poseen una actividad antifúngica similar contra las cepas 149, GG02 y Rho21; y mayor contra la cepa CD9 (figura 27). Por lo tanto, las bacterias poseen una capacidad inhibitoria de amplio rango contra distintas cepas de *B. cinerea* (figura 27).

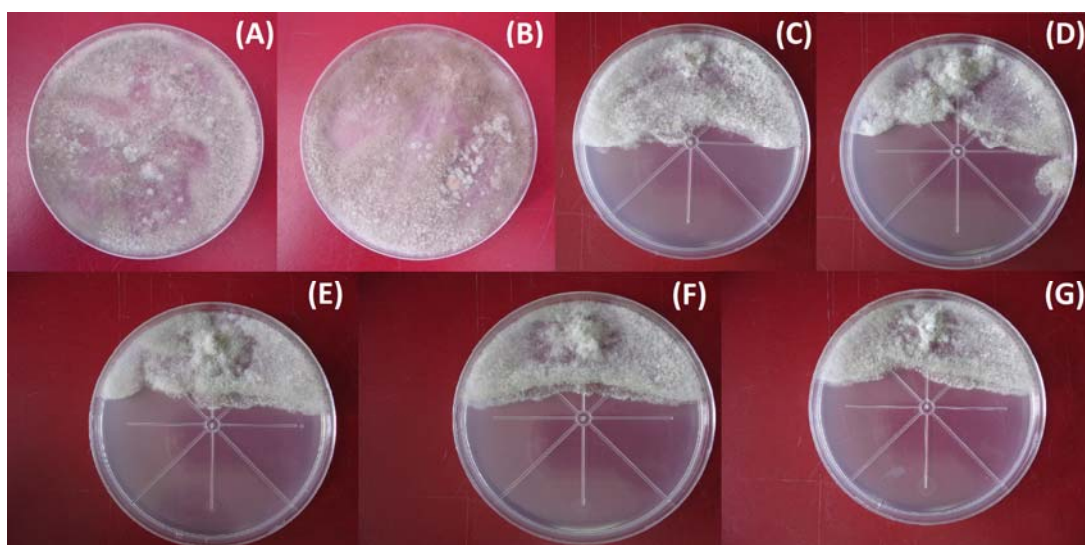


**Figura 27.** Efecto de la acción inhibitoria de los biocontroladores sobre distintas cepas de *B. cinerea*. Cepas bacterianas utilizadas: *B. subtilis* NB y *B. pumilus* G2

### 5.3 Identificación de compuestos químicos con capacidad antifúngica secretados por las cepas bacterianas *B. subtilis* NB y *B. pumilus* G2.

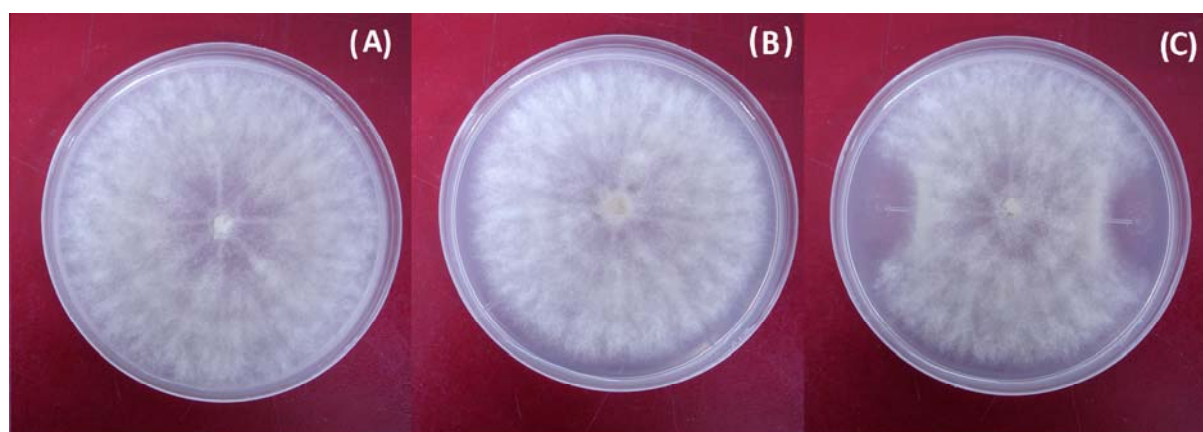
#### 5.3.1 Extracción de compuestos antifúngicos

El aislamiento de moléculas con actividad antifúngica secretadas por las cepas bacterianas *B. pumilus* G2 y *B. subtilis* NB, se realizó por extracción clorofórmica del medio sólido y la solución orgánica obtenida se concentró a sequedad por evaporación en un rotavapor (Dandurishvili *et al*, 2010). Se obtuvo 0,11 g y 0,06 g del producto seco para *B. pumilus* G2 y *B. subtilis* NB, respectivamente, los que se resuspendieron en 100  $\mu$ L de cloroformo: hexano (1:1). Finalmente, se realizaron ensayos de inhibición del crecimiento de *B. cinerea* en medio agar papa-dextrosa suplementado con ampicilina (100  $\mu$ g/mL). En la figura 28 se puede observar que las moléculas extracelulares de *B. pumilus* G2 poseen una alta capacidad inhibitoria contra *B. cinerea* y que al disminuir el volumen del extracto agregado al ensayo, este mantiene su capacidad inhibitoria. Sin embargo, con el extracto clorofórmico de *B. subtilis* NB no se observó un efecto inhibitorio frente a *B. cinerea*.



**Figura 28. Ensayos de actividad antifúngica de moléculas extracelulares de *B. pumilus* G2 contra *B. cinerea* 149. (A) cloroformo:hexano (1:1), (B) H<sub>2</sub>O y distintos volúmenes del extracto de *B. pumilus* G2 disuelto en cloroformo:hexano, (C) 1 µL, (D) 3 µL, (E) 5 µL, (F) 7 µL y (G) 10 µL.**

Debido a la baja efectividad que presentó el método de extracción mencionado anteriormente para *B. subtilis* NB, se utilizó un método de extracción con acetato de etilo. Se realizaron ensayos de actividad contra el hongo en medio PDA suplementado con ampicilina (100 µg/mL), en el cual se inoculó *B. cinerea* 149 en el centro de la placa, mientras que en cada extremo de la placa se inocularon 5 µL del extracto. Los resultados revelaron que el extracto orgánico inhibió el crecimiento del hongo y que el acetato de etilo no produce ningún efecto en el desarrollo fúngico (Islam *et al*, 2012) (figura 29).

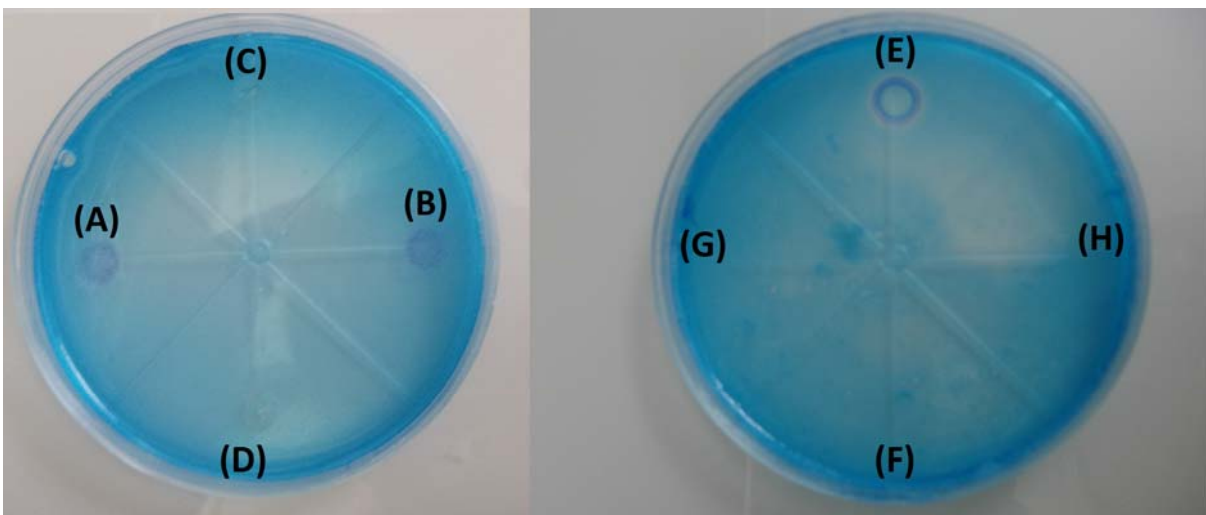


**Figura 29. Ensayos de actividad antifúngica de moléculas extracelulares de *B. subtilis* NB contra *B. cinerea* 149. (A) H<sub>2</sub>O, (B) 5 µL de acetato de etilo y (C) 5 µL de extracto de *B. subtilis* NB.**

## 5.3.2 Identificación preliminar de los compuestos obtenidos por extracción orgánica

### 5.3.2.1 Test agar CTAB-azul de metileno

El test de agar CTAB-azul de metileno permite detectar específicamente los biosurfactantes aniónicos, aun cuando puede ser utilizado para la detección de otros glicolípidos producidos por microorganismos. Se basa en la capacidad de los tensoactivos aniónicos biológicos (biosurfactantes) para formar un par iónico insoluble con el tensoactivo catiónico CTAB, que se puede visualizar mediante la formación de un halo azul oscuro debido a la presencia del colorante azul de metileno (figura 30) (Siegumud and Wagner, 1991).

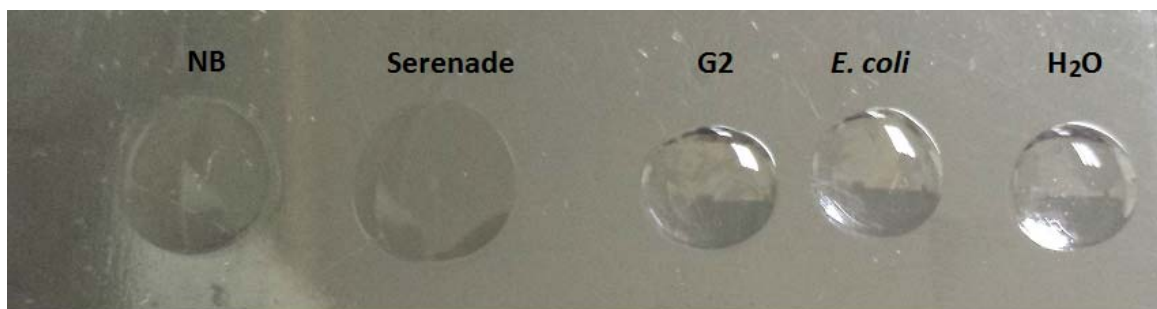


**Figura 30. Ensayos en agar CTAB para detectar la presencia de biosurfactantes.** (A) y (B) extracto de *B. subtilis* NB disuelto en diclorometano; (C) y (D) extracto de *B. pumilus* G2 disuelto en cloroformo: hexano ; (E) SDS al 1%, (F) H<sub>2</sub>O, (G) cloroformo:hexano y (H) acetato de etilo.

Se utilizó el tensoactivo aniónico SDS al 1% (p/v) como control positivo, mientras que como control negativo se utilizó cloroformo: hexano, acetato de etilo y H<sub>2</sub>O. Se observó que el extracto de la cepa *B. subtilis* NB forma un halo azul oscuro, lo que indicaría la presencia de biosurfactantes, resultado que no se observa con *B. pumilus* G2, indicando que el extracto no posee biosurfactantes o que se encuentran en muy baja concentración.

### 5.3.2.2 Test “drop collapsing”

Este ensayo cualitativo permite detectar compuestos con actividad surfactante en una solución y se basa en la capacidad que poseen este tipo de moléculas de disminuir las fuerzas de repulsión existentes entre fases hidrofóbicas e hidrofílicas, permitiendo que una gota de una solución hidrofóbica se mezcle con una gota de una solución hidrofílica, lo que se puede observar cuando la estructura de la gota de agua colapsa debido a la presencia de compuestos anfílicos en el cultivo.



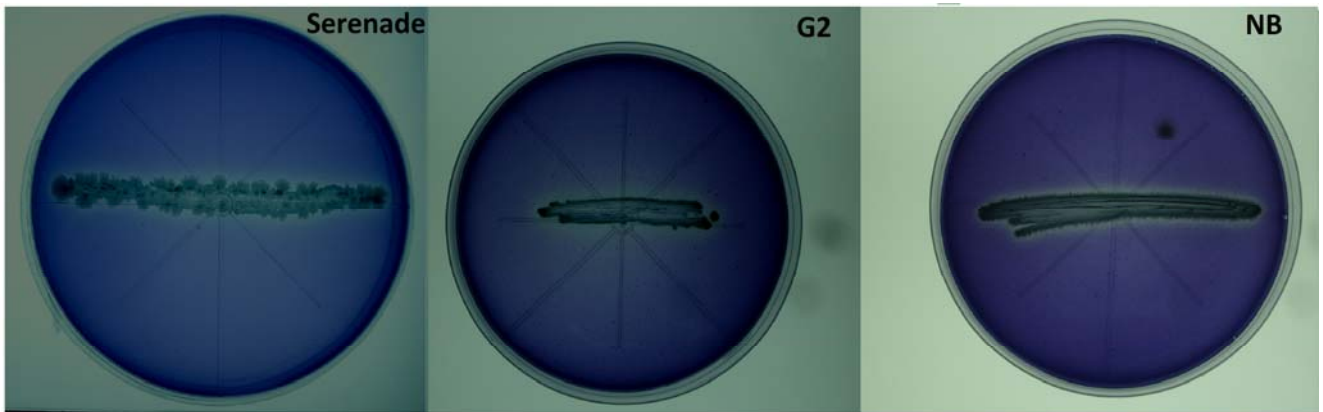
**Figura 31.** Test "drop collapsing" realizado con los sobrenadantes de cultivos bacterianos. *B. subtilis* NB, Serenade (*B. subtilis* QST 713), *B. pumilus* G2, *Escherichia coli* DH5α y H<sub>2</sub>O.

Se utilizó como control negativo H<sub>2</sub>O y *E. coli*, mientras que como control positivo se utilizó la cepa *B. subtilis* QST 713. Se pudo determinar que *B. subtilis* NB posee biosurfactantes, ya que permiten que la gota de medio líquido interactúe con la superficie hidrofóbica, mientras que con *B. pumilus* G2 la gota permanece intacta y no interactúa con la superficie hidrofóbica, lo que indica que no es capaz de producir biosurfactantes o la cantidad es demasiado baja para ser detectada (figura 31).

### 5.3.2.3 Test agar-quitina

Este medio se utilizó para determinar de forma cualitativa la presencia de la enzima quitinasa, la que ha sido descrita como una de las principales enzimas capaces de atacar el hongo y degradar la quitina de su pared celular. La presencia de la enzima se determinó por la aparición de un halo claro en la periferia de las bacterias, producto de la hidrólisis de la quitina presente en el medio. Como se puede observar en la imagen, las dos bacterias presentan actividad quitinasa, siendo la de *B. subtilis* NB similar a la de *B. subtilis* QST 713 (Serenade) (figura 32).

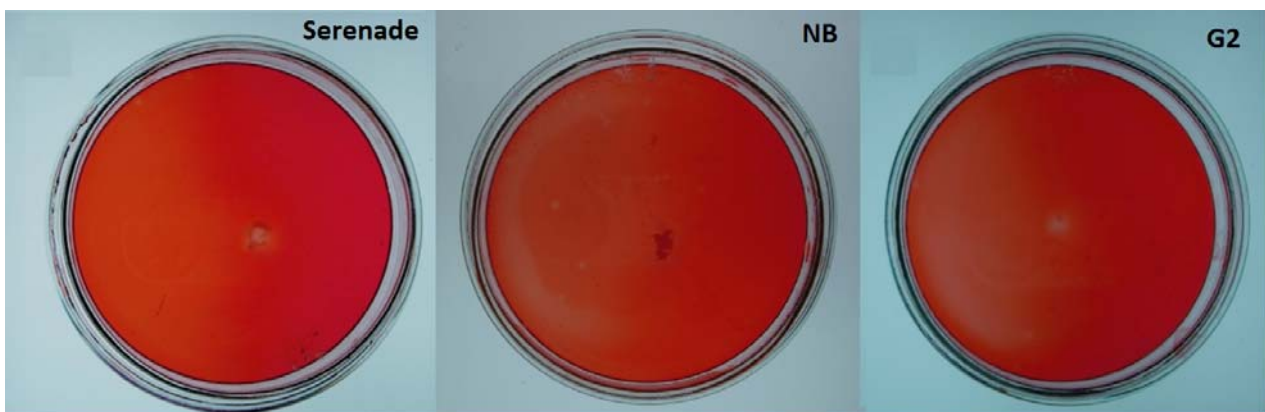




**Figura 32. Test de agar quitina con las cepas bacterianas.** Serenade (*B. subtilis* QST 713), *B. pumilus* G2 y *B. subtilis* NB.

#### 5.3.2.4 Test agar laminarina

Para determinar la presencia de la enzima  $\beta$ -1,3-glucanasa, se utilizó como control positivo serenade en el que se observó la presencia de la enzima mediante la aparición de un halo blanco alrededor del inóculo cuando crece en un medio suplementado con laminarina. Para *B. pumilus* G2 se pudo detectar la presencia de esta enzima (figura 33), sin embargo *B. subtilis* NB no produciría  $\beta$ -1,3-glucanasa, debido a que no se observa un halo blanco alrededor del inóculo.



**Figura 33. Test de agar laminarina con las cepas bacterianas.** *B. subtilis* QST 713 (Serenade), *B. subtilis* NB y *B. pumilus* G2.

### 5.3.2.5 Cromatografía líquida de fase reversa (HPLC)

Se realizó HPLC a los extractos obtenidos a partir de *B. subtilis* NB y *B. pumilus* G2 para investigar la polaridad de las moléculas presentes con el fin de determinar los parámetros y las técnicas a seguir para la identificación estructural de las moléculas antifúngicas. Los extractos orgánicos de *B. subtilis* NB previamente disueltos en acetato de etilo y los de *B. pumilus* G2 disueltos en cloroformo, fueron llevados a sequedad por evaporación y posteriormente se resuspendieron en metanol para evitar problemas de incompatibilidad con la fase móvil.

Para la muestra obtenida a partir de *B. subtilis* NB, se observó que los compuestos son principalmente polares, ya que aparecieron en los primeros 5 min del gradiente, con una fase móvil que contiene mayoritariamente agua (figura 34). A un tiempo de 1,4 min eluyó la mayor cantidad de la muestra, lo que indicaría que si posee distintos tipos de moléculas, ésta posee una polaridad similar. Por otro lado, con la muestra obtenida de *B. pumilus* G2, se obtuvieron resultados muy diferentes, ya que se observó una gran cantidad de compuestos de muy variada polaridad que eluyeron durante los 50 min en que se realizó la cromatografía (figura 35).

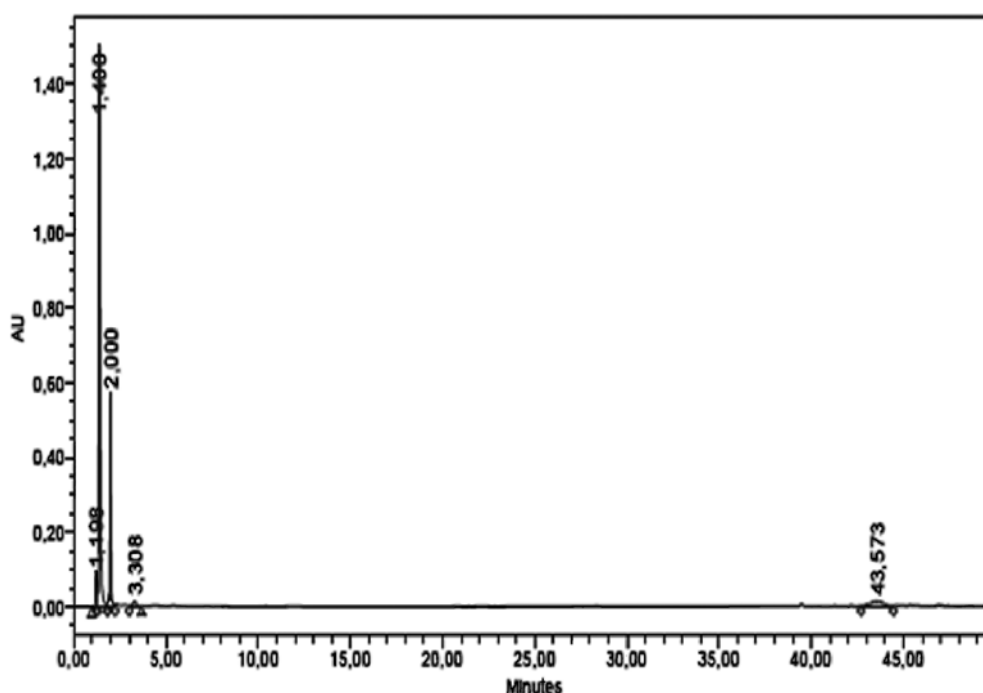


Figura 34. Cromatograma obtenido mediante HPLC del extracto metanólico de *B. subtilis* NB

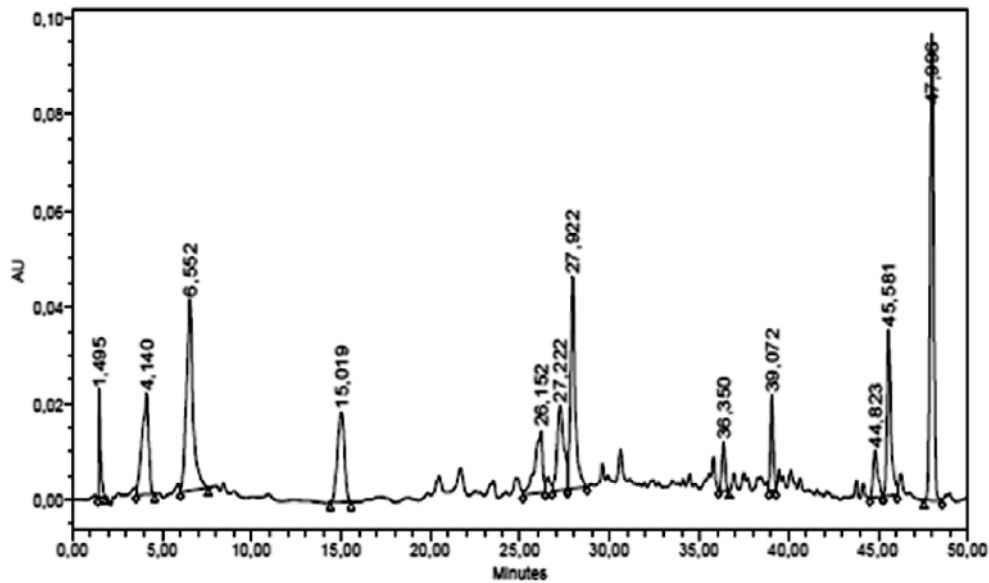


Figura 35. Cromatograma obtenido mediante HPLC del extracto metanólico de *B. pumilus* G2

