

ESTUDIO DE LA TOXICIDAD DE MEZCLAS DE BACILOMICINA D Y SURFACTINA BIOSINTETIZADAS POR *Bacillus velezensis* 83 EN EL CRECIMIENTO Y VIABILIDAD DE *Colletotrichum gloeosporioides* 09 CULTIVADO EN MEDIO LIQUIDO

Luna-Bulbarela Agustín, de los Santos-Ventura Cristina, Galindo Enrique, Serrano-Carreón Leobardo
Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biotecnología, Depto. Ingeniería celular y Biocatálisis, Cuernavaca, Morelos, 62210; gutilb@ibt.unam.mx

Palabras clave: Bacilomicina; Surfactina; *B. velezensis*

Introducción. *Bacillus* spp. son bacterias empleadas en productos biotecnológicos para mejorar la sanidad vegetal debido a que son una fuente de numerosos metabolitos antimicrobianos. Entre estos metabolitos se encuentran los lipopéptidos cíclicos, los cuales son moléculas de propiedades surfactantes y actividad antimicrobiana de gran relevancia en el control biológico de fitopatógenos (1). El objetivo del presente estudio fue evaluar la toxicidad de lipopéptidos (así como sus interacciones) producidos por *B. velezensis* 83 (el ingrediente activo del biofungicida Fungifree AB^{MR}) contra *C. gloeosporioides* 09, así como evaluar el daño que ocasionan sobre la membrana celular de éste fitopatógeno.

Metodología. Se purificaron lipopéptidos a partir de sobrenadantes de cultivos de *B. velezensis* 83. Para dicho fin, se utilizó el siguiente tren de operaciones de separación: precipitación ácida, extracción sólido-líquido y PR-HPLC. La identificación se realizó mediante ESI-MS y HPLC-ESI-MS/MS (2). Posteriormente, se estudió su actividad antimicrobiana de forma individual y en mezcla contra esporas de *C. gloeosporioides* 09 en matraces agitados. Finalmente, se evaluó su efecto sobre la integridad de membrana a partir de tinciones con yoduro de propidio (IP).

Resultados. Los lipopéptidos aislados poseen las siguientes secuencias: a) Bacilomicina D:-Asn-Tyr-Asn-Pro-Glu-Ser-Thr-(FA-β-NH₂)- y b) Surfactina:-Glu-Leu/Iso-Leu/Iso-Val-Asp-Leu/Iso-Leu/Iso-(FA-β-OH)-, donde FA representa un ácido graso de cadena variable (C₁₄-C₁₆ para bacilomicina y C₁₃-C₁₆ para surfactina). Los homólogos de bacilomicina D C₁₄ y C₁₆ presentan una concentración mínima inhibitoria 100 (MIC₁₀₀) distinta (23 y 4.5 μM, respectivamente) mientras que la surfactina (C₁₃-C₁₆) no presentó actividad antifúngica incluso a concentraciones de 100 μM. Los resultados de un ensayo de aditividad de Loewe entre bacilomicina D C₁₄ y C₁₆ reveló que presentan un efecto sinérgico moderado (Fig.1). Por el contrario, la surfactina tiene un efecto antagónico sobre la actividad antifúngica de la bacilomicina. Esta observación podría estar relacionada a una disfuncionalidad del agregado formado en membrana, tal como se ha sugerido en interacciones entre otros lipopéptidos antibacterianos (3). Inclusive, la mezcla de surfactina (C₁₃-C₁₆):bacilomicina D(C₁₄) con una proporción molar 2:1 (S/B) es capaz de promover el crecimiento del hongo (Tabla 1). Micrografías de fluorescencia empleando IP mostraron que el hongo sujeto a concentraciones inhibitorias de bacilomicina D C₁₄ muestran daño en membrana (Fig. 2), el cual correlaciona con su viabilidad, mientras las hifas expuestas a la surfactina (individualmente o en mezcla a una proporción molar 2:1 S/B) no presentan daño en membrana.