### 5.3.2.6 Cromatografía en capa fina (TLC)

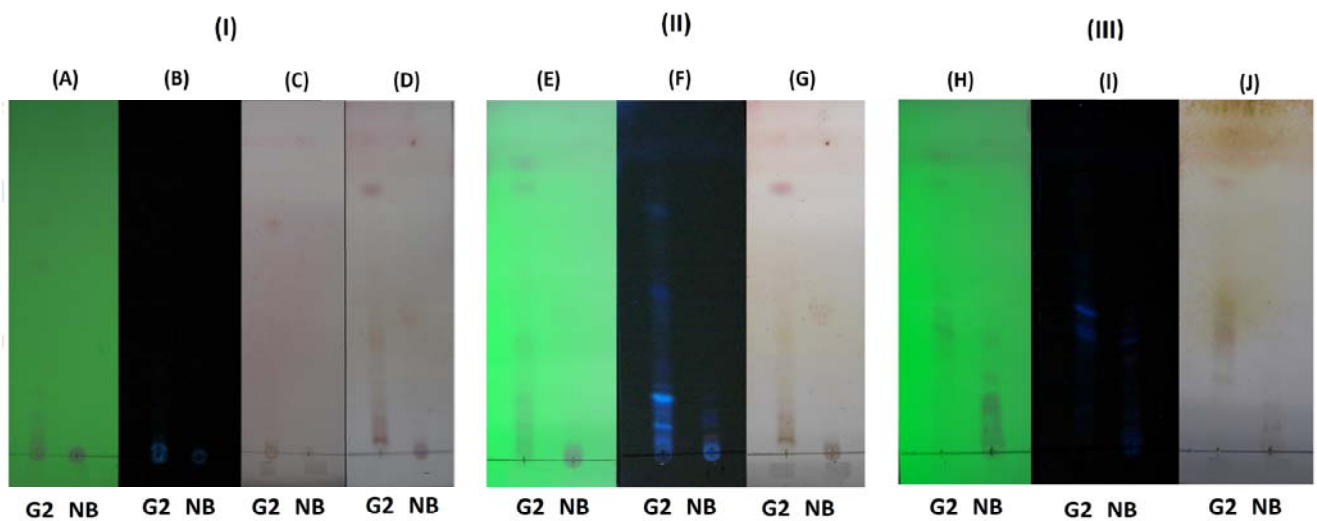
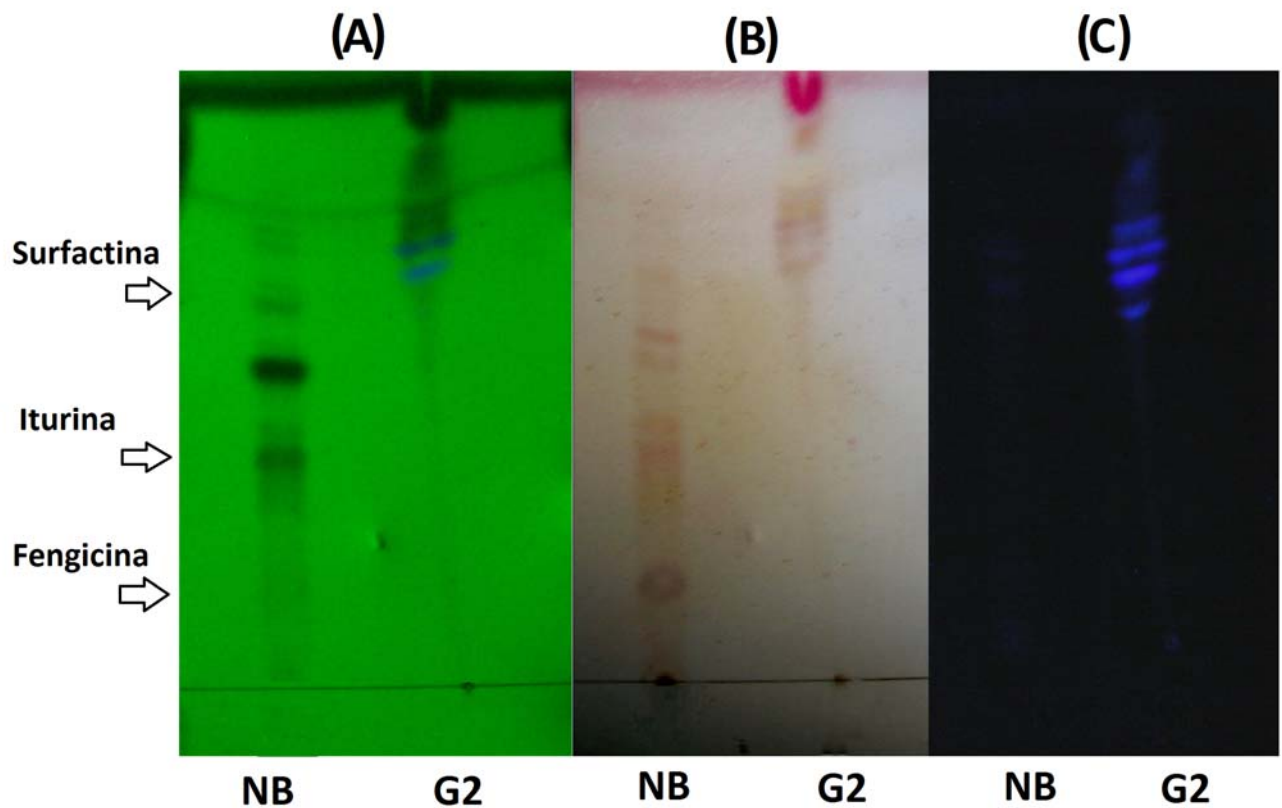


Figura 36. TLC para los extractos metanólicos obtenidos desde cultivos de *B. pumilus* G2 y *B. subtilis* NB. Se utilizaron las siguientes fases móviles (I) diclorometano:metanol = 98:2 (v/v) , (II) diclorometano: metanol = 95:5 (v/v) y (III) diclorometano:metanol = 9:1 (v/v). Las bandas en los cromatogramas se visualizaron con luz UV a 254 nm (A, E y H) y 365 nm (B, F e I). El revelado de las placas cromatográficas se realizó con 4-anisaldehído (D) y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (C, G y J).

Como ya se tenían los antecedentes de los resultados previos de HPLC, que en las muestras obtenidas de ambas bacterias existen compuestos bastante polares, se decidió comenzar la elución de la muestra con el solvente diclorometano:metanol = 98:2 (v/v), condiciones en las cuales la gran mayoría de los compuestos se mantienen cerca del origen de migración (figura 36 I). Cuando se revelaron las placas cromatográficas de ambos extractos con 4-anisaldehído, no se observaron bandas de color violeta características de los compuestos terpenoides (figura 36 I-D). Por lo tanto, se puede deducir que los extractos no poseen moléculas de esta naturaleza.

A medida que se aumentó la polaridad de la fase móvil (diclorometano:metanol = 95:5 y 9:1), se observó una mayor migración de los compuestos más polares (figura 36 II y III). En el caso de *B. subtilis* NB, se determinó que los compuestos que posee el extracto son en su mayoría compuestos con mayor polaridad, ya que comienzan a migrar cuando la fase móvil contiene 5% de metanol (95:5) (figura 36 II) y que al aumentar la concentración de metanol (9:1) en la fase móvil aumenta la migración de los compuestos más polares, aunque existen compuestos que se mantienen en el origen de migración (figura 36 II y III). Mientras que para *B. pumilus* G2 se pudo deducir que posee compuestos con un rango de polaridad más amplio, comparados con los del extractos de *B. subtilis* NB, ya que los compuestos más apolares comienzan a migrar cuando la fase móvil contiene 2% de metanol y al aumentar el porcentaje de metanol se observa la migración de los compuestos más polares (figura 36 I, II y III). Cuando se utilizó como fase móvil diclorometano:metanol=9:1 (v/v), se determinó que en ambos extractos existían compuestos que poseen un Rf similar y que además son capaces de absorber la luz UV, lo que podría ser un indicio de que en ambos extractos se encuentran compuestos de naturaleza química similar (figura 36 III).

Para la búsqueda de lipopéptidos antifúngicos, los extractos orgánicos de *B. subtilis* NB y *B. pumilus* G2 se separaron mediante TLC con una fase móvil de cloroformo: metanol: agua (65:25:4) (figura 37). Los Rf de las bandas obtenidas para cada muestra se compararon con los Rf característicos para cada familia de lipopéptidos (Vágvölgyi *et al*, 2013). La muestra de *B. subtilis* NB se resuelve en bandas con Rf similares a surfactinas, iturinas y fengicinas. Mientras que, para *B. pumilus* G2, sólo se observaron bandas con Rf similares a surfactinas (tabla 11).



**Figura 37.** TLC para identificar lipopéptidos presentes en los extractos metanólicos de las cepas bacterianas *B. subtilis* NB y *B. pumilus* G2. (A) TLC visualizado con luz UV a 254 nm, (B) TLC revelado con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (C) TLC visualizado con luz UV a 375 nm. Las flechas indican las familias de lipopéptidos: Surfactinas, iturinas y fengicinas.

**Tabla 11.** Rf de extractos metanólicos de *B. subtilis* NB y *B. pumilus* G2

	Rf obtenido	Rf referencia	Lipopéptido
<i>B. subtilis</i> NB	0,315	0,32	Iturinas
	0,657	0,65	Surfactinas
	0,12	0,09	Fengicinas
<i>B. pumilus</i> G2	0,642	0,65	Surfactinas

### 5.3.2.7 Espectroscopia infrarroja (IR)

Para obtener el espectro IR, el extracto orgánico de la cepa *B. subtilis* NB previamente disuelto en metanol, fue llevado a sequedad y se resuspendió en el aceite mineral parafínico de alto peso molecular denominado nujol, para evitar la dispersión de la radiación transmitida. El espectro obtenido mostró las señales de absorción del nujol, las que corresponden a los números de onda 2943,76 y 1455,73  $\text{cm}^{-1}$ . Es así que, para el extracto se pudo observar una señal ancha de 3343,76  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde a estiramientos de grupos OH que podrían formar parte de grupos carboxilos y las señales 1662,07 y 1235,04  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponden a grupos aminos, lo que podría indicar la presencia de estructuras aminoácidas (figura 38A y tabla 12) (Gaussier *et al*, 2003; Barth, 2007).

Para la obtención del espectro IR a partir del extracto de *B. pumilus* G2, la muestra previamente disuelta en metanol, se llevó a sequedad y se resuspendió en cloroformo, luego se cargó sobre la gradilla de medición y se dejó secar por evaporación. El análisis del espectro resultante (figura 39B y tabla 12), reveló que la muestra no posee un patrón predominante de algún tipo de molécula en particular, como ocurrió con el extracto de *B. subtilis* NB. En el espectro de *B. pumilus* G2 se observaron señales de estiramiento de grupos OH (3222,04  $\text{cm}^{-1}$ ), estiramiento de grupos C=O (1670,56  $\text{cm}^{-1}$ ) y flexión de grupos N-H (1295  $\text{cm}^{-1}$ ) que podrían corresponder a compuestos de naturaleza aminoácida. Adicionalmente, se observaron señales de deformación de grupos C-H (752,75  $\text{cm}^{-1}$ ) que podrían corresponder a compuestos aromáticos y oscilaciones de grupos CH<sub>3</sub> (2961,11  $\text{cm}^{-1}$ ) que podrían corresponder a compuestos alifáticos.

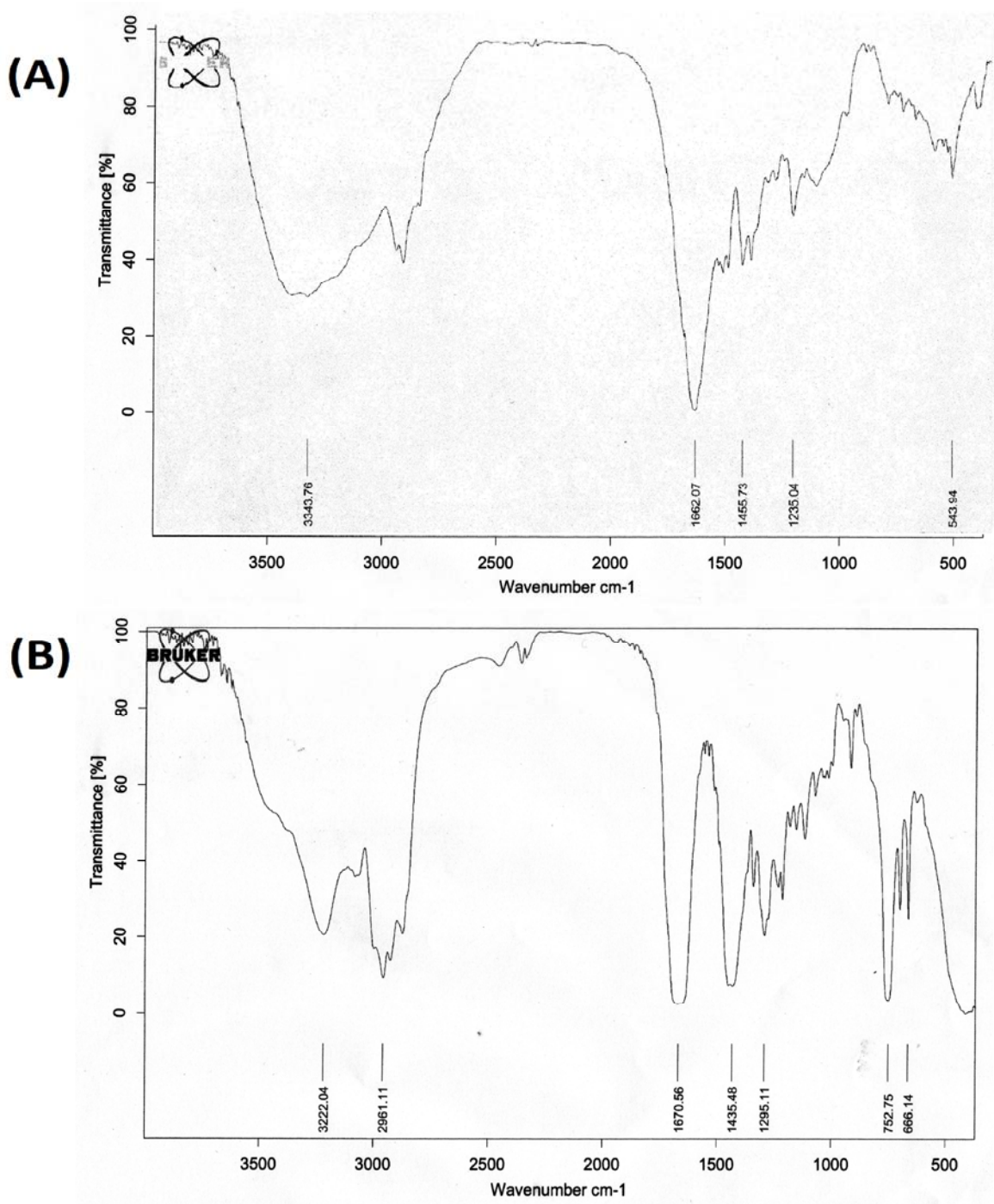


Figura 38. Espectro infrarrojo de los extractos orgánicos obtenidos de las cepas bacterianas. (A) *B. subtilis* NB y (B) *B. pumilus* G2

**Tabla 12. Asignación de los grupos funcionales a las bandas principales de los espectros IR de los extractos de *B. subtilis* NB y *B. pumilus* G2**

	N° onda (cm <sup>-1</sup> )	Grupo	Referencia
<i>B. subtilis</i> NB	3343,76	Estiramiento de grupos OH	Barth, 2007
	1662,07	Estiramiento de grupos C=O	Barth, 2007
	1235,02	Estiramiento enlace C-N	Barth, 2007
	549,54	Flexión del enlace C=O	Barth, 2007
<i>B. pumilus</i> G2	3222,04	Estiramiento de grupos OH	Barth, 2007
	2961,11	Oscilación de grupos CH <sub>3</sub> terminales	Barth, 2007
	1670,56	Estiramiento de grupos C=O	Barth, 2007
	1295,11	Flexión de grupos N-H	Barth, 2007
	752,75	Deformación de grupos C-H	Barth, 2007

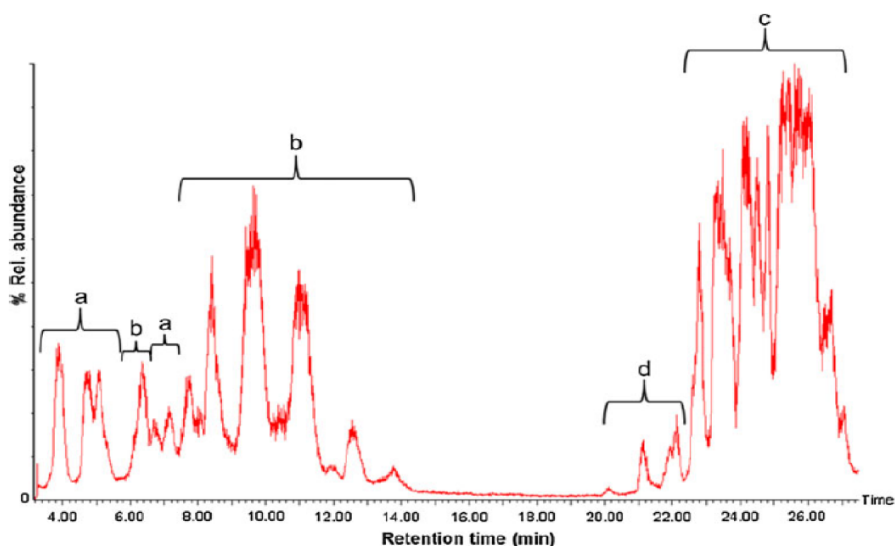


## 5.4 Determinación de la estructura química de moléculas extracelulares con capacidad antifúngica secretadas por las cepas bacterianas

Para identificar los lipopéptidos cíclicos presentes en las muestras, se utilizó la técnica LC-MS/MS, basándose en el patrón de señales reportadas en el análisis LC-MS/MS del extracto metanólico obtenido de *B. subtilis* HC8 descrito por Aeguelles-Arias *et al* (2009) (figura 39).

### 5.4.1 LC-MS/MS modo fullscan

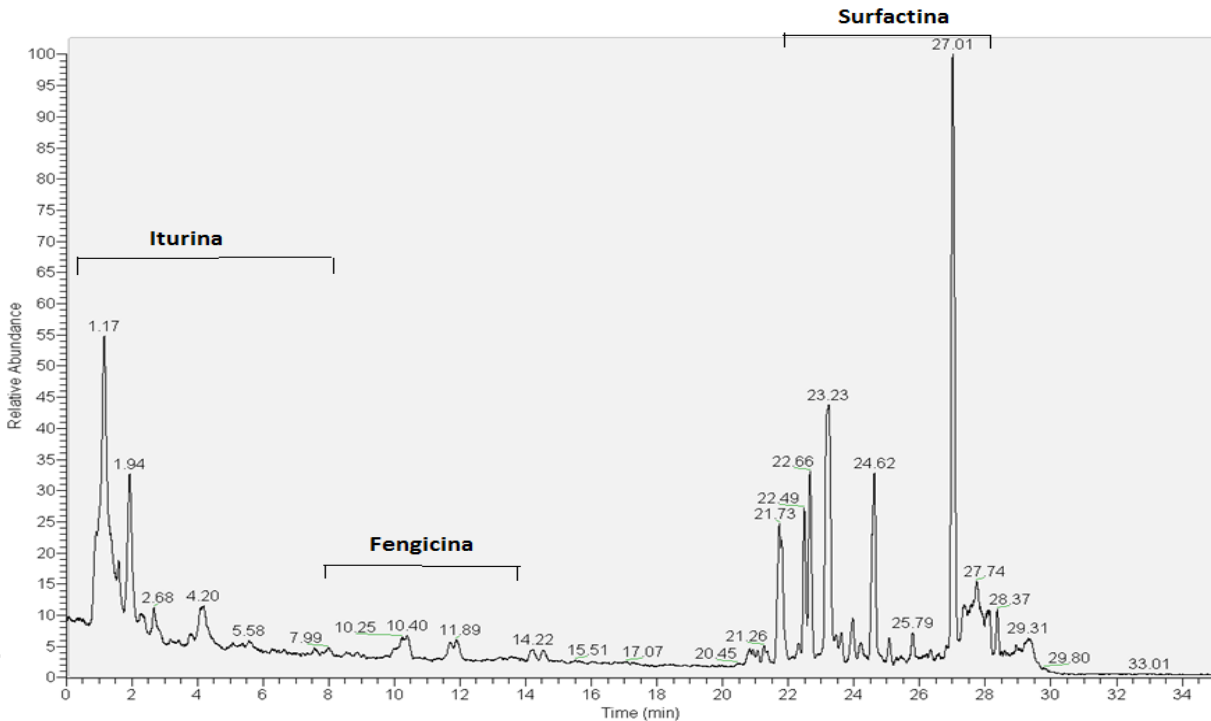
#### 5.4.1.1 LC-MS/MS modo fullscan para la identificación de lipopéptidos presentes en el extracto de *B. subtilis* NB



**Figura 39. Cromatograma obtenido mediante LC-MS/MS para el análisis del extracto crudo disuelto en metanol de *B. subtilis* HC8. a) iturina A; b) fengicina; c) surfactina y d) compuestos desconocidos (Aeguelles-Arias *et al*, 2009).**

Para el análisis de las señales obtenidas por LC-MS/MS se utilizaron los tiempos de retención (RT), comparándolos con los obtenidos en literatura. En el cromatograma obtenido del análisis LC-MS/MS (modo fullscan) para la muestra de *B. subtilis* NB (figura 40), se observaron señales en la zona de retención para las iturinas (RT: 0-8 min) de mediana intensidad, mientras que las correspondientes a las fengicinas (RT: 8-14 min), corresponden a señales de baja intensidad y finalmente para las surfactinas (RT: 22-27 min), se observaron varias señales de alta intensidad. Por lo

tanto, se puede deducir según este análisis que *B. subtilis* NB secreta iturinas, surfactinas y posiblemente fengicinas.



**Figura 40. Cromatograma obtenido mediante LC-MS/MS para el análisis del extracto metanólico de *B. subtilis* NB.** En la figura se indican las regiones donde aparecen las señales para las familias de lipopéptidos: Iturinas, fengicinas y surfactinas.

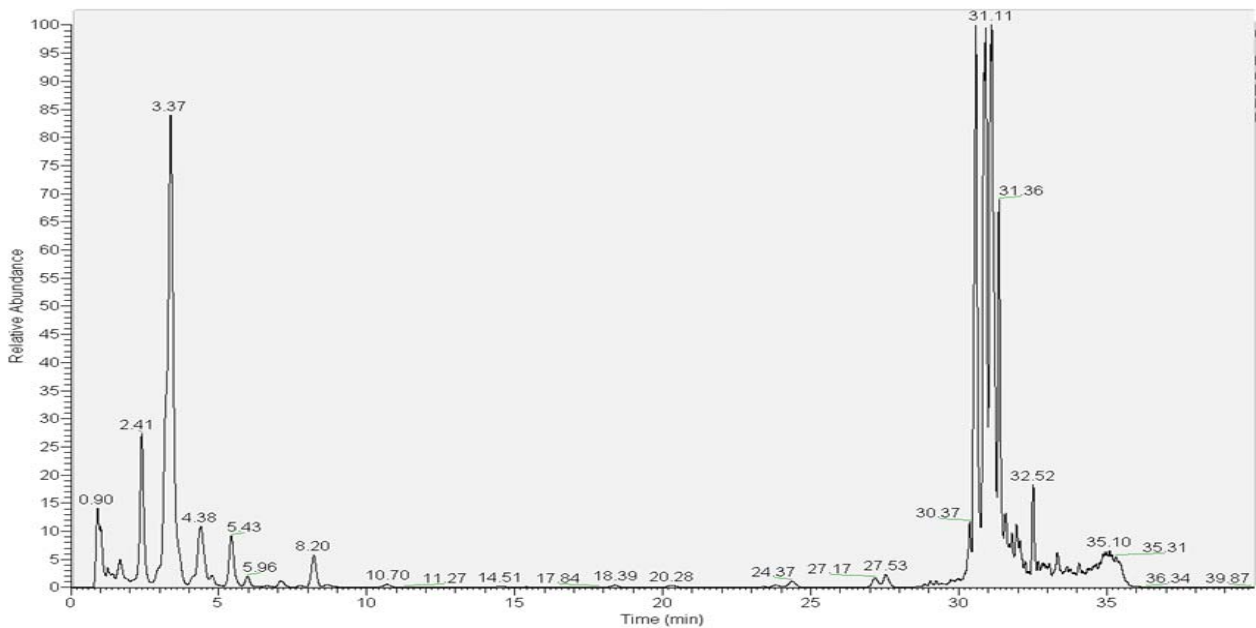
Luego se analizaron los espectros de masas de cada señal con el fin de determinar la relación masa/carga ( $m/z$ ) de los analitos. Se encontraron moléculas con  $m/z$  de 1492 y 1505,9 que corresponderían a la familia de las fengicinas y moléculas con  $m/z$  de 1056,6 y 1079,9 que corresponderían a la familia de las iturinas (Tabla 13).

**Tabla 13. Lipopéptidos identificados en el extracto metanólico de *B. subtilis* NB mediante el análisis de los espectros de masa adquiridos por LC-MS/MS modo fullscan.**

RT (min)	$m/z$ observado	$m/z$ referencia	Lipopéptido	Bibliografía
10,40	1492	1492,16	Fengicina	Malfanova <i>et al</i> ,2012; Aeguelles – Arias <i>et al</i> , 2009
11,74 11,88	1505,9	1506,2	Fengicina	Malfanova <i>et al</i> , 2012; Aeguelles – Arias <i>et al</i> , 2009
27,01	1056,6	1057	Iturina	Yuan <i>et al</i> , 2012
27,74	1079,9	1079,6	Iturina	Chen <i>et al</i> , 2008

### 5.4.1.2 LC-MS/MS modo fullscan para la identificación de iturinas presentes en el extracto de *B. subtilis* NB

El espectro de masas obtenido con el programa de elución para la identificación de iturinas (figura 41), muestra señales más distantes entre sí y con una mayor resolución. Se analizaron los espectros de las señales obtenidas del cromatograma y se encontraron iones con m/z que podrían pertenecer a la familia de las iturinas (1094 m/z), fengicinas (1478 y 1464 m/z) y surfactinas (1043 m/z) (tabla 14).



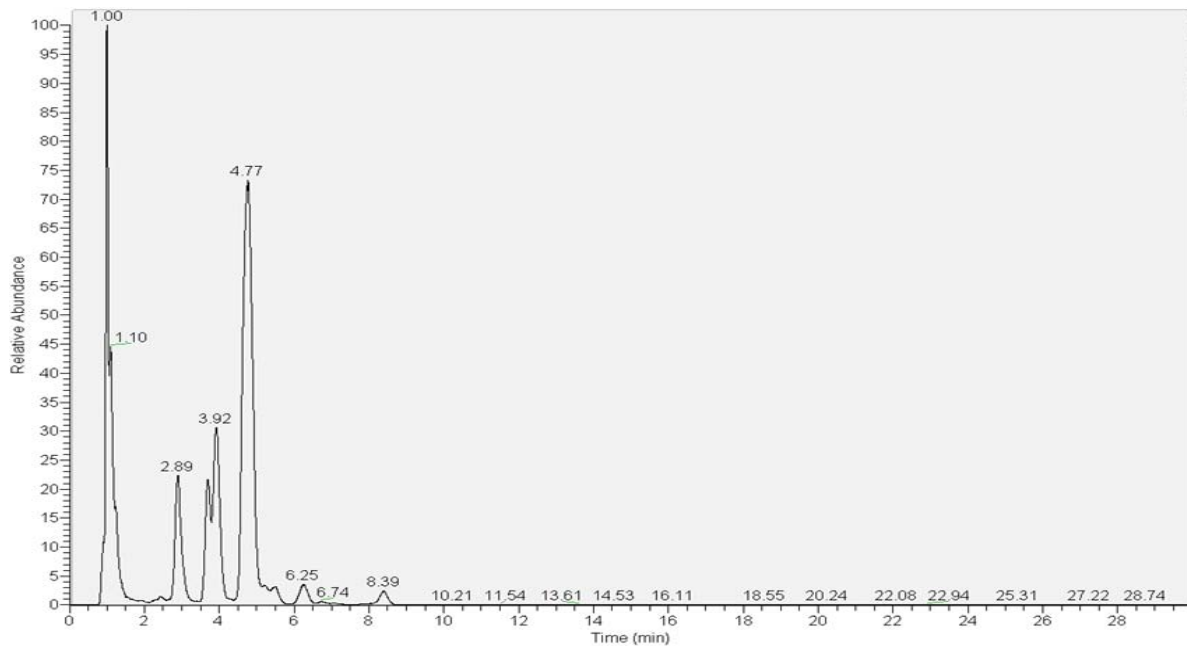
**Figura 41.** Cromatograma obtenido mediante LC-MS/MS modo fullscan para identificar los lipopéptidos presentes en el extracto de *B. subtilis* NB utilizando el programa de elución para la familia de las iturinas.

**Tabla 14.** Lipopéptidos identificados en el extracto de *B. subtilis* NB mediante el análisis de los espectros de masas adquiridos por LC-MS/MS (fullscan) utilizando el programa de elución para la familia de las iturinas.

RT (min)	m/z observado	m/z referencia	Lipopéptido	Bibliografía
5,43	1094	1095,5	Iturina	Chen <i>et al</i> , 2007
18,39	1478	1478,12	Fengicina	Malfanova <i>et al</i> , 2012; Aeguelles – Arias <i>et al</i> , 2009
20,34	1464	1464,12	Fengicina	Malfanova <i>et al</i> , 2012; Aeguelles – Arias <i>et al</i> , 2009
30,96	1043	1043,4	Surfactina	Malfanova <i>et al</i> , 2012; Aeguelles – Arias <i>et al</i> , 2009

### 5.4.1.3 LC-MS/MS modo fullscan para la identificación de surfactinas presentes en el extracto de *B. subtilis* NB

También se aplicó un programa de elución para los lipopéptidos pertenecientes a la familia de las surfactinas. Se encontraron dos señales con m/z de 994 y 1036, que podrían corresponder a las surfactinas (figura 42 y tabla 15).



**Figura 42.** Cromatograma obtenido mediante LC-MS/MS modo fullscan para identificar los lipopéptidos presentes en el extracto de *B. subtilis* NB utilizando el programa de elución para la familia de las surfactinas.

**Tabla 15.** Lipopéptidos identificados en el extracto metanólico de *B. subtilis* NB mediante el análisis de los espectros de masas adquiridos por LC-MS/MS (fullscan) utilizando el programa de elución para la familia de las surfactinas.

RT (min)	m/z observado	m/z referencia	Lipopéptido	Bibliografía
3,12	994,86	994,14	Surfactina	Malfanova <i>et al</i> , 2012; Aeguelles – Arias <i>et al</i> , 2009
4,77	1037,1	1036,4	Surfactina	Malfanova <i>et al</i> , 2012; Aeguelles – Arias <i>et al</i> , 2009

Finalmente al utilizar un programa de elución para fengicina, solo se observaron las señales correspondientes a las moléculas anteriormente mencionadas.

#### 5.4.1.4 LC-MS/MS modo fullscan para la identificación de lipopéptidos presentes en el extracto de *B. pumilus* G2

Los análisis de LC-MS/MS para la muestra obtenida de *B. pumilus* G2 se realizaron bajo las mismas condiciones que para *B. subtilis* NB y los resultados obtenidos se compararon con los reportados en los análisis de *B. subtilis* HC8 (figura 39). Es así como el LC-MS/MS presentó señales en la zona donde se visualizan las iturinas (RT: 0-8 min), las que son de alta intensidad, mientras que para las fengicinas (RT: 8-14 min), existieron señales de baja intensidad y finalmente para las surfactinas (RT: 22-27 min), se pudo observar varias señales de alta intensidad (figura 43). Por lo tanto, a partir de los valores de RT de las señales se puede deducir que *B. pumilus* G2 secreta iturinas, surfactinas y posiblemente fengicinas. Luego se analizaron los espectros de masa de cada señal y se encontraron moléculas de 1083,6 m/z que corresponderían a la familia de las iturinas y 1017,8 m/z que pertenecerían a la familia de las surfactinas (tabla 16).

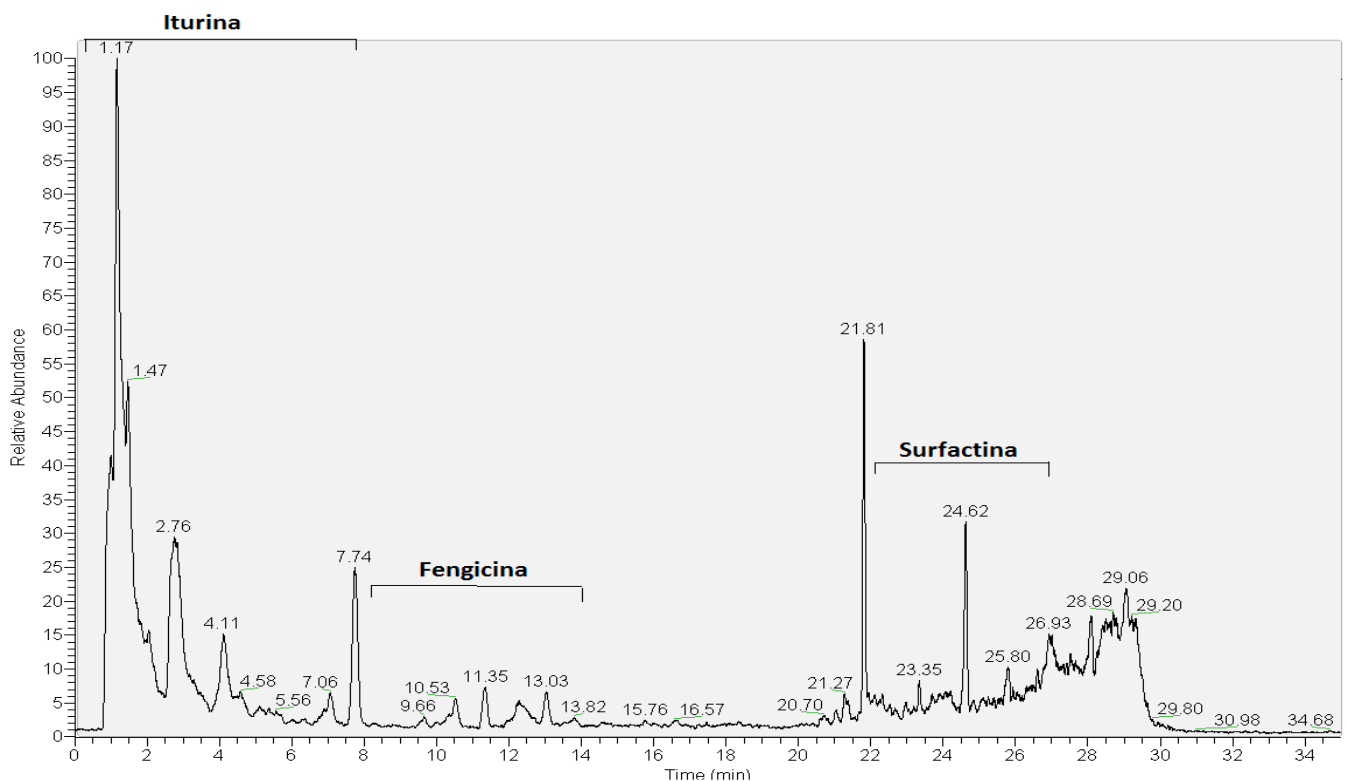


Figura 43. Cromatograma obtenido mediante LC-MS/MS modo fullscan del extracto metanólico de *B. pumilus* G2

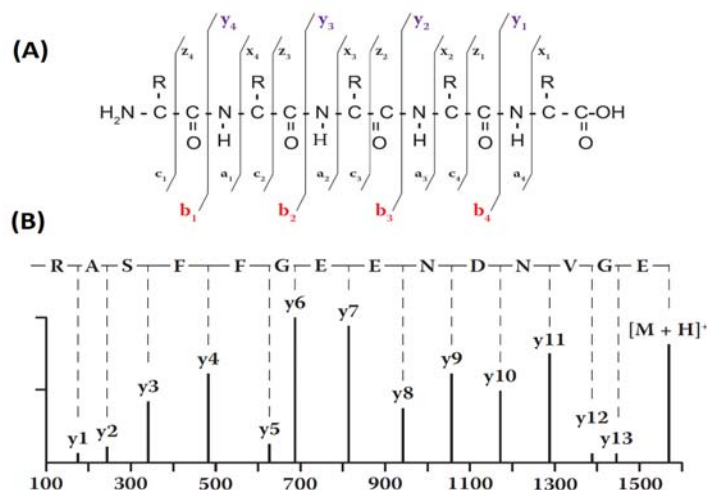
**Tabla 16. Lipopéptidos identificados en el extracto metanólico de *B. pumilus* G2 mediante el análisis de los espectros de masa adquiridos por LC-MS/MS modo fullscan.**

RT (min)	m/z observado	m/z referencia	Lipopéptido	Bibliografía
7,74	1083,6	1085	Iturina	Malfanova <i>et al</i> , 2012; Aeguelles – Arias <i>et al</i> , 2009
26,93	1017,8	1016,6	Surfactina	Chen <i>et al</i> , 2008

## 5.4.2 LC-MS/MS modo SIM

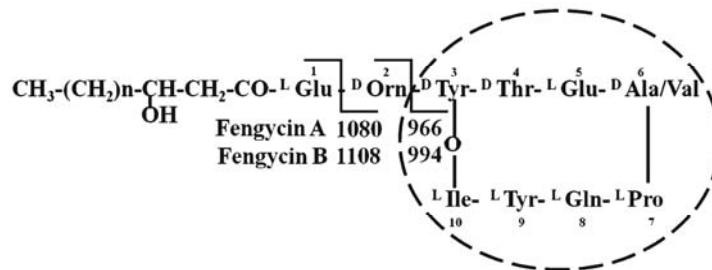
### 5.4.2.1 LC-MS/MS modo SIM para el análisis estructural de los lipopéptidos presentes en el extracto de *B. subtilis* NB

Se analizaron los lipopéptidos mediante LC-ESI-MS/MS modo SIM (single ion monitoring) que consiste en una monitorización selectiva de los iones aumentando la sensibilidad del análisis. Esta es una técnica de ionización suave que favorece la ruptura del enlace peptídico, generando fragmentos que son designados como iones *b* (fragmento desde el amino terminal del péptido) e iones *y* (fragmento desde el carboxilo terminal). También los péptidos se pueden fragmentar en otros enlaces, como por ejemplo los que flanquean al enlace peptídico, generando iones *a*, *x*, *c* y *z* (figura 44A). Como ejemplo, en la figura 44B se muestra de manera simplificada la fragmentación del péptido glutamina-fibrinopéptido B (Glu-fib) y mediante la información entregada por las señales de los iones (*y*) se puede obtener la secuencia aminoácida de la molécula (Greaves and Roboz, 2014).



**Figura 44. Representación esquemática de la fragmentación de péptidos. (A) Iones característicos producidos de la fragmentación de un péptido por MS. (B) Espectro simplificado de la secuencia aminoácida (RASFFGEENDNVGE) del Glu-fib B a partir las señales de los iones (*y*).**

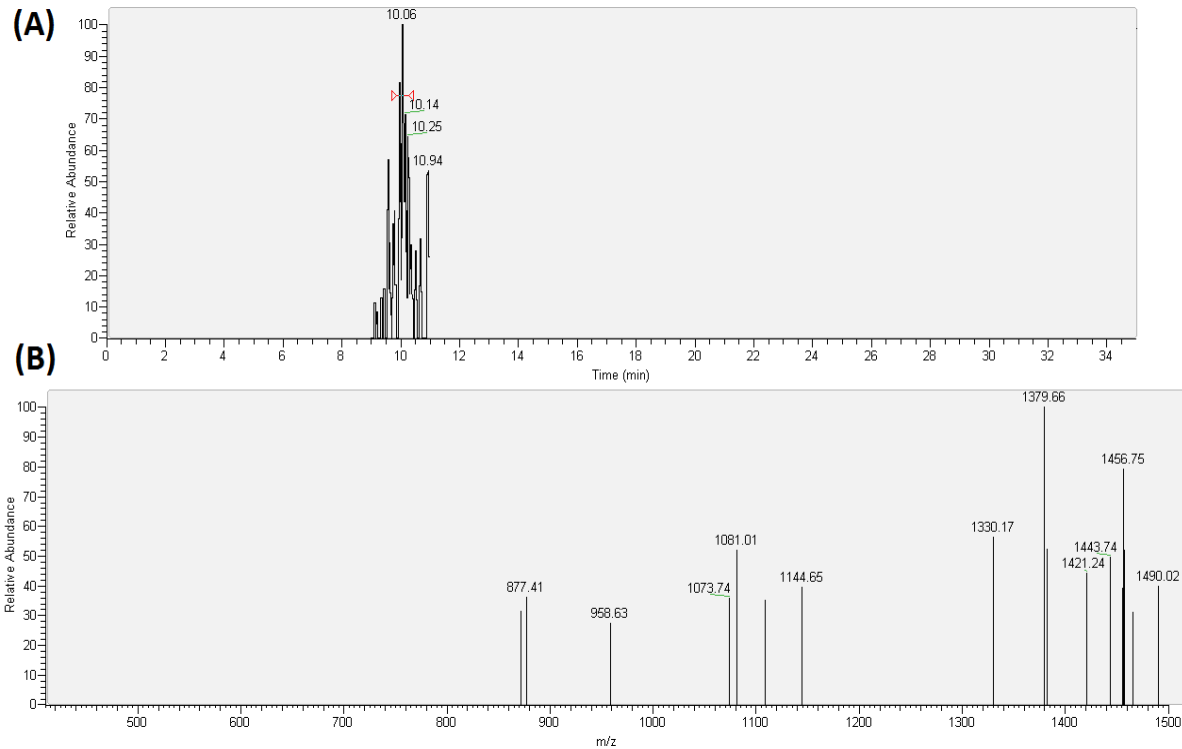
**5.4.2.1.1 Fengicinas:** En general estas moléculas al ser sometidas a MS tienden a fragmentarse en la posición 1 (Glu) y/o en la posición 2 (Orn) dando origen a las señales 1080 y 996 m/z para fengicina A, mientras que para las fengicinas B las señales son 1108 y 994 m/z (figura 45) (Pathak *et al*, 2012).



**Figura 45. Estructura peptídica de la familia de las fengicinas.** Principales fragmentos obtenidos a partir de LC-MS/MS para la fengicina A (1080 m/z y 966 m/z) y fengicina B (1108 m/z y 994 m/z).

En primer lugar se analizaron por LC-MS/MS (modo SIM) las estructuras de las moléculas pertenecientes al extracto metanólico de *B. subtilis* NB, que presentaron m/z de 1464, 1478, 1492 y 1506,2 y que pertenecerían a la familia de las fengicinas. En las figuras 46 a la 49 se muestran los espectros de masas obtenidos de LC-MS/MS modo SIM para estas moléculas. En la parte superior de la figura se observan los RT en donde se encuentra presente la molécula, mientras que en la parte inferior del cromatograma, se pueden observar los iones obtenidos de la fragmentación del lipopéptido. Para la molécula de 1492 m/z con un RT de 10,06 min (figura 46A) se obtuvieron fragmentos como consecuencia de la ruptura del enlace peptídico, los que permitieron deducir la cadena de aminoácidos Glu<sup>5</sup> -Val<sup>6</sup> -Pro<sup>7</sup> -Gln<sup>8</sup> -Tyr<sup>9</sup> -Ile<sup>10</sup> que forma parte de la estructura de la fengicina B (figura 46B y tabla 17). Para la molécula de 1505,9 m/z con un RT de 11,36 min (figura 47A) se obtuvieron fragmentos generados por la ruptura del enlace peptídico, los que permitieron deducir la cadena de aminoácidos Val<sup>6</sup> -Pro<sup>7</sup> -Gln<sup>8</sup> -Tyr<sup>9</sup> que forman parte de la estructura de la fengicina B. Además se pudo observar otros iones característicos de la fragmentación de fengicina B: i) ión 994,97 m/z que corresponde a la pérdida de los aminoácidos del anillo peptídico y ii) ion 997,8 m/z que corresponde a la pérdida de H<sub>2</sub>O del ion 994,97 m/z (figura 47B y tabla 18). En la figura 48 se presenta el cromatograma y el espectro de masas para la molécula de 1478 m/z. Este ión presentó un RT de 18,35 min (figura 48A) y se pueden observar fragmentos provenientes de la ruptura del enlace peptídico, que permitieron dilucidar los aminoácidos Glu<sup>1</sup> -Orn<sup>2</sup> -Tyr<sup>3</sup> -Thr<sup>4</sup> -Glu<sup>5</sup> -Val<sup>6</sup> -Pro<sup>7</sup> -Gln<sup>8</sup>, que corresponden a la estructura de la fengicina B (figura 48A y tabla 19). Finalmente, en la figura 49 se

observa el espectro de masas para la molécula de 1464 m/z con un RT de 20,81 min (figura 49A), la que genera los fragmentos de 1415,58 – 1320,16 y 1270,28 m/z (figura 49B). Sin embargo, no se pudo dilucidar la estructura de la molécula debido a su escasa fragmentación.

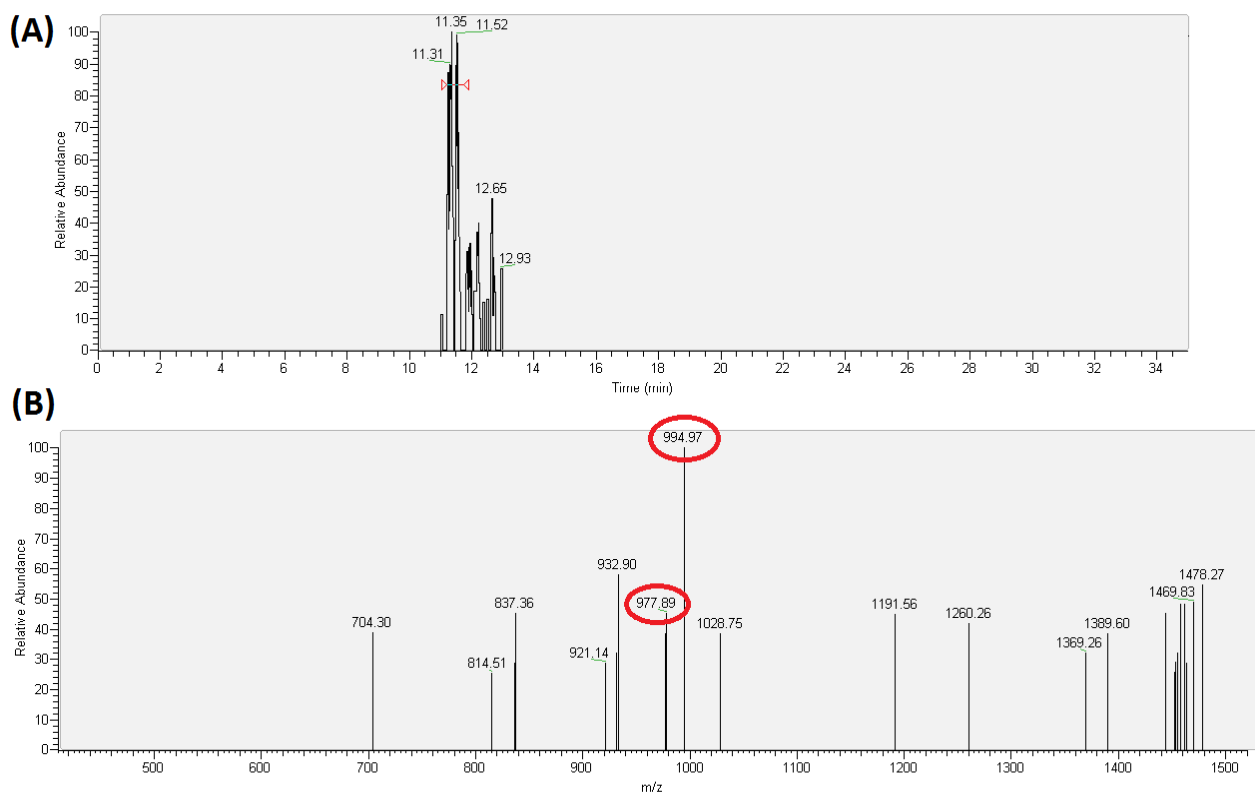


**Figura 46. LC-MS/MS modo SIM del ión con m/z de 1492 del extracto de *B. subtilis* NB. (A)** Cromatograma del ión con un RT de 10,06 min. **(B)** Iones obtenidos de la fragmentación del ión 1492 m/z.

**Tabla 17. Fragmentos del ión con m/z de 1492, identificados mediante LC MS/MS modo SIM del extracto metanólico de *B. subtilis* NB**

Diferencia de iones	Masa fragmento obtenido	Masa fragmento de referencia	Aminoácido
1443,74 – 1330,17	113,57	113,15	<b>Ile</b>
1421,24 – 1144,65	276,59	276,32	<b>Tyr – Ile</b>
1073,74 – 877,41	196,33	196,24	<b>Val – Pro</b>
1379,66 - 877,41	502,25	501,55	<b>Pro-Gln-Tyr-Ile</b>
1330,17 – 877,41	452,76	453,29	<b>Glu-Val-Pro-Gln</b>
<b>Fengicina B</b>	<b>Glu-Orn-Tyr-Thr-Glu-Val-Pro-Gln-Tyr-Ile</b>		

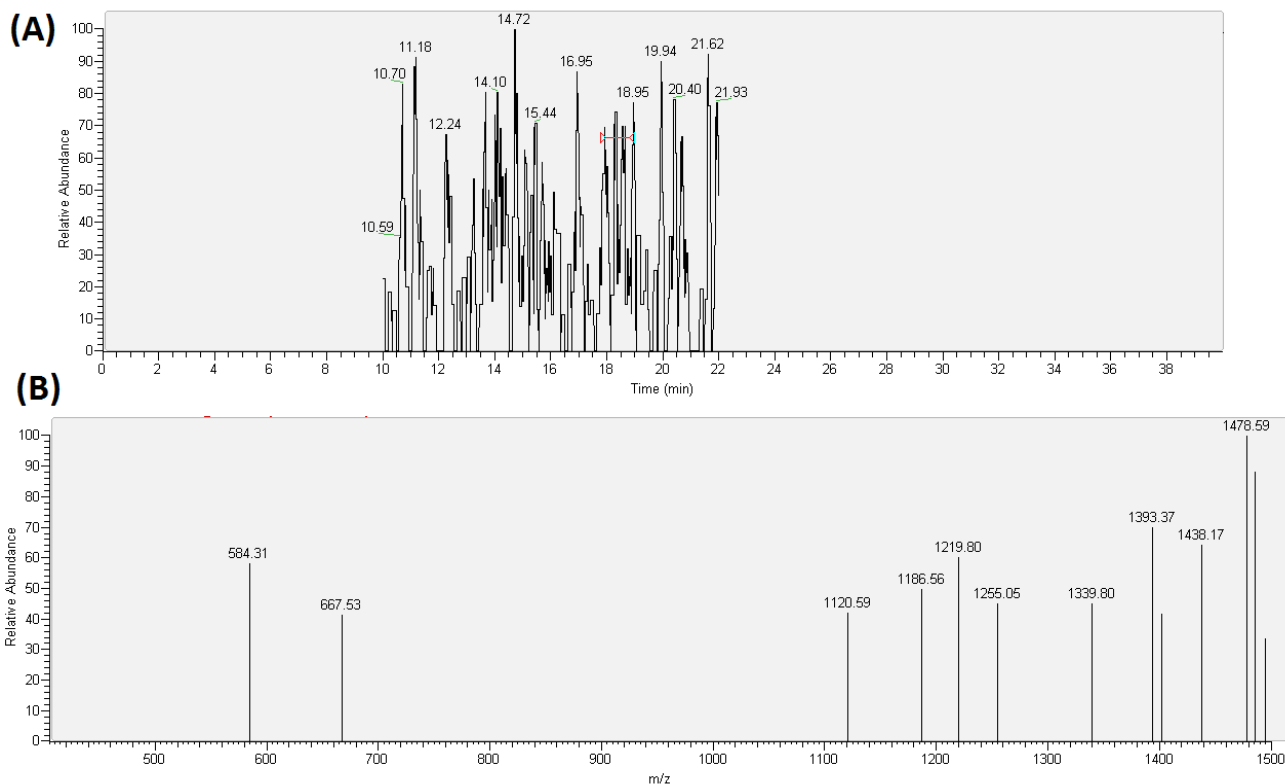




**Figura 47. LC-MS/MS modo SIM del ión con m/z de 1505,9 del extracto de *B. subtilis* NB. (A) cromatograma del ión con un RT de 11,36 min. (B) Iones obtenidos de la fragmentación del ión 1505,9 m/z. Los fragmentos encerrados en círculos indican los iones característicos de la familia de las fengicinas obtenidos por LC-MS/MS.**

**Tabla 18. Fragmentos del ión con m/z de 1505,9 identificados mediante LC-MS/MS modo SIM del extracto metanólico de *B. subtilis* NB**

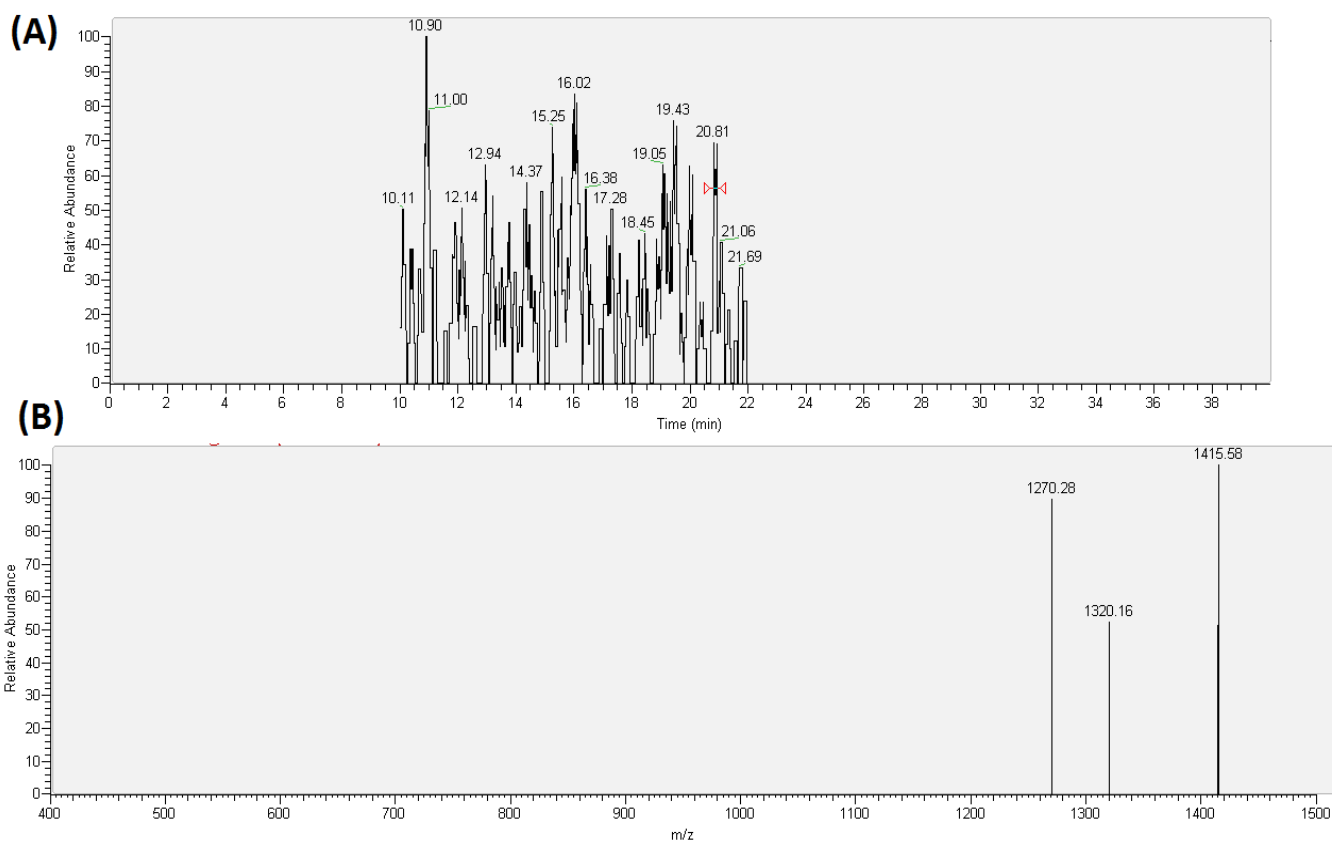
Diferencia de iones	Masa fragmento observado	Masa fragmento de referencia	Aminoácido o dipéptido
1191,56 – 994,97	196,59	196,24	<b>Val - Pro</b>
977,89 – 814,51	163,38	163,17	<b>Tyr</b>
994,97 – 704,3	290,67	291,29	<b>Tyr - Gln</b>
932,9 – 704,3	228,6	228,24	<b>Val - Glu</b>
<b>Fengicina B</b>	<b>Glu-Orn-Tyr-Thr-Glu-Val-Pro-Gln-Tyr-Ile</b>		



**Figura 48.** LC-MS/MS modo SIM del ión con m/z de 1478 del extracto de *B. subtilis* NB. (A) Cromatograma del ión con un RT de 18,35 min. (B) Iones obtenidos de la fragmentación del ión 1478 m/z.

**Tabla 19.** Fragmentos del ión con m/z de 1478, identificados mediante LC-MS/MS modo SIM del extracto metanólico de *B. subtilis* NB.

Diferencia de iones	Masa fragmento observado	Masa fragmento de referencia	Aminoácido o péptido
1438,17- 1186,56	292,03	291,3	<b>Tyr- Gln</b>
1219,8 – 584,31	635,49	636,41	<b>Glu-Orn-Tyr-Thr-Glu</b>
1219,8 – 1120,59	99,21	99,13	<b>Val</b>
1120,59 – 667,53	453,06	453,47	<b>Glu-Val-Pro-Gln</b>
<b>Fengicina B</b>	<b>Glu-Orn-Tyr-Thr-Glu-Val-Pro-Gln-Tyr-Ile</b>		



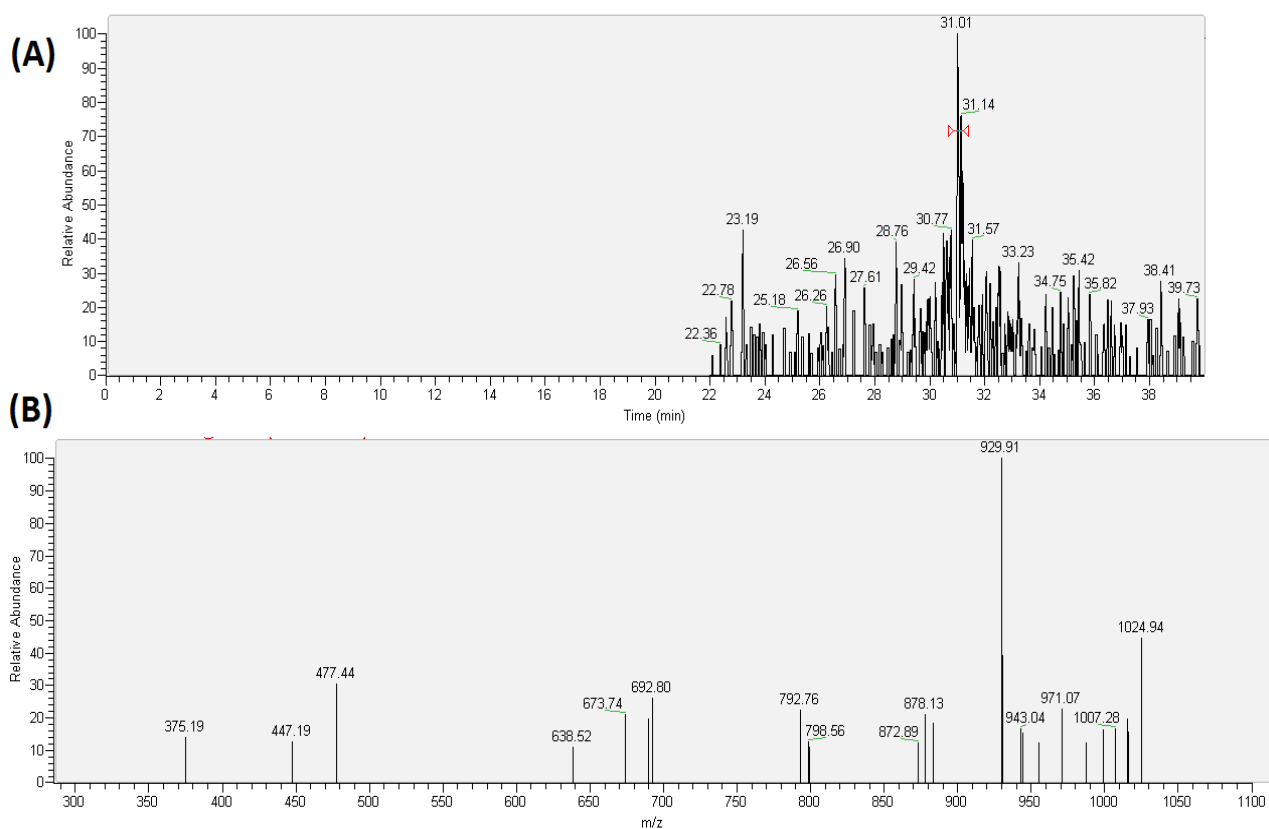
**Figura 49.** LC-MS/MS modo SIM del ión con m/z de 1464 del extracto de *B. subtilis* NB. (A) Cromatograma del ión con un RT de 20,81 min. (B) Iones obtenidos de la fragmentación del ión 1464 m/z.

**5.4.2.1.2 Surfactinas:** son heptapéptidos cíclicos con una secuencia unida a una cadena de ácido graso  $\beta$ -hidroxilado, con una longitud de 13C a 16C (figura 50). Análisis de moléculas realizados con MS generan fragmentos característicos para esta familia correspondientes a iones de 699,2 y 685,2 m/z que se asociaron a los fragmentos  $[(H)Leu/Ile^2-Leu/Ile^3-Leu/Ile^4-Asp^5-Leu/Ile^6-Leu/Ile^7(OH)+H]^+$  y  $[(H)Leu/Ile^2-Leu/Ile^3-Val^4-Asp^5-Leu/Ile^6-Leu/Ile^7(OH)+H]^+$  (Williams and Brodbelt, 2004).



**Figura 50.** Estructura péptica de la familia de las surfactinas

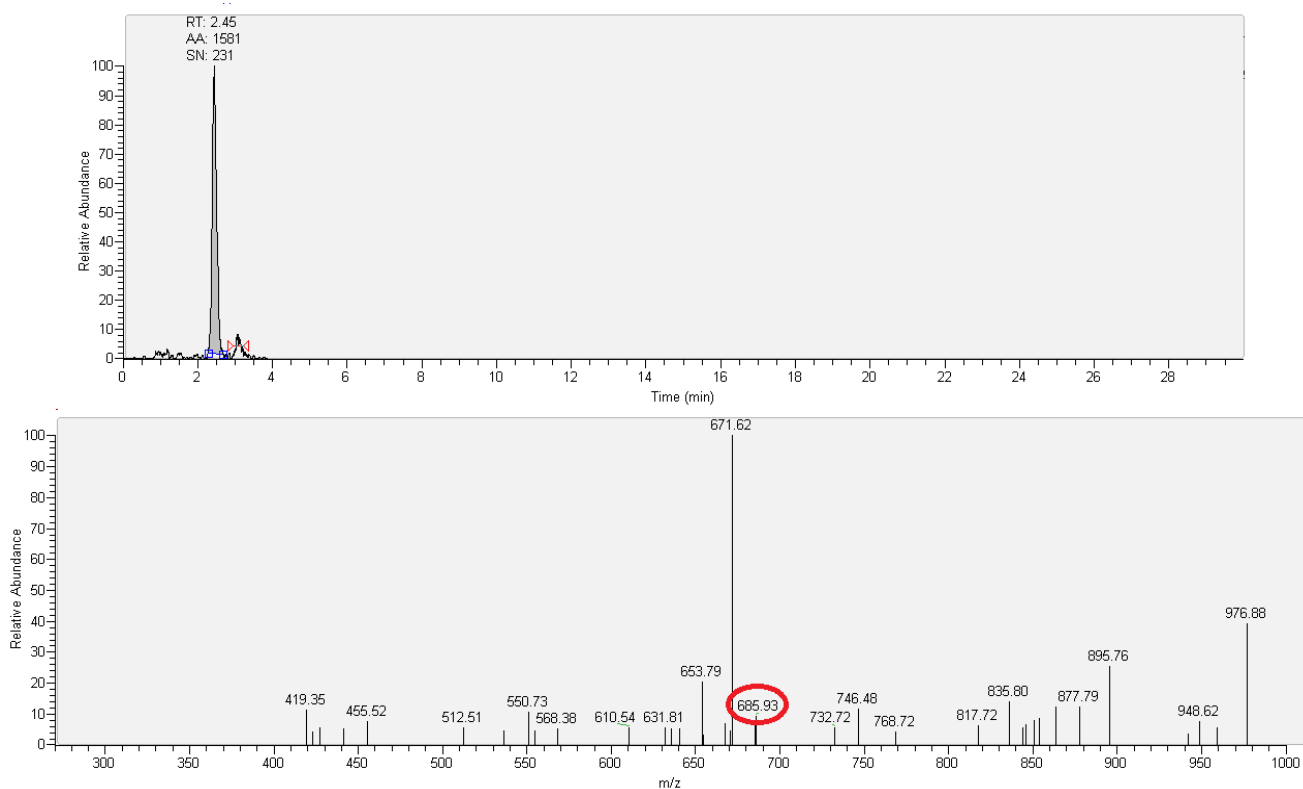
Se analizaron por LC-MS modo SIM, las estructuras de las moléculas encontradas en el extracto metanólico de *B. subtilis* NB que presentaban pesos moleculares 995, 1037 y 1043 m/z y que pertenecerían a la familia de las surfactinas (figuras 51 a la 53). En primer lugar, para la molécula de 1043 m/z con un RT de 30,02 min (figura 51A) se observan los fragmentos provenientes de la ruptura del enlace peptídico (figura 51B). A partir de ellos, se podría deducir la cadena aminoácídica  $\text{Glu}^1 - \text{Leu/Ile}^2 - \text{Leu/Ile}^3 - \text{Val}^4 - \text{Asp}^5 - \text{Leu/Ile}^6 - \text{Leu/Ile}^7$ , que coincide con la estructura de las surfactinas (tabla 20). En la figura 52A se presenta el cromatograma del ión 994,86 m/z que posee un RT de 2,45 min. Adicionalmente, en la figura 52B se observa el espectro de masas para este ión, con los fragmentos generados por la ruptura del enlace peptídico y que permitieron deducir la secuencia aminoácídica  $\text{Leu/Ile}^2 - \text{Leu/Ile}^3 - \text{Val}^4 - \text{Asp}^5 - \text{Leu/Ile}^6 - \text{Leu/Ile}^7$ , la que es coincidente con la estructura de las surfactinas, aún cuando no se pudo deducir el aminoácido Glu en la primera posición (tabla 21). Además, del espectro de masas se observó la aparición del ión de 685,93 m/z, el que correspondería al ión de 685,2 m/z, previamente descrito, y que presentaría la secuencia  $[(\text{H}) \text{Leu/Ile}^2 - \text{Leu/Ile}^3 - \text{Val}^4 - \text{Asp}^5 - \text{Leu/Ile}^6 - \text{Leu/Ile}^7(\text{OH}) + \text{H}]^+$ . Finalmente, para la molécula de 1037,1 m/z con un RT de 4,66 min (figura 53A) se observan los fragmentos provenientes de la ruptura del enlace peptídico, que permitieron deducir la secuencia  $\text{Leu/Ile}^2 - \text{Leu/Ile}^3$  y  $\text{Asp}^5 - \text{Leu/Ile}^6 - \text{Leu/Ile}^7$ , que correlaciona con la estructura de las surfactinas, pero no fue posible deducir los aminoácidos de la posición 1 y 4 (figura 53B y tabla 22). En el espectro de masas se observó una señal muy intensa de 685,63 m/z, que correspondería al ion de 685,2 m/z y que presentaría la secuencia  $[(\text{H}) \text{Leu/Ile}^2 - \text{Leu/Ile}^3 - \text{Val}^4 - \text{Asp}^5 - \text{Leu/Ile}^6 - \text{Leu/Ile}^7(\text{OH}) + \text{H}]^+$ , y según este dato se podría deducir que el aminoácido de la posición 4 correspondería a una Valina (figura 53B).



**Figura 51. LC-MS/MS modo SIM del ión con m/z de 1043 del extracto de *B. subtilis* NB. (A) Cromatograma del ión con un RT de 30,02 min. (B) Iones obtenidos de la fragmentación del ión 1043 m/z.**

**Tabla 19. Fragmentos del ión con m/z de 1043, identificados mediante LC-MS/MS modo SIM del extracto de *B. subtilis* NB.**

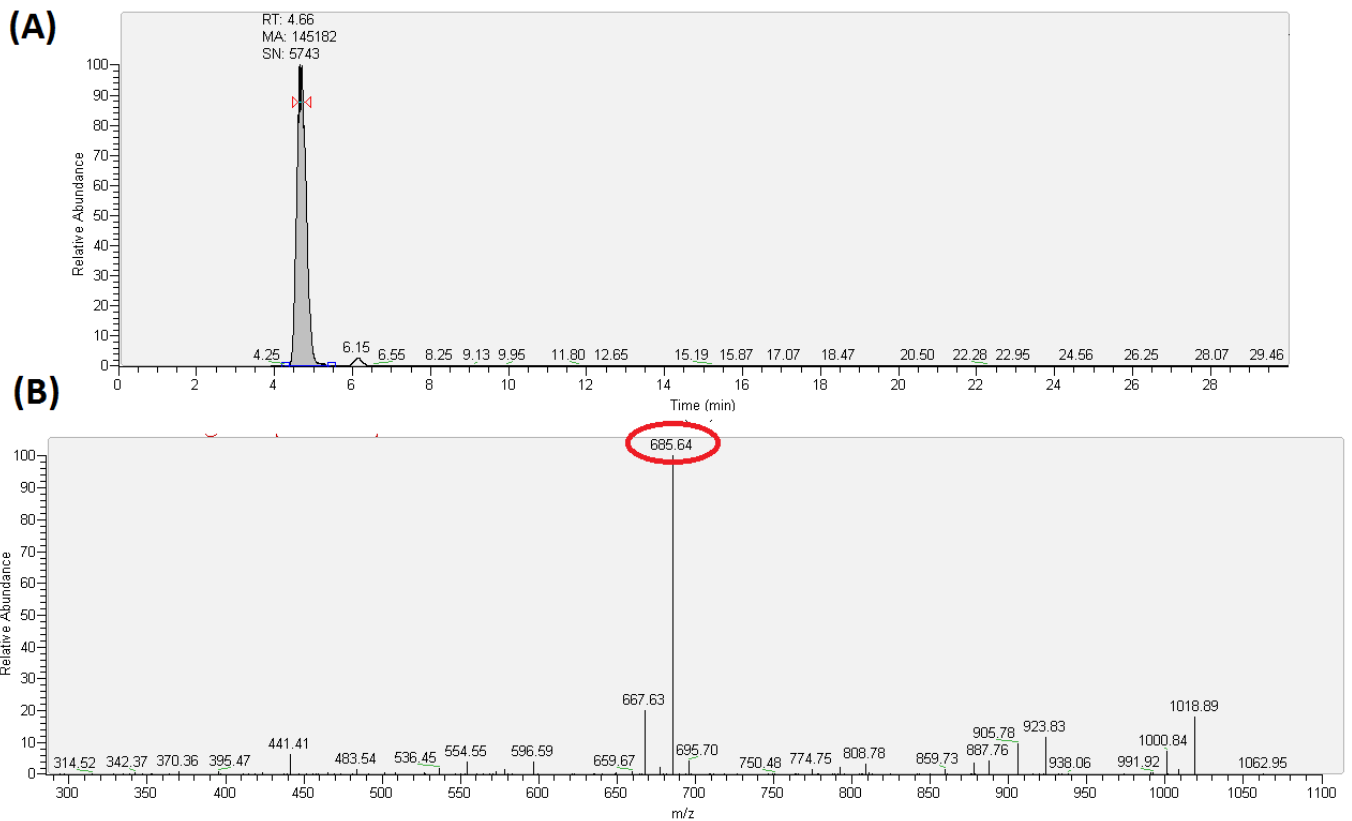
Diferencia de iones	Masa fragmento observado	Masa fragmento de referencia	Aminoácido o dipéptido
1024,94 - 798,56	226,38	226,3	<b>Leu/Ile – Leu/Ile</b>
1007,28 – 792,76	214,44	214,23	<b>Val – Asp</b>
1007,28 – 878,13	129,15	129,11	<b>Glu</b>
792,76 – 692,8	99,96	99,13	<b>Val</b>
673,74 – 447,19	226,55	226,3	<b>Leu/Ile – Leu/Ile</b>
<b>Surfactina</b>	<b>Glu- Leu/Ile- Leu/Ile- Val- Asp- Leu/Ile-Leu/Ile</b>		



**Figura 52. LC-MS/MS modo SIM del ión con m/z de 994,86 del extracto de *B. subtilis* NB. (A)** cromatograma del ión con un RT de 2,45 min. **(B)** Iones obtenidos de la fragmentación del ión 994,86 m/z. El fragmento encerrado en un círculo indica el ión característico de la familia de las surfactinas.

**Tabla 20. Fragmentos del ión con m/z de 994,86, identificados mediante LC-MS/MS modo SIM del extracto de *B. subtilis* NB**

Diferencia de iones	Masa fragmento observado	Masa fragmento de referencia	Aminoácido/péptido
976,88 - 877,79	99,09	99,13	<b>Val</b>
948,62 - 835,8	112,82	113,11	<b>Leu/Ile</b>
768,72 - 653,79	114,93	115,08	<b>Asp</b>
568,38 - 455,52	112,86	113,11	<b>Leu/Ile</b>
976,88 - 550,73	426,15	426,46	<b>Val-Asp-Leu/Ile</b>
895,75 - 512,51	440,23	440,33	<b>Leu/Ile-Val-Asp- Leu/Ile</b>
877,79 - 550,73	327,06	327,3	<b>Asp-Leu/Ile- Val</b>
746,48 - 419,35	327,13	327,3	<b>Asp-Leu/Ile-Val</b>
<b>Surfactina</b>	<b>Glu/Gln- Leu/Ile- Leu/Ile- Val- Asp- Leu/Ile- Val</b>		

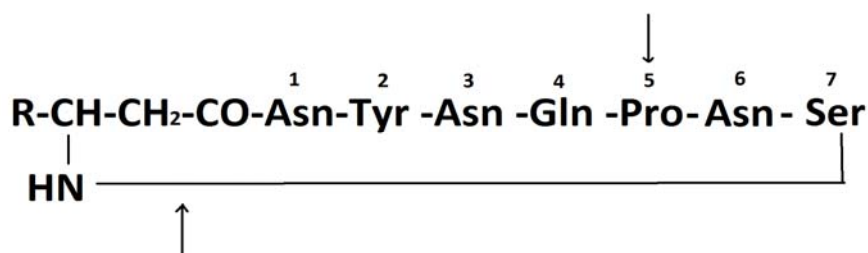


**Figura 53. LC-MS/MS modo SIM del ión con m/z de 1037,1 del extracto de *B. subtilis* NB. (A) Cromatograma del ión con un RT de 4,66 min. (B) Iones obtenidos de la fragmentación del ión 1037,1 m/z. El fragmento encerrado en un círculo indica el ión característico de la familia de las surfactinas.**

**Tabla 21. Fragmentos del ión con m/z de 1037, identificados mediante LC-MS/MS modo SIM del extracto de *B. subtilis* NB.**

Diferencia de iones	Masa fragmento observado	Masa fragmento de referencia	Aminoácido
1000,84 – 887,76	113,08	113,11	<b>Leu/Ile</b>
887,76 – 774,75	113,01	113,11	<b>Leu/Ile</b>
774,75 – 659,67	115,08	115,08	<b>Asp</b>
667,63 – 554,45	113,18	113,11	<b>Leu/Ile</b>
554,45 – 441,41	113,04	113,11	<b>Leu/Ile</b>
<b>Surfactina</b>	Gln/Glu- <b>Leu/Ile- Leu/Ile- Val- Asp- Leu/Ile- Leu/Ile</b>		

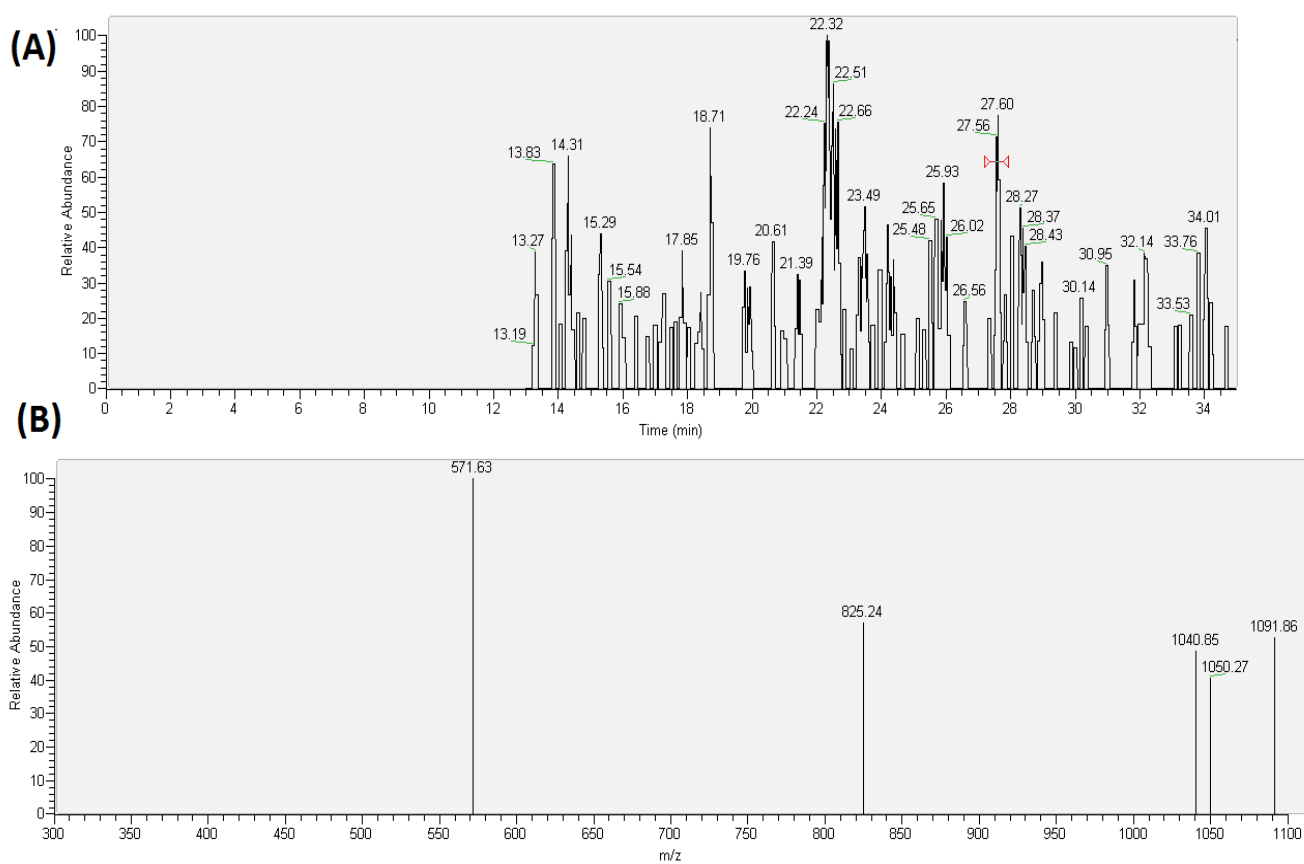
**5.4.2.1.3 Iturinas:** En general, la fragmentación de algunas de estas moléculas ocurre en 2 sitios: i) en el enlace amino entre  $\beta$ AA-Ser y ii) en el enlace peptídico de la Prolina (figura 54) (Pathak and Keharia, 2014).



**Figura 54. Estructura peptídica de la familia de las iturinas.** Las flechas indican los sitios de ruptura más comunes de la familia de las iturinas mediante LC-MS/MS.

Se analizaron por LC-MS/MS modo SIM las estructuras de las moléculas encontradas en el extracto metanólico de *B. subtilis* NB que presentan los pesos moleculares 1056, 1079 y 1094 m/z, y que pertenecerían a la familia de las iturinas (figura 55-57). En la figura 55 se presenta el espectro de masa de la molécula de 1079,9 m/z con un RT de 27,54 min (figura 55 A), que generó fragmentos de la ruptura del enlace peptídico. Se pudo deducir la secuencia Asn<sup>1</sup>- Tyr<sup>2</sup>- Asn<sup>3</sup>- Gln<sup>4</sup>- Pro<sup>5</sup>, que forma parte de la estructura de las iturinas, pero no fue posible deducir los aminoácidos de las posiciones 6 y 7 (figura 55B y tabla 23). Según estos datos, esta molécula podría corresponder a una iturina A, ya sea micosubtilina o bacilomicina, dependiendo del aminoácido presente en la posición 6 (Asn/Ser) y 7 (Thr/Ser/Asn) (Bonmatin *et al*, 2003). Por otro lado, en la figura 56 se presenta el espectro de masas para la molécula de 1094 m/z que posee un RT de 5,38 min (figura 56A) y los fragmentos generados de la ruptura del enlace peptídico permitieron deducir la secuencia Pro<sup>5</sup>- Ser<sup>6</sup>- Asn<sup>7</sup>, que forma parte de la estructura de las iturinas (figura 56 B y tabla 24). Esta molécula podría ser clasificada como una micosubtilina, debido a que los aminoácidos encontrados y el orden en el que se encuentran, son característicos para este tipo de iturina (Bonmatin *et al*, 2003). Finalmente, para la molécula de 1056,6 m/z con un RT de 27 min se obtuvieron los fragmentos 394,58 y 1033,84 m/z, que no permitieron dilucidar la estructura del lipopéptido, aún cuando según el espectro de masa podría corresponder a una iturina (figura 57).

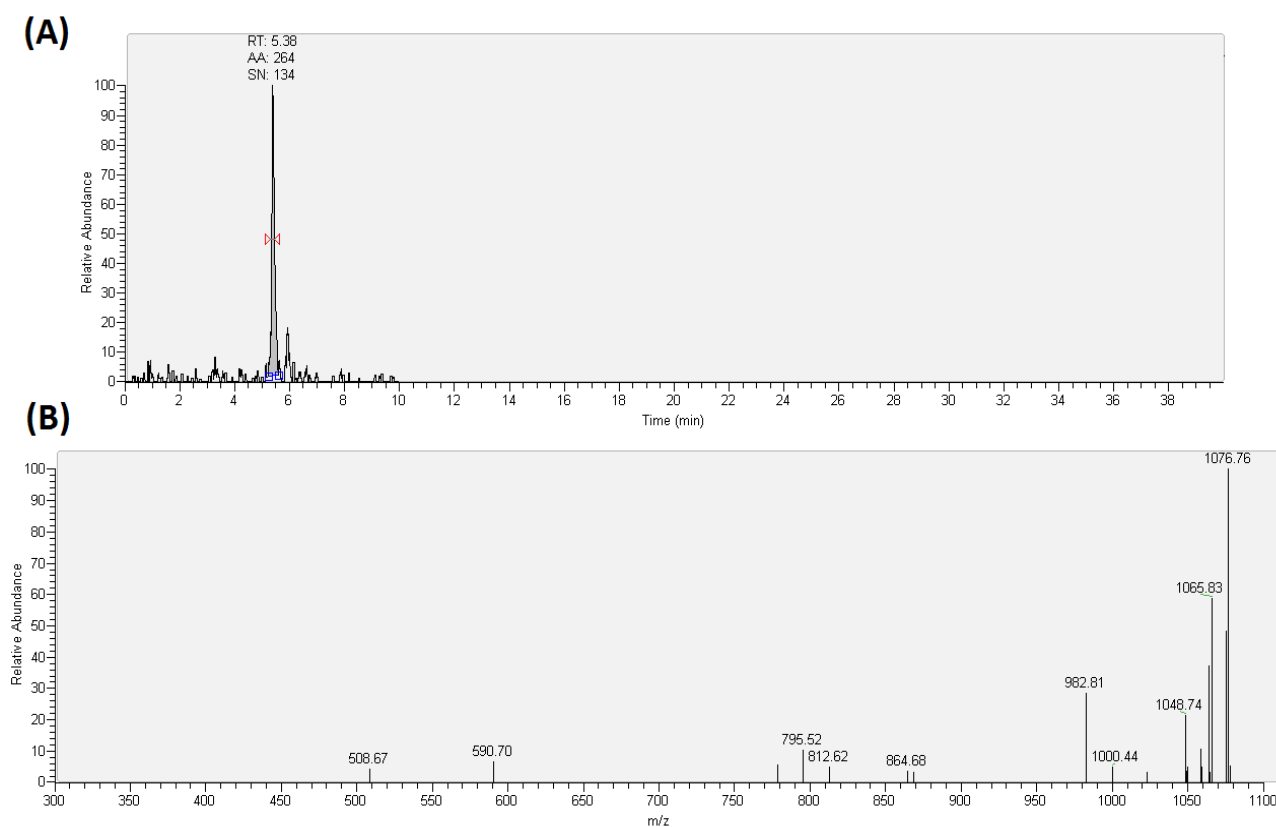




**Figura 55.** LC-MS/MS modo SIM del ión con m/z de 1079 del extracto de *B. subtilis* NB. (A) Cromatograma del ión con un RT de 27,54 min. (B) Iones obtenidos de la fragmentación del ión 1079 m/z.

**Tabla 22.** Fragmentos del ión con m/z de 1079, identificados mediante LC-MS/MS modo SIM del extracto de *B. subtilis* NB

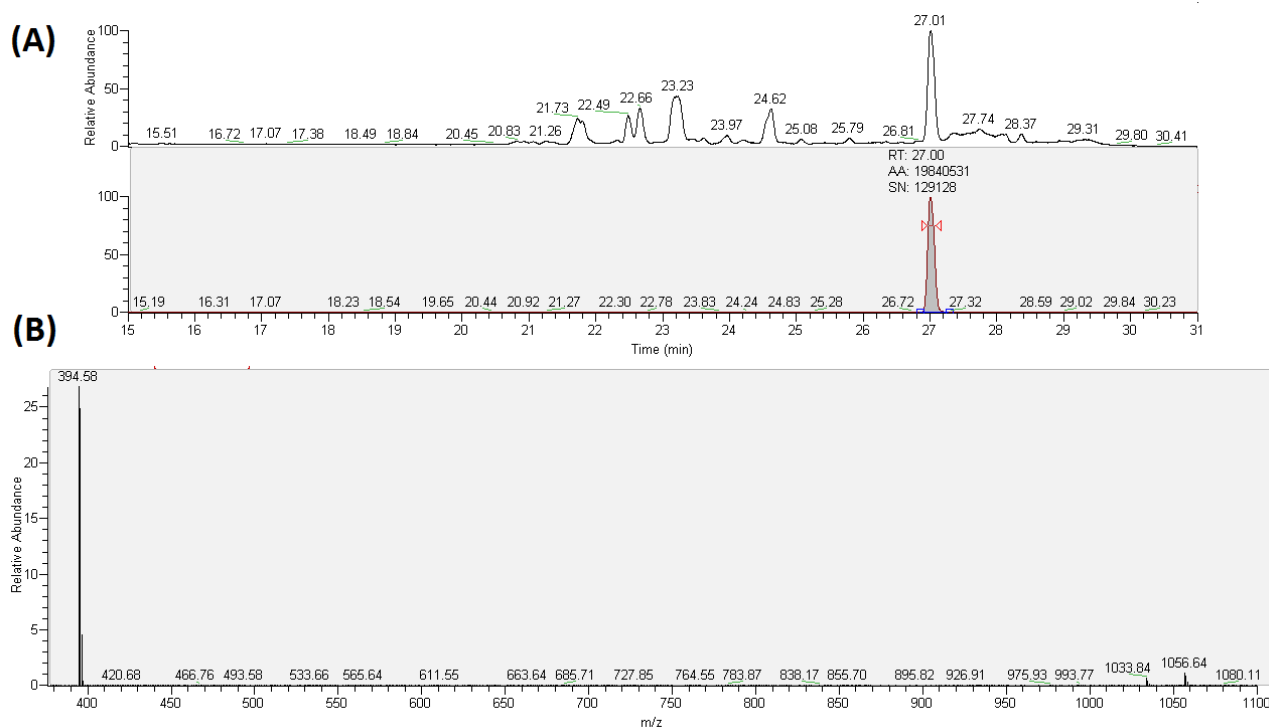
Diferencia de iones	Masa fragmento observado	Masa fragmento de referencia	Péptido
1050,27 – 825,24	225,03	225,23	Gln-Pro
1091,86 – 571,63	520,23	519,5	Asn-Tyr-Asn-Gln
<b>Iturina</b>	Asn- Tyr- Asn- Gln- Pro- Asn/Ser-Thr/Ser/Asn		



**Figura 56.** LC-MS/MS modo SIM del ión con m/z de 1094 del extracto de *B. subtilis* NB. (A) Cromatograma del ión con un RT de 5,38 min. (B) Iones obtenidos de la fragmentación del ión 1094 m/z.

**Tabla 23.** Fragmentos del ión con m/z de 1094, identificados mediante LC-MS/MS modo SIM del extracto de *B. subtilis* NB.

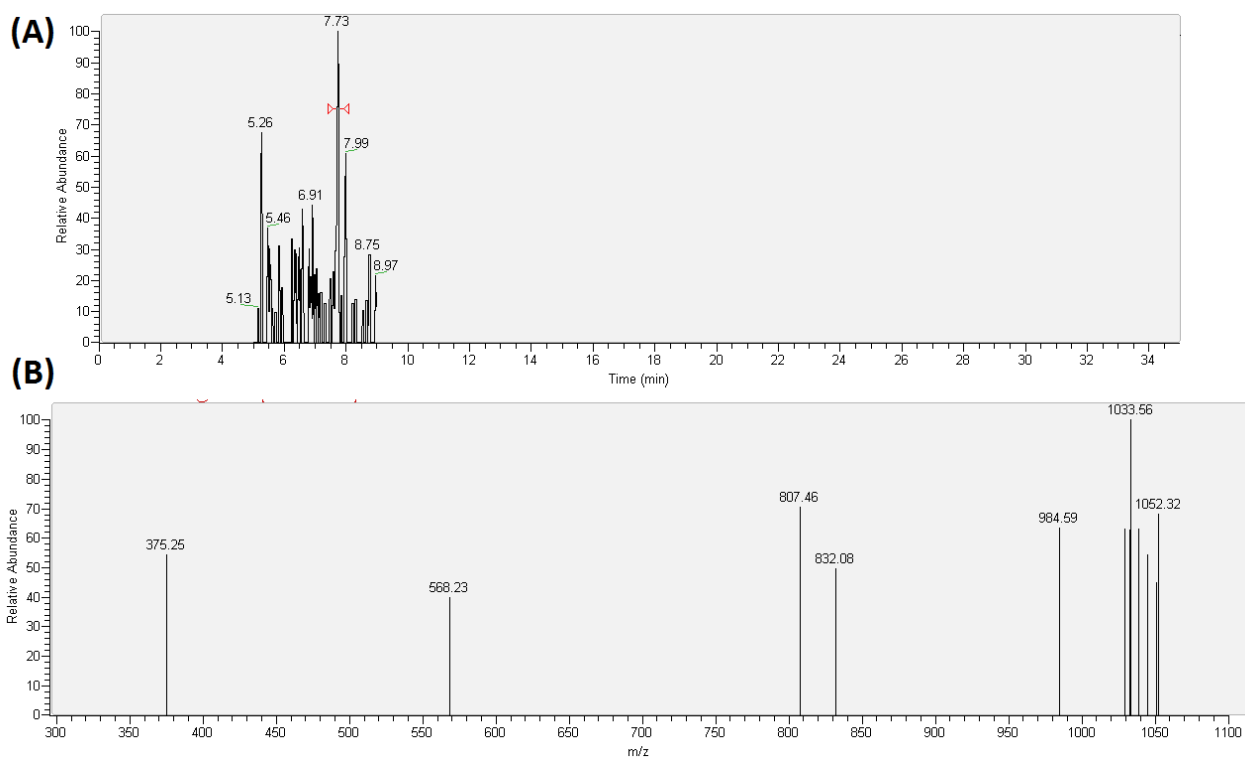
Diferencia de iones	Masa fragmento observado	Masa fragmento de referencia	Dipéptido
1065,83 – 864,68	201,15	201,1	<b>Ser - Asn</b>
1048,74 - 864,68	184,06	184,11	<b>Pro - Ser</b>
<b>Iturina (Mycosubtilin)</b>	<b>Asn- Tyr- Asn- Gln- Pro- Ser- Asn</b>		



**Figura 57. LC-MS/MS modo SIM del ión con m/z de 1056,6 del extracto de *B. subtilis* NB. (A)** Cromatograma del ión con un RT de 27 min. **(B)** Iones obtenidos de la fragmentación del ión 1056,6 m/z.

#### 5.4.2.2 LC-MS/MS modo SIM para el análisis estructural de los lipopéptidos presentes en el extracto de *B. pumilus* G2

Mediante LC-MS/MS modo fullscan se encontraron moléculas con pesos moleculares de 1083,6 m/z y 1017 m/z que corresponderían a lipopéptidos. Por consiguiente, se realizaron análisis estructurales utilizando LC-MS/MS modo SIM para cada una de las moléculas mencionadas. En la figura 58A, se observa que la molécula de 1083,6 m/z presenta un RT de 7,73 min. El espectro de masas de este ión (figura 58B) permitió deducir la presencia de los aminoácidos Ser, Asn, Pro y Glu, que forman parte de la estructura aminoácídica de las iturinas (tabla 25) (Bonmatin *et al*, 2003). En el caso de la molécula de 1017 m/z con un RT de 26,72 min (figura 59A), que podría corresponder a una surfactina, no se pudo deducir la secuencia del péptido cíclico, ya que en el proceso se obtuvieron pocos fragmentos: 693,67-709,96 y 989,99 m/z, que no permitieron determinar el tipo de aminoácidos que se encuentran en la molécula (figura 59B).

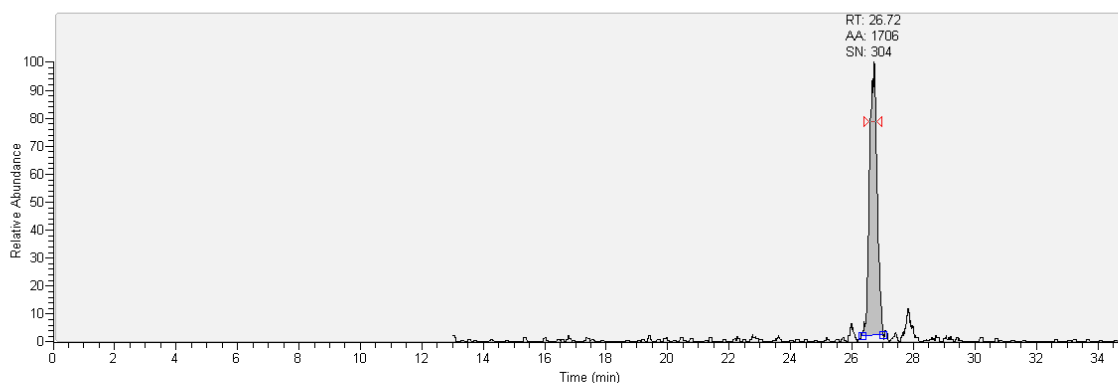


**Figura 58. LC-MS/MS modo SIM del ión con m/z de 1083,6 del extracto de *B. pumilus* G2. (A) Cromatograma del ión con un RT de 7,73 min. (B) Iones obtenidos de la fragmentación del ion 1083,6 m/z.**

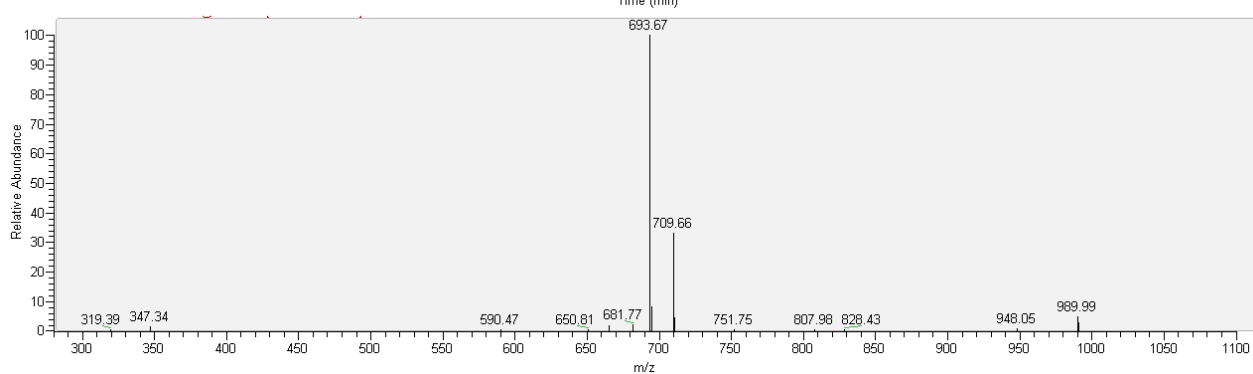
**Tabla 24. Fragmentos del ión con m/z de 1083,6 identificados mediante LC-MS/MS modo SIM del extracto de *B. pumilus* G2.**

Diferencia de iones	Masa fragmento observado	Masa fragmento de referencia	Dipéptido
1033,56 – 832,08	201,48	201,1	Ser – Asn
1033,56 - 807,46	226,1	226,22	Pro - Glu
1052,32 - 807,46	244,86	244,2	Asp – Glu

(A)



(B)



**Figura 59. LC-MS/MS modo SIM del i3n con m/z de 1017 del extracto de *B. pumilus* G2. (A) Cromatograma del i3n con un RT de 26,72 min. (B) Iones obtenidos de la fragmentaci3n del i3n 1017 m/z.**

En conclusión, *B. subtilis* NB es capaz de secretar moléculas antifúngicas correspondientes a lipopéptidos pertenecientes a la familia de las iturinas, fengicinas y surfactinas. Mientras que, *B. pumilus* G2 sólo secreta lipopéptidos pertenecientes a la familia de las iturinas y surfactinas (tabla 26).

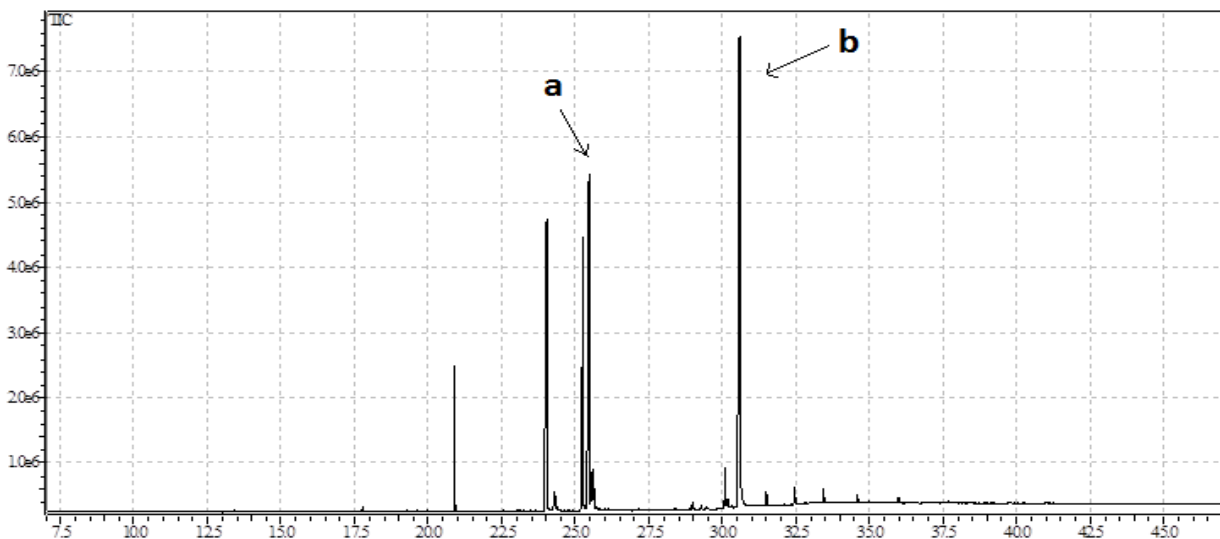
**Tabla 25. Resumen de los lipopéptidos encontrados en los extractos de *B. subtilis* NB y *B. pumilus* G2**

Microorganismo	Familia	m/z observado	Referencia
<i>B. subtilis</i> NB	Iturina	1073	Chen <i>et al</i> , 2007
		1079	Chen <i>et al</i> , 2007
	Fengicina	1464	Malfanova <i>et al</i> , 2012; Onega <i>et al</i> , 2008
		1478	Malfanova <i>et al</i> , 2012; Onega <i>et al</i> , 2008
		1492	Malfanova <i>et al</i> , 2012; Onega <i>et al</i> , 2008
		1506,2	Malfanova <i>et al</i> , 2012; Onega <i>et al</i> , 2008
	Surfactina	995	Malfanova <i>et al</i> , 2012; Onega <i>et al</i> , 2008
		1043	Malfanova <i>et al</i> , 2012; Onega <i>et al</i> , 2008
		1037	Malfanova <i>et al</i> , 2012; Onega <i>et al</i> , 2008
	<i>B. pumilus</i> G2	Iturinas	1083,7
	Surfactina	1017,8	Chen <i>et al</i> , 2007

### 5.4.3 Cromatografía de gases asociada a espectrometría de masas (GC-MS) para *B. subtilis* NB y *B. pumilus* G2

Para identificar los metabolitos más pequeños y volátiles presentes en los extractos, se utilizó la técnica GC-MS. El cromatograma obtenido del extracto de *B. pumilus* G2 muestra la presencia de 7 señales, 5 de estas pueden pertenecer a la molécula pyrrolo [1,2-a]pyrazine-1,4 dione, hexahydro 3(2 methylpropyl) también denominado ciclo-(Pro-Leu) y al analizar el espectro de cada una mediante la biblioteca NIST se observó que la molécula que eluye a los 25,46 min posee una probabilidad del 95,9% de ser este tipo de compuesto. Además, en el cromatograma se observaron las 2 señales restantes que podrían corresponder a la molécula pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4 dione, hexahydro 3( phenylmethyl) también denominado ciclo-(Pro-Phe) y al analizar los espectros de estas señales se observó que la molécula que eluye a los 30,58 min posee una probabilidad de 90,5% de pertenecer a esta molécula (figura 60).

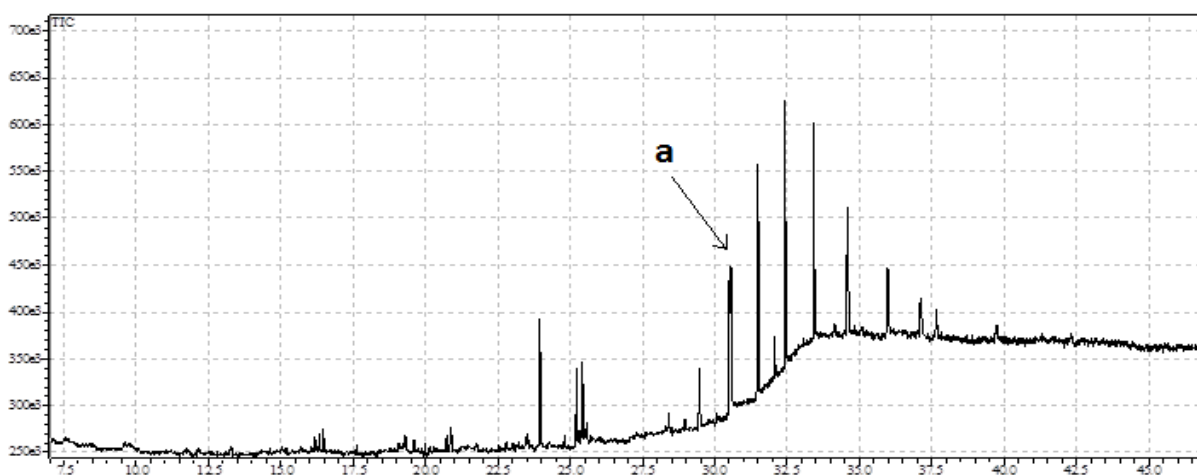
Los análisis de GC-MS para *B. subtilis* NB revelaron la presencia de 6 señales que pueden pertenecer a las siguientes estructuras: hexadecano y heptacosano. También se observó una molécula que eluye a los 30,54 min que posee un 88% de probabilidad de pertenecer a la estructura pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4 dione, hexahydro- 3-( phenylmethyl) también denominado ciclo-(Pro-Phe) (figura 61).



**Figura 60. Cromatograma (GC-MS) del extracto obtenido a partir del cultivo de *B. pumilus* G2.** Las flechas indican las moléculas: **a)** pyrrolo [1,2-a]pyrazine-1,4 dione, hexahydro 3(2 methylpropyl) con un RT de 25,46 min y **b)** pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4 dione, hexahydro 3( phenylmethyl) con un RT de 30,58 min.

**Tabla 26. TR de las señales cromatograficas obtenidas a partir del extracto obtenido de cultivos de *B. pumilus* G2.**

TR (min)	Nombre del compuesto	MF	RMF	Prob (%)
20,293	Pyrrolo [1,2-a]pyrazine-1,4 dione, hexahydro 3( 2 methylpropyl)	724	724	67,7
24,015	Pyrrolo [1,2-a]pyrazine-1,4 dione, hexahydro 3( 2 methylpropyl)	715	716	49,9
25,244	Pyrrolo [1,2-a]pyrazine-1,4 dione, hexahydro 3( 2 methylpropyl)	816	817	78,4
25,46	Pyrrolo [1,2-a]pyrazine-1,4 dione, hexahydro 3( 2 methylpropyl)	881	884	95,9
25,605	Pyrrolo [1,2-a]pyrazine-1,4 dione, hexahydro 3( 2 methylpropyl)	797	800	68,4
30,089	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4 dione, hexahydro 3( phenylmethyl)	895	899	87
30,581	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4 dione, hexahydro 3( phenylmethyl)	900	917	90,5



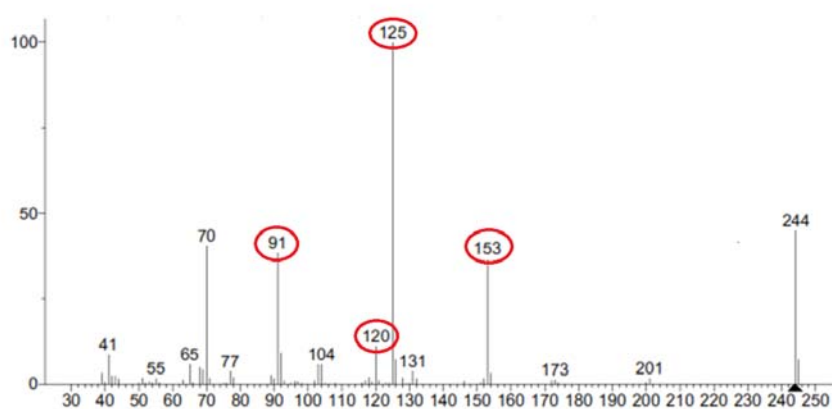
**Figura 61. Cromatograma (GC-MS) del extracto obtenido a partir del cultivo de *B. subtilis* NB. a) Molécula pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4 dione, hexahydro- 3-( phenylmethyl) con un RT de 30,54 min.**

**Tabla 27. TR de las señales cromatográficas obtenidas a partir del extracto de *B. subtilis* NB**

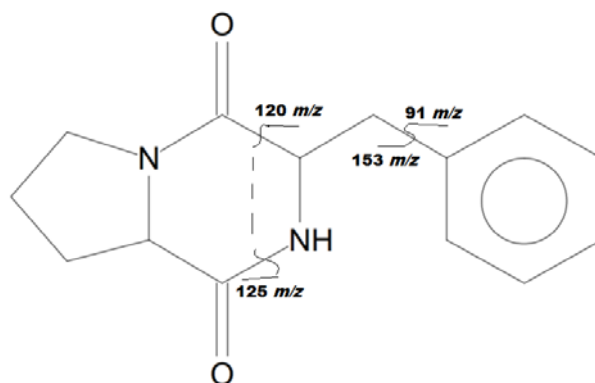
TR (min)	Nombre del compuesto	%Area	MF	RMF	Prob %
29,47	Hexadecano	3,36	840	846	5,63
30,5	Heptacosane	9,28	845	845	8,53
30,54	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine, 1,4-dione,hexahydro 3(phenylmethyl)	9,28	809	858	88
31,49	Heptacosane	13,12	902	902	15
32,447	Heptacosane	15,14	882	882	9,71
33,43	Heptacosane	14,11	890	890	12,8



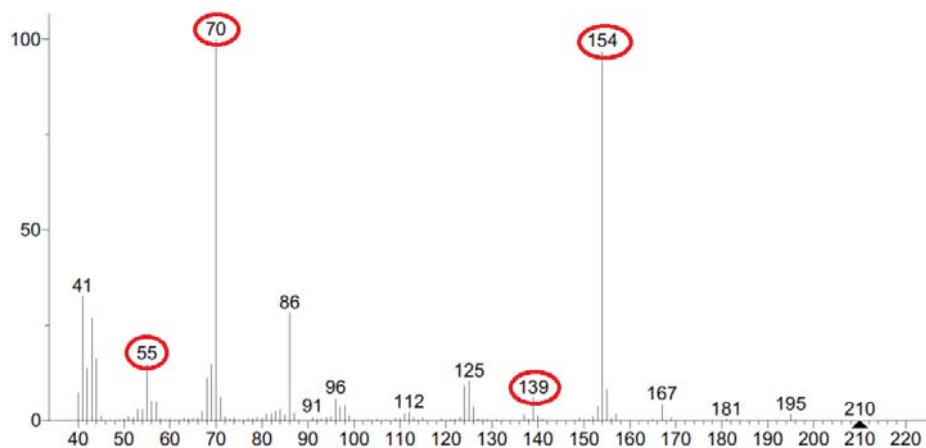
En el espectro obtenido de la molécula pirrolo [1,2-a]pyrazine-1,4 dione, hexahydro 3(phenylmethyl) se observaron las señales con m/z de 91, 120, 125 y 153 (figura 62) que pertenecen a los fragmentos de la molécula esquematizada en la figura 63. Para la molécula pirrolo[1,2-a]pyrazine, 1,4-dione,hexahydro 3 (2 methylpropyl) el espectro de masas mostró señales con m/z de 55, 70, 139 y 154 (figura 64) que corresponden a fragmentos de la molécula esquematizada en la figura 65.



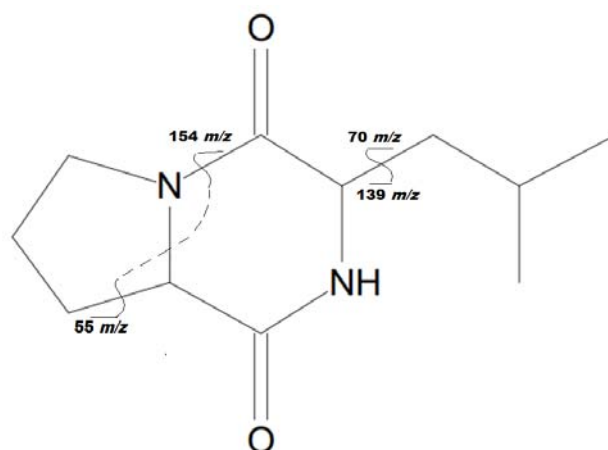
**Figura 62.** Espectro obtenido de la fragmentación de la molécula pirrolo [1,2-a]pyrazine 1,4-dione, hexahydro 3-(phenylmethyl). Los círculos indican los principales iones obtenidos de la fragmentación de la molécula



**Figura 63.** Representación esquemática de los fragmentos obtenidos para la molécula pirrolo [1,2-a] pyrazine 1,4 dione, hexahydro 3-(phenylmethyl). En la figura se indican el lugar donde se produce la fragmentación de la molécula.



**Figura 64.** Espectro obtenido de la fragmentación de la molécula [1,2-a] pyrazine- 1,4 dione, hexahydro 3(2 methylpropyl). Los círculos indican los principales iones obtenidos de la fragmentación de la molécula.



**Figura 65.** Representación esquemática de la molécula [1,2-a] pyrazine 1,4 dione, hexahydro 3(2 methylpropyl). En la figura se indican los sitios donde se produce la fragmentación de la molécula.

## 6. DISCUSIÓN

Un ecosistema se caracteriza por la gran diversidad de microorganismos que lo habitan, los que pueden variar según las condiciones climatológicas, las interacciones con otros organismos, la disponibilidad de nutrientes y algunos factores físicos y químicos. Es así como en un microecosistema sostenido por una planta, las poblaciones bacterianas varían según su capacidad de colonizar raíces, tallos, hojas, frutos u otro tejido vegetal (Martins *et al*, 2013). Es por esta razón que la identificación de microorganismos aislados desde cualquier ecosistema debe ser prolija. En el caso de la identificación de las 26 cepas bacterianas provenientes de un huerto orgánico (figura 2), fueron necesarios análisis filogenéticos, bioquímicos y morfológicos para su apropiada clasificación. Los análisis filogenéticos permitieron distribuir las secuencias bacterianas en dos clades denominados A y B. Adicionalmente, el clade A se subdividió en dos subclades que se denominaron A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> (figura 6). La comparación de las secuencias con las contenidas en las bases de datos de Genbank, reveló que las cepas del grupo A<sub>1</sub> presentan similitud con bacterias de la especie *Bacillus subtilis*, mientras que las cepas del grupo A<sub>2</sub> presentan similitud con *Bacillus pumilus*, y por su parte las cepas del grupo B presentan similitud con bacterias del género *Pseudomonas* (figuras 7-9). En la actualidad, existe una gran cantidad de publicaciones que describen cepas de *Bacillus subtilis* capaces de proteger la uva de mesa frente al ataque de *B. cinerea*. Sin embargo, *B. subtilis* QST713 es la única que ha logrado ser formulada y comercializada como el producto Serenade. Aunque, parte de las bacterias caracterizadas en nuestro laboratorio corresponden a la misma especie que Serenade, no implica que actúen del mismo modo, es por esta razón que se continuó trabajando con ellas y se procedió a analizar los tipos de moléculas que generan. En cuanto a la especie *B. pumilus*, en el mercado existe el biofungicida Sonata en base a *B. pumilus* QST 2808, y que se utiliza para el control de otros hongos tales como *Mycosphaerella fijensis* (Serrano *et al*, 2013) y *Phytophthora infestans* (Stephan *et al*, 2005). Para el caso de *Pseudomonas*, se han descrito las cepas *P. fluorescens* CHA0 y *P. aeruginosa* 7NSK2, que poseen la capacidad de inducir la resistencia sistémica (ISR) en vid, permitiendo la inhibición del crecimiento de *B. cinerea* vía mecanismos defensivos de la planta (Verhagen *et al*, 2011).

El análisis filogenético por sí solo no permite la diferenciación exacta entre especies estrechamente relacionadas, lo que puede conllevar a errores o confusiones en la clasificación

filogenética del microorganismo. Debido a que entre las especies *B. subtilis* y *B. pumilus* existe una relación estrecha dentro del género *Bacillus*, es necesario verificar estos resultados mediante la caracterización bioquímica y morfológica (Logan and De Vos, 2009). Los resultados obtenidos en los ensayos bioquímicos (tabla 10), en conjunto con la caracterización morfológica y estructural de las cepas bacterianas, permitieron confirmar que todas las bacterias pertenecen al género *Bacillus* y a las especies *B. subtilis* y *B. pumilus*.

La secreción y/o actividad de las moléculas antifúngicas en algunas bacterias es dependiente de las condiciones de crecimiento, tales como fuente de carbono, temperatura y pH (Mukherjee and Das, 2005). En nuestro caso, los ensayos revelaron que el medio óptimo para la secreción de las moléculas antifúngicas es el medio MTA y al agregar cualquier fuente de carbono adicional, se observó una disminución en la inhibición del crecimiento fúngico (figura 17). El aumento de la capacidad inhibitoria de las bacterias en medios menos nutritivos, puede deberse a que en condiciones de estrés nutricional se induce la síntesis de enzimas degradativas extracelulares y la producción de antibióticos (Dieckmann *et al*, 2001). Aunque estudios realizados por Islam *et al*, 2012 revelaron que para *B. subtilis* C9 el medio óptimo para la producción de los compuestos antifúngicos fue LB suplementado con manitol al 1% (p/v). Asimismo, en estudios realizados por Besson *et al*, 1987, se demostró que utilizando un medio mineral suplementado con fructosa, sacarosa o manitol, la producción de iturina A en *B. subtilis* aumentó sustancialmente. Por lo tanto, las condiciones óptimas de producción de moléculas antifúngicas pueden variar dependiendo de la cepa bacteriana utilizada. Adicionalmente, la variación de la fuente de carbono no tiene efecto significativo sobre el crecimiento bacteriano. Por lo tanto, los medios menos nutritivos donde la inhibición fúngica es mayor, pueden ser utilizados para el proceso de extracción sin que afecte negativamente el crecimiento bacteriano (figura 18).

La variación del pH influye en el potencial antifúngico de las bacterias, ya que al acidificar o alcalinizar el medio se acentúa la disminución de la inhibición del crecimiento antifúngico y el desarrollo de la bacteria, siendo pH 7.0, el óptimo para la secreción de estas moléculas antifúngicas (figuras 19 y 20). Este comportamiento también fue reportado en *B. subtilis* C9 y *B. subtilis* PY-1, donde se observó que la variación del pH afecta al crecimiento bacteriano y la síntesis de metabolitos que participan en la antibiosis, siendo pH 7 y 8 las condiciones óptimas para la secreción de estas moléculas (Gong *et al*, 2006; Islam *et al*, 2012).

Para la variación de la temperatura se observó una mayor inhibición en el crecimiento fúngico a los 25°C (figuras 21 y 22). Adicionalmente, con la cuantificación de las U.F.C. de cada bacteria, se demostró que el crecimiento bacteriano aumenta a medida que se incrementa la temperatura (figura 23). Sin embargo, en nuestro estudio a los 30 °C se observó que *B. cinerea* posee un escaso desarrollo, ya que el crecimiento de esta especie fúngica es óptimo a 20°C y es completamente inhibido a 35°C (Ahmed *et al*, 2007; Hosen *et al*, 2010). Por lo tanto, las condiciones óptimas para la inhibición del crecimiento de *B. cinerea* y para la posterior extracción de moléculas antifúngicas secretadas por las cepas bacterianas son el medio MTA, pH7 y 25°C.

Los bioensayos *in vivo* realizados en hojas de poroto y uva de mesa revelaron que *B. subtilis* NB y *B. pumilus* G2 poseían una mayor capacidad protectora que Serenade frente al ataque de *B. cinerea* 149 (figura 24 A-26). Una de las características esenciales que deben cumplir los biocontroladores es su capacidad de inhibir el desarrollo del patógeno sin dañar el tejido vegetal, lo cual se pudo observar tanto para *B. subtilis* NB y *B. pumilus* G2, ya que al realizar los controles en hojas y frutos sin aplicación de esporas fúngicas, se observó que las bacterias no produjeron ningún tipo de alteración en el tejido vegetal (figura 24 B-25). Investigadores de la Universidad de California estudiaron la eficacia de Serenade para el control de *B. cinerea* en uva Chardonnay. Se realizaron 4 aplicaciones entre junio y septiembre del 2010 y se observó la presencia del hongo en un 40% de las bayas no tratadas, mientras que en las bayas tratadas con Serenade se observó una incidencia del 25% de la infección del hongo (Ian *et al*, 2010). Por lo que Serenade fue capaz de reducir en un 50% la infección del tejido vegetal por la acción de *B. cinerea*.

La obtención de moléculas con capacidad antifúngica se realizó por extracción clorofórmica para *B. pumilus* G2 y por extracción con acetato de etilo para *B. subtilis* NB, observándose un efecto inhibitorio sobre el crecimiento fúngico al ser utilizadas en bioensayos (figuras 28 y 29). La diferencia observada en el potencial antifúngico de ambos extractos depende de la naturaleza química de las moléculas antifúngicas que sea capaz de secretar el microorganismo y del solvente orgánico utilizado para la extracción. Para cepas de *B. subtilis* se ha reportado que la utilización de solventes más polares tales como acetato de etilo (Islam *et al*, 2012), butanol (Romero *et al*, 2007) o metanol (Pathak *et al*, 2012), permiten la obtención de compuestos pertenecientes a la familia de los lipopéptidos. Por otro lado, se obtuvieron distintos compuestos antifúngicos a partir de la cepa *B. pumilus* MAIIM4 al utilizar extracciones sucesivas

con hexano, diclorometano y acetato de etilo, obteniéndose compuestos de distinta naturaleza según el solvente utilizado, los que tenían la capacidad de inhibir en distinto grado el desarrollo de los hongos *Pythium aphanidermatum*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* (Pereira de Melo *et al.*, 2009).

Varias especies de *Bacillus* son capaces de producir enzimas micolíticas (quitinasas y glucanasas). Se han reportado varias cepas de la especie *B. subtilis* que son capaces de secretar quitinasas, entre ellas *B. subtilis* JN032305 (Shivakumar *et al.*, 2014) y *B. subtilis* SG6 (Zhao *et al.*, 2014), *B. subtilis* SL-13 (Liu *et al.*, 2011) y *B. subtilis* NPU 001 (Chang *et al.*, 2009). También existen reportes de la presencia de este tipo de enzimas en la especie *B. pumilus* como por ejemplo, *B. pumilus* SG2 (Ahmadian *et al.*, 2007) y *B. pumilus* U5 (Tasharrofi *et al.*, 2011). Para la producción de  $\beta$ -1,3-glucanasa se han reportado bacterias del género *Bacillus* tales como *B. clausii* NM-1 (Miyanishi *et al.*, 2003) y *B. circulans* YK9 (Kanazawa *et al.*, 1994), sin embargo no existen reportes de su síntesis para las especies *B. subtilis* y *B. pumilus*. Se determinó de forma cualitativa la presencia de las enzimas quitinasa y  $\beta$ -1,3-glucanasa para *B. subtilis* NB y *B. pumilus* G2. Ambas bacterias producen enzimas con actividad quitinasa, mientras que la actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa solo fue producida por *B. pumilus* G2 (figuras 32 y 33). Por lo tanto, estas enzimas podrían participar en la inhibición de *B. cinerea*, lo que ofrecería mecanismos de defensa adicionales frente al ataque de este hongo, aumentando el atractivo comercial de estas cepas. Sin embargo, estos ensayos son de naturaleza cualitativa por lo que se deben realizar ensayos adicionales que permitan confirmar estos resultados.

Se identificaron los lipopéptidos presentes en los extractos orgánicos utilizando la técnica LC-MS/MS modo fullscan que permite determinar el peso molecular de los iones, ya que este método produce una escasa fragmentación, lo que permite la obtención y visualización del ion completo. Para la deducción de los aminoácidos que conforman los lipopéptidos se utilizó LC-MS/MS modo SIM que permite la monitorización selectiva de los iones encontrados con la metodología fullscan. Mediante esta técnica se obtiene una mayor fragmentación del ión y se puede deducir de manera más exacta la estructura aminoácidica de este. Los lipopéptidos cíclicos son sintetizados por varias especies del género *Bacillus*, principalmente por cepas de la especie *B. subtilis* tales como, *B. subtilis* HC8 (Malfanova *et al.*, 2012), *B. subtilis* JA (Chen *et al.*, 2008) y *B. subtilis* GA1 (Touré *et al.*, 2004) que son capaces de producir los 3 tipos de familias de lipopéptidos (iturinas, fengicinas y surfactinas). Mientras que para las demás especies, la

producción de lipopéptidos parece estar más restringida. La producción de iturinas ha sido reportada principalmente por cepas de la especie *B. amyloliquefaciens* (Kuomoustsi *et al*, 2004). La familia de las surfactinas y sus variantes relacionadas han sido aisladas principalmente desde las especies *B. coagulans* (Huszcza and Burczyk, 2006), *B. pumilus* y *B. licheniformis* (Peypoux *et al*, 1999). Mientras que, la producción de fengicinas fue identificada principalmente en las especies *B. cereus*, *B. thuringiensis* y *B. amyloliquefaciens* (Ongena and Jacques, 2008). En la familia de las fengicinas los homólogos más comúnmente sintetizados por *B. subtilis* son las fengicinas A y B, sin embargo se ha observado la presencia de otros homólogos tales como fengicina A2, B2 y C (Pathak *et al*, 2012). En contraste, no se ha reportado en *B. pumilus* la síntesis de este tipo de moléculas, lo cual coincide con lo descrito en esta tesis, ya que en el extracto de *B. pumilus* G2 no se observó la presencia de fengicinas. En el extracto metanólico de *B. subtilis* NB se encontraron iones con m/z de 1478, 1492 y 1505,9 mediante LC-MS/MS modo fullscan, los que se pueden clasificar en la familia de las fengicinas (figuras 40 y 41; tablas 13 y 14). Posteriormente, mediante LC-MS/MS modo SIM se determinaron los aminoácidos que forman parte de la estructura de los iones, lo que permitió clasificarlos como fengicinas B. Estas moléculas poseen idéntica secuencia aminoacídica, pero varían en el largo de la cadena de ácidos grasos (figuras 46-48). Según lo reportado por Malina and Shai (2005), la variación del largo de la cadena de ácidos grasos tiene directa relación con su potencial antifúngico, ya que mientras más larga sea la cadena alifática mayor será el potencial antifúngico del lipopéptido. Sin embargo, para la molécula con m/z de 1464 que podría pertenecer a las fengicinas A, no se pudo dilucidar la estructura de la molécula debido a su escasa fragmentación (figura 49).

Para la familia de las surfactinas, se encontró en el extracto metanólico de *B. subtilis* NB iones con m/z de 995, 1037 y 1043 mediante LC-MS/MS modo fullscan (figuras 41 y 42; tablas 14 y 15). Luego estos iones fueron analizados mediante LC-MS/MS modo SIM y se obtuvieron fragmentos que permitieron deducir la presencia de aminoácidos estructurales de las surfactinas. Estas moléculas contendrían la misma estructura peptídica, pero se diferencian en el largo de la cadena de ácidos grasos, donde la molécula con m/z de 1037 posee tres C más que la surfactina de m/z 995, con mayor actividad antifúngica, debido a que posee la cadena hidrocarbonada más larga (Malina and Shai, 2005) (figuras 51-53). En el caso *B. pumilus* G2, se encontró una molécula de 1017 m/z, que podría corresponder a una surfactina, pero no se pudo determinar qué tipo de aminoácidos forman parte del péptido cíclico, ya que en el proceso de rompimiento se obtuvieron

pocos fragmentos para analizar (figura 59 y tabla 16). Para *B. pumilus* solamente se ha reportado la presencia pumilacidinas que son lipopéptidos homólogos a la surfactinas, pero que presentan variaciones en los residuos aminoácidos 4 y 7 (Pereira de Melo *et al*, 2009).

Finalmente, mediante LC-MS/MS modo fullscan se encontraron en el extracto metanólico de *B. subtilis* NB iones con m/z de 1056, 1079 y 1094 que podrían pertenecer a la familia de las iturinas (figuras 40 y 41; tablas 13 y 14). En primer lugar, se analizó mediante LC-MS/MS modo SIM la molécula con m/z 1079,9 que presentó aminoácidos característicos de la familia iturinas, sin embargo el análisis no permitió establecer a que variante de la familia pertenece, pudiendo corresponder a iturina A, micosubtililina o bacilomicina F (figura 55 y tabla 23). Para la molécula de 1094 m/z, los fragmentos generados por la ruptura del enlace peptídico, permitirían clasificarla como una micosubtililina, debido a que los aminoácidos y el orden de estos en la molécula son característicos para este tipo de iturina (Nasir and Besson, 2012) (figura 56 y tabla 24). Estas variantes poseen un gran potencial antifúngico, sin embargo entre ellas se han observado algunas diferencias en sus propiedades que están determinadas por el orden en que se disponen los aminoácidos y el tipo de aminoácido que poseen estas moléculas. Por ejemplo, entre la micosubtililina y la iturina A, se produce una inversión de los residuos aminoácidos Ser<sup>6</sup> –Asn<sup>7</sup> produciendo que la micosubtililina posea un mayor potencial antifúngico que la iturina A. Mientras que, el cambio de Asn<sup>1</sup> por Asp<sup>1</sup> en las iturinas produce la inactivación del lipopéptido (Bonmatin *et al*, 2003). Finalmente, la fragmentación de la molécula con un m/z de 1056,6 no permitió deducir la estructura del lipopéptido, aún cuando su m/z indicaría que podría corresponder a una iturina (figura 57). En el caso de *B. pumilus* G2, el extracto metanólico presentó un ion con m/z de 1083,6 y se dedujo la presencia de los aminoácidos que han sido descritos previamente como parte estructural de las iturinas. Sin embargo, no fue posible obtener el orden de estos aminoácidos en la secuencia del péptido cíclico, ya que sólo se observó la pérdida de residuos individuales, los que podrían estar presentes en cualquier posición. Es por esta razón que no es posible clasificar esta molécula dentro de los distintos homólogos de iturinas (figura 58 y tabla 25).

La identificación de metabolitos más pequeños presentes en los extractos, se realizó utilizando la técnica GC-MS. En el cromatograma obtenido del extracto metanólico de *B. pumilus* G2 y *B. subtilis* NB (figuras 60 y 61), se observaron señales que pueden pertenecer a las moléculas pyrrolo [1,2-a]pyrazine-1,4 dione, hexahydro 3-(phenylmethyl), también designada



como ciclo(Pro-Phe). Mientras que, solamente para *B. pumilus* G2 se observó la presencia de la molécula pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4 dione, hexahydro (2 methylpropyl), también designada como ciclo(Pro-Leu) (tablas 27 y 28). Según lo reportado estas moléculas son derivados de las 2,5-dicetopiperazinas y formarían parte de la familia de los dipéptidos cíclicos. Se caracterizan por poseer diversas actividades biológicas tales como, antimicrobianas, antifúngicas, antitumorales y antivirales, entre otras (Martins and Carvalho, 2007). El péptido ciclo(Phe-Pro) es una molécula antifúngica capaz de inhibir a varias especies tales como, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Ganoderma boninense* y *Penicillium notatum* (McClelland *et al*, 2004). Mientras que el péptido ciclo(Leu-Pro) ha mostrado la capacidad de inhibir a *C. albicans* y *Cryptococcus neoformans* (Rhee, 2004). Wang *et al*, 2010 reportó que *B. subtilis* sp 13-2 obtenida a partir de sedimentos marinos fue capaz de producir ciclo (L-Pro-D-Phe) que inhibe la acción de *Staphylococcus* y *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Mientras que estudios realizados por Martinez-Luis *et al*, 2012 revelaron que *B. pumilus* GL0057 de origen marino fue capaz de sintetizar ciclo-(L-Pro-L-Leu) y ciclo-(L-Pro-L-Phe). Sin embargo, fue incapaz de inhibir el crecimiento de los parásitos *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium falciparum* y *Leishmania donovani*. Por lo tanto, las bacterias del género *Bacillus* son capaces de producir dipéptidos cíclicos, pero no se ha reportado su efectividad contra *B. cinerea*.

En el caso del extracto metanólico obtenido de *B. subtilis* NB, se observaron 6 señales, las que pueden pertenecer a moléculas del tipo hexadecano y heptacosano. Según lo reportado por Zhang *et al*, 2013 la molécula hexadecano inhibe el crecimiento de *B. cinerea* sólo en un 4,6%, por lo tanto los hexadecanos y heptacosanos encontrados no serían potenciales agentes fungitóxicos.

## 7. CONCLUSIONES

- El análisis filogenético, bioquímico y morfológico permitió identificar las 26 bacterias silvestres aisladas desde un huerto orgánico. Estas cepas bacterianas pertenecen a las especies *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* y *Pseudomonas fluorescens*.
- La variación del medio de cultivo en los bioensayos *in vitro* permitió concluir que las condiciones óptimas de desarrollo de la actividad antifúngica de las bacterias frente a *B. cinerea* 149 son: medio de cultivo MTA (extracto de malta 2%, triptona 0,1% y agar-agar 1,5%), pH 7 y 25°C.
- Las cepas *B. subtilis* NB y *B. pumilus* G2 poseen un mayor efecto protector que Serenade sobre la superficie vegetal de hojas y frutos, lo que demuestra su gran potencial antifúngico. Dichas cepas bacterianas no produjeron efectos negativos sobre el tejido vegetal.
- Mediante los análisis de LC-MS/MS se pudo identificar los lipopéptidos cíclicos secretados por las bacterias. *B. subtilis* NB es capaz de producir lipopéptidos perteneciente a la familia de las iturinas, fengicinas y surfactinas. Mientras que, *B. pumilus* G2 secreta lipopéptidos pertenecientes a la familia de las iturinas y surfactinas. Además, dentro de cada familia se observó la presencia de varios homólogos que difieren principalmente en el largo de la cadena de ácidos grasos, lo que otorga una mayor versatilidad para el ataque antifúngico.
- Mediante los análisis de GC-MS se pudo observar la presencia de dipéptidos cíclicos que no han sido descritos para Serenade y son poco abundantes dentro del género *Bacillus*. *B. subtilis* NB es capaz de producir el dipéptido ciclo-(Pro-Leu), mientras que *B. pumilus* G2 produce los dipéptidos ciclo-(Pro-Leu) y ciclo-(Pro-Phe).
- Los ensayos cualitativos en agar laminarina y quitina permitieron detectar la presencia de la enzima  $\beta$ -1,3-glucanasa en *B. pumilus* G2, mientras que la enzima quitinasa se detectó tanto en *B. subtilis* NB como en *B. pumilus* G2. Sin embargo, la capacidad para secretar estas enzimas debe ser corroborada mediante análisis cuantitativos.

- Los resultados de esta tesis verifican que *B. subtilis* NB y *B. pumilus* G2 exhiben actividad antifúngica contra *B. cinerea* de mayor eficacia que Serenade, lo que podría permitir su utilización como biofúngicida para el control biológico de este hongo en uva de mesa.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

Ahmadian G, Degrassi G, Venturi V, Zeigler D, Soudi M and Zanguinejad P (2007) *Bacillus pumilus* SG2 isolated from saline conditions produces and secretes two chitinases. J Appl Microbiol. 4: 1081-1089.

Ahmed A, Pande A, Basandrai G, Kishore K and Rao J (2007) Variation in isolates of *Botrytis cinerea* causing *Botrytis* gray mold in chickpea. Bangladesh J Agric Res. 32: 135-143.

Alamri S, Hashem M and Mostafa Y (2012) *In vitro* and *in vivo* biocontrol of soil-borne phytopathogenic fungi by certain bioagents and their possible mode of action. Biocontrol Sci. 17: 155-167.

Arguelles-Arias A, Onega M, Halimi B, Lara Y, Brans A, Joris B and Fickers P (2009) *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. Microb Cell Fact. 8: 63

Barth A (2007) Infrared spectroscopy of proteins. Biochim Biophys. 1767: 1073-1101.

Bay I, Eynard J and Gubler D (2010) Evaluation of fungicide programs for management of *Botrytis* bunch rot of grapes: 2010 field trial. Department of plant pathology, University of California. CA 95616.

Besson F, Chevanet C and Michel G (1987) Influence of the culture medium on the production of iturin A by *Bacillus subtilis*. Journal of general microbiology. 133: 767-772.

- Bonmatin J, Laprévotte O and Peypoux F (2003) Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. *Comb Chem High Throughput Screen.* 6: 541–556.
- Bravo J (2013) Uva de mesa: se ratifica liderazgo exportador mundial de Chile. Publicación de la Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (Odepa) del Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile.
- Buchoux S, Lai-Kee-Him J, Garnier M, Tsan P, Besson F, Brisson A and Dufourc E (2008) Surfactin-triggered small vesicle formation of negatively charged membranes: A novel membrane-lysis mechanism. *Biophys J.* 95: 3840-3849.
- Buck J (2004) Combinations of fungicides with phylloplane yeasts for improved control of *Botrytis cinerea* on geranium seedlings. *Phytopathology* 94: 196-202.
- Burin V, Arcari S, Costa L and Bordignon-Luiz M (2011) Determination of some phenolic compounds in red wine by RP-HPLC: Method development and validation. *J Chromatogr Sci.* 49: 647-651.
- Cazorla F, Romero D, Pérez-García A, Lugtenberg B, Vicente A and Bloemberg G (2007) Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strain from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. *J Appl Microbiol* 103: 1950-1959.
- Chang W, Chen M and Wang S (2009) An antifungal chitinase produced by *Bacillus subtilis* using chitin waste as a carbon source. *World J Microbiol Biotechnol.* 26: 945-950.
- Chen H, Wang L, Su C, Gong G, Wang P and Yu Z (2008) Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. *Lett Appl Microbiol* 47: 180-186.
- Choquer M, Fournier E, Kunz C, Levis C, Pradier JM, Simon A and Viaud M (2007) *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *FEMS Microbiol Lett* 277: 1-10.

Collemare J, Pianfetti M, Houle A, Morin D, Camborde L, Gagey M.J, Barbisan C, Fudal I, Lebrun M and Bohnert H (2008) *Magnaporthe grisea* avirulence gene ACE1 belongs to an infection-specific gene cluster involved in secondary metabolism. *New Phytol.* 179: 196–208.

Cotoras M, Folch C and Mendoza L (2004) Characterization of the antifungal activity on *Botrytis cinerea* of the natural diterpenoid kaurenoic acid and 3  $\beta$ -hydroxykaurenoic acid. *J Agric Food Chem.* 52: 2821-2826.

Cserhati T and Forgacs E (1997) Trends in thin-layer chromatography: 1997. *J Chromatogr Sci.* 35: 383-391.

Dandurishvili N, Toklikishvili N, Ovadis M, Eliashvili P, Giorgobiani N, Keshelava M, Tediashvili M, Vainstein A, Khmel I, Szegedi E and Chernin L (2010) Broad-range antagonistic rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Serratia plymuthica* suppress *Agrobacterium* crown gall tumours on tomato plants. *J Appl Microbiol.* 110: 341-352.

Dieckmann R, Pavela-Vrancic and Döhren H (2001) Synthesis of (di)-adenosine polyphosphates by non-ribosomal peptide synthetases (NRPS). *Biochem Biophys Res Commun.* 284: 234–241.

Ekmer P and Reglinski (2006) Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathol* 55: 155-177.

Errington J (2003) Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat Rev Microbiol.* 1: 117-126.

Furuya S, Mochizuki M, Aoki Y, Kobayashi H, Takayanagi T, Shimizu M and Suzuki S (2011) Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* KS1 for the biocontrol of grapevine fungal diseases. *Biocontrol Sci Technol.* 21: 705-720.

Gaussier H, Lavoie M and Subirade M (2003) Conformational changes of pediocin in an aqueous medium monitored by Fourier transform infrared spectroscopy: a biological implication. *Int J Biol Macromolec.* 32: 1-9.

Gong M, Wang J, Zhang J, Yang H, Lu X, Pei Y, Cheng J (2006) Study of the antifungal ability of *Bacillus subtilis* strain PY-1 in vitro and identification of the antifungal substance (iturin A). *Acta Biochim Biophys Sin.* 38: 233-240.

Greaves J and Roboz J (2014) Methodologies and strategies. In: *Mass spectrometry for the novice*. CRC Press, Tylor and Francis group. Florida, USA. pp 164-165.

Guetsky R, Shtienberg D, Elad Y and Dinoor A (2001) Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. *Phytopathology.* 91: 621-627.

Have A, Espino J, Dekkers E, Sluyter V, Brito N, Kay J, González C and Kan J (2010) The *Botrytis cinerea* aspartic proteinase family. *Fungal Genet Biol* 47: 53-65.

Heerklotz H and Seelig J (2007) Leakage and lysis of lipid membranes induced by the lipopeptide surfactin. *Eur Biophys J.* 36: 305-314.

Hosen M, Ahmed A and Islam R (2010) Variability and pathogenicity in Bangladeshi isolates of *Botrytis cinerea* causing botrytis gray mold in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Pathol J.* 9: 118-123.

Huszcza E and Burczyk B (2006) Surfactin isoforms from *Bacillus coagulans*. *Z Naturforsch.* 61: 727-733.

Ian S, Eynard J and Gubler D (2010) Evaluation of fungicide programs for management of *Botrytis* bunch rot of grapes: 2010 field trial. Department of plant pathology, University of California, CA95616.

Islam R, Jeong Y, Lee Y and Song C (2012) Isolation and identification of antifungal compounds from *Bacillus subtilis* C9 inhibiting the growth of the plant pathogenic fungi. *Mycobiology* 40: 59-66.

- Jain D, Collins-Thompson D and Trevors J (1991) A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. *J Microbiol Meth.* 13: 271-279.
- Jurick WM II and Rollins JA (2007) Deletion of the adenylate cyclase (*sac1*) gene affects multiple developmental pathways and pathogenicity in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Genet Biol* 44: 521–530.
- Kanazawa Y, Kurasawa T, Kanegae Y, Harada A and Harada T (1994) Purification and properties of a new exo-(1 → 3)-β-D-glucanase from *Bacillus circulans* YK9 capable of hydrolysing resistant curdlan with formation of only laminari-biose. *Microbiology* 140: 637-642.
- Klotz L, Zimm BH (1972) Size of DNA determined by viscoelastic measurements: results on bacteriophages, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* 72: 779–800.
- Koumoutsi A, Chen X, Henne A, Liesegang H, Hitzeroth G, Franke P, Vater J and Borriss R (2004) Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J Bacteriol.* 4: 1084-1096.
- Kowall M, Vater J, Kluge T, Stein P and Ziessow D (1998) Separation and characterization of surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. *J Colloid Interface Sci.* 204: 1-8.
- Kretschmer M, Leroch M, Mosbach A, Walker A, Fillinger S, Mernke D, Schoonbeek H, Pradier J, Leroux P and Waard M (2009) Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field populations of the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. *PLoS Pathogens* 5: 1-13.
- Latorre B, Lillo C y Rioja M (2001) Eficacia de los tratamientos fungicidas para el control de *Botrytis cinerea* de la vid en función de la época de aplicación. *Cienc Investig Agrar.* 28: 61-66.
- Latorre B y Torres R (2012) Prevalence of isolates of *Botrytis cinerea* resistant to multiple fungicides in Chilean vineyards. *Crop Prot.* 40: 49-52.

Leroux P (2007) Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. In *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Edited by Elad Y, Williamson B, Tudzynski P and Delen N. Springer pp 195-217.

Lindow S and Brandl M (2003) Microbiology of the Phyllosphere. *Appl Environ Microbiol* 69: 1875-1883.

Liu B, Huang L, Buchenauer H, Kang Z (2010) Isolation and partial characterization of an antifungal protein from the endophytic *Bacillus subtilis* strain EDR4. *Pestic Biochem Physiol*. 98: 305-311.

Liu Y, Tao J, Yan Y, Li H and Li C (2011) Biocontrol efficiency of *Bacillus subtilis* SL-13 and characterization of an antifungal chitinase. *Chinese J Chem Eng*. 19: 128-134.

Logan N and De Vos P (2009) Genus *Bacillus*. In: De Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg N, Ludwig W, Rainey F, Schleifer K and Whitman W (Eds). *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*. Second edition, Vol 3. New York, Springer. pp 305-316.

Maiwald M, Kappe R and Sonntag H (1994) Rapid presumptive identification of medically relevant yeasts to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *Med Vet Mycol*. 32: 115–22.

Malfanova N, Franzil L, Lugtenberg B, Chebotar V and Onega M (2012) Cyclic lipopeptide profile of the plant-beneficial endophytic bacterium *Bacillus subtilis* HC8. *Arch Microbiol* 194: 893-899.

Malina A and Shai Y (2005). Conjugation of fatty acids with different lengths modulates the antibacterial and antifungal activity of a cationic biologically inactive peptide. *Biochem J*. 390: 695-702.

Marrone P (2002) An effective fungicide with novel modes of action: Viewpoint. *Pesticide outlook*. October: 193-194.



Martínez-Luis S, Gómez J, Spadafora C, Guzmán H and Gutiérrez M (2012) Antitrypanosomal alkaloids from the marine bacterium *Bacillus pumilus*. *Molecules*. 17: 11146-11155.

Martins M and Carvalho I (2007) Diketopiperazines: biological activity and synthesis. *Tetrahedron* 63: 9923-9932.

Martins G, Lauga B, Miot-Sertier C, Mercier A, Lonvaud A, Soulas L, Soulas G and Masneuf-Pomarede I (2013) Characterization of epiphytic bacterial communities from grapes, leaves, bark and soil grapevine plants grown, and their relations. *PLoS One* 8:e73013.

McClelland K, Milne P, Lucieto F, Frost C, Brauns S, Van De Venter M, Du Plessis J and Dyason K (2004) An investigation into the biological activity of the selected histidine containing diketopiperazines cyclo(His-Phe) and cyclo(His-Tyr). *J. Pharm. Pharmacol.* 56: 1143–1153.

Miyanishi N, Hamada N, Kobayashi T, Imada C and Watanabe E (2003). Purification and characterization of a novel extracellular  $\beta$ -1,3-glucanase produced by *Bacillus clausii* NM-1 isolated from ezo abalone *Ilaliothis discus hannai*. *J Biosci Bioeng.* 95: 45-51.

Mohamed E, Taha A, Rigano L, Abdelbasset E, Rodriguez M, Daayf F, Vojnov A and Kamal B (2011) *Botrytis cinerea* manipulates the antagonistic effects between immune pathways to promote disease development in tomato. *The Plant Cell* 23: 2405-2421.

Mukherjee A and Das K (2005) Correlation between diverse cyclic lipopeptides production and regulation of growth and substrate utilization by *Bacillus subtilis* strains in a particular habitat. *FEMS Microbiol Ecol.* 54: 479-489.

Mukherjee A, Mandal S, Mukhopadhyay B, Mandal N and Sil A (2014) Bioactive compound from *Pseudomonas synxantha* inhibits the growth of mycobacteria. *Microbiol.* 169: 794-802.

Nasir M and Besson F (2012) Interactions of the antifungal mycosubtilin with ergosterol-containing interfacial monolayers. *Biochim Biophys Acta.* 1818: 1302-1308.

Nawrocka J and Malolepsza U (2013) Diversity in plant systemic resistance induced by *Trichoderma*. Biol Control. 67: 149-156.

Norris J, Berkeley C, Logan N, O'Donnell G (1981) The genera *Bacillus* and *Sporolactobacillus*. In: Starr M, Stolp A, Truper A, Balows A, and Schlegel H (Eds) The prokaryotes, Vol 2. Berlin, Springer. pp 1711-1742.

Ongena M, Jacques P, Touré Y, Destain J, Jabrane A, Thonart P (2005) Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. Appl Microbiol Biotechnol. 69: 29-38.

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

Pathak K, Keharia H, Gupta K, Thakur S and Balaram P (2012) Lipopeptides from the Banuan Endophyte *Bacillus subtilis* K1: Mass spectrometric characterization of a library of Fengycins. J Am Soc Mass Spectrom. 23: 1716-1728.

Pathak K and Keharia H (2014) Identification of surfactins and iturins produced by potent fungal antagonist, *Bacillus subtilis* K1 isolated from aerial roots of banyan (*Ficus benghalensis*) tree using mass spectrometry. 3 Biotech. 4: 283-295.

Patil R, Ghromade V and Deshpande M (2000) Chitinolytic enzymes: an exploration. Enzyme Microb Technol. 26: 473-483.

Pecci Y, Rivardo F, Martinotti M and Allegrone G (2010) LC/ESI-MS/MS characterisation of lipopeptide biosurfactants produced by the *Bacillus licheniformis* V9T14 strain. J Mass Spectrom. 45: 772-778.

Pereira de Melo F, Fiore M, Beraldo de Moraes L, Silva-Stenico M, Scramin S, Teixeira M and Soares de Melo I (2009). Antifungal compound produced by the cassava endophyte *Bacillus pumilus* MAIIM4A. *Sci Agric*. 66: 583-592.

Peypoux F, Bonmatin J and Wallach J (1999) Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl Microbiol Biotechnol*. 51: 553-563.

Ponce de León I, Schmelz E, Gaggero C, Castro A, Álvarez A and Montesano M (2012) *Physcomitrella patens* activates reinforcement of the cell wall, programmed cell death and accumulation of the evolutionary conserved defence signals, such as salicylic acid and 12-oxo-phytodienoic acid, but not jasmonic acid, upon *Botrytis cinerea* infection. *Mol Plant Pathol* 13: 960-974.

Razafindralambo H, Paquot M, Hbid C and Jacques P, Destain J and Thonart P (1993). Purification of antifungal lipopeptides by reversed-phase high performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 639: 81-85.

Rhee K (2004) Cyclic dipeptides exhibit synergistic, broad spectrum antimicrobial effects and have anti-mutagenic properties. *Int J Antimicrob Agents*. 24: 423–427.

Rodríguez-Tudela J, Barchiesi and Bille J (2003) Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. *Clinical Microbiol Infect*. 9: 1–8.

Romano A, Vitullo D, Prieto A, Lima G and Lanzotti V (2011). Antifungal lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* strain BO7. *J Nat Prod* 74: 145-151.

Romero D, de Vicente A, Rakotoaly R, Dufour S, Veening J, Arrebola E, Cazorla F, Kuipers O, Paquot M,2 and Pérez-García A (2007) The Iturin and Fengycin Families of Lipopeptides Are Key Factors in Antagonism of *Bacillus subtilis* Toward *Podosphaera fusca*. *Mol Plant Microbe Interact*. 20: 430-440.

Sakuno E, Tani H and Nakajima H (2007). 2-Epi-botcinin A and 3-O-acetylbotcinic acid from *Botrytis cinerea*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 71: 2592-2595.

Satoh S, Mimuro M, Tanaka A (2013) Construction of a Phylogenetic Tree of Photosynthetic Prokaryotes Based on Average Similarities of Whole Genome Sequences. *PLoS ONE* 8(7).

Serrano L, Manker D, Brandi F, Cali T (2013). The use of *Bacillus subtilis* QST 713 and *Bacillus pumilus* QST 2808 as protectant fungicides in conventional application programs for black leaf streak control. *Acta Hort* 986: 149–156

Sharma R, Singh D and Singh R (2009) Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biol Control* 50: 205-221.

Shen H, Thomas R, Penfold J and Fragneto G (2010) Destruction and solubilization of supported phospholipid bilayers on silica by the biosurfactant surfactin. *Langmuir*. 26: 7334-7342.

Shivakumar S, Karmali A and Ruhimbana C (2014) Partial purification, characterization, and kinetic studies of a low-molecular-weight, alkali-tolerant chitinase enzyme from *Bacillus subtilis* JN032305, a potential biocontrol strain. *Prep Biochem Biotechnol*. 44: 617-632.

Siegmund I and Wagner F (1991) New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. *Biotechnol Tech* 5:265-268.

Slepecky R and Hemphill H (2006) The genus *Bacillus* – Non medical. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K and Stackebrandt E (Eds) *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria*. Third Edition, Vol 4. Berlin, Springer. pp 530-562.

Soltis P and Soltis D (2003). Applying the bootstrap in phylogeny reconstruction. *Statistical science*. 18: 256-267.

Staats M, van Baarlen P and van Kan J (2005) Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Mol Biol Evol.* 22: 333-346.

Stein T (2005) *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol.* 56: 845-857.

Stephan D, Schmitt A, Carvalho S, Seddon B and Koch E (2005) Evaluation of biocontrol preparations and plant extracts for the control of *Phytophthora infestans* on potato leaves. *Eur J Plant Pathol.* 112: 235-246.

Tani H, Koshino H, Sakuno E, Cutler H and Nakajima H (2006) Botcinins E and F and botcinolide from *Botrytis cinerea* and structural revision of botcinolides. *J Nat Prod.* 69: 722–725.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M and Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 10: 2731-2739.

Tasharrofi N, Adrangi S, Fazeli M, Rastegar H, Khoshayand R and Faramarzi (2011) Optimization of chitinase production by *Bacillus pumilus* using plackett-burman design and response surface methodology. *Iran J Pharm.* 10: 759-768.

Teather R and Wood P (1982) Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl Environ Microb.* 43: 777-780.

Tellier F, Fritz R, Kerhoas L, Ducrot P, Carlin-Sinclair A, Einhorn J and Leroux P (2008) Metabolites of fungicidal cyanooximes, cymoxanil and analogues in various strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Manag Sci.* 65: 129-136.

Touré Y, Onega M, Jacques P, Guiro A and Thonart P (2004) Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *J Appl Microbiol.* 96: 1151-1160.

- Vágvölgyi C, Sajben-Nagy E, Bóka B, Vörös M, Berki A, Palágyi A, Krisch J, Skrbic B and Durisic-Mladenovic N (2013) Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus* strains capable to degrade ethylenethiourea. *Curr Microbiol.* 66: 243-250.
- Van Kan L (2006) Licensed to kill: The lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends Plant Sci.* 11: 247-253.
- Verhagen B, Trotel-Aziz P, Couderchet M, Höfte M and Aziz A (2010) *Pseudomonas* spp.-induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* is associated with induction and priming of defence responses in grapevine. *J Exp Bot.* 61: 249-260.
- Verhagen B, Totel-Aziz P, Jeandet P, Baillieux F and Aziz A (2011) Improved resistance against *Botrytis cinerea* by grapevine-associated bacteria that induce a prime oxidative burst and phytoalexin production. *Phytopathology.* 101: 768-777.
- Walker A, Micoud A, Rémuson A, Grosman J, Gredt M and Leroux P (2013) French vineyard provide information that opens ways for effective resistance management of *Botrytis cinerea* (grey mould). *Pest Manag Sci.* 69: 667-678.
- Wang G, Dai S, Chen M, Wu H, Xie L, Luo X, Li X (2010) Two diketopiperazine cyclo(pro-phe) isomers from marine bacteria *Bacillus subtilis* sp.13-2. *Chem Nat Compd.* 4: 583-585.
- Williams S and Brodbelt JS (2004) MSn characterization of protonated cyclic peptides and metal complexes. *J Am Soc Mass Spectrom* 15: 1039–1054.
- Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P and Kan J (2007) *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Mol Plant Pathol.* 8: 561-580.
- Wirth S and Wolf G (1990) Dye-labeled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. *J Microbiol Methods* 12: 197-205.

Yuan J, Raza W, Huang Q and Shen Q (2012) The ultrasound-assisted extraction and identification of antifungal substances from *B. amyloliquefaciens* strain NJN-6 suppressing *Fusarium oxysporum*. *J Basic Microb.* 52: 721-730.

Zervoudakis G, Tairis N, Salahas G and Georgiou C (2003) B-carotene production and sclerotia differentiation in *Sclerotinia minor*. *Mycological Research.* 107: 624-631.

Zhang X, Li B, Wang Y, Guo Q, Lu X, Li S and Ma P (2013) Lipopeptides, a novel protein, and volatile compounds contribute to the antifungal activity of the biocontrol agent *Bacillus atrophaeus* CAB-1. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97: 9525-9534.

Zhao Y, Nimal J, Xing F, Zhou L, Wang Y, Song H, Tan X, Sun L, Sangare L, Elodie Yand Liu Y (2014) Antagonistic action of *Bacillus subtilis* strain SG6 on *Fusarium graminearum*. *Plos one.* 9: 1-1.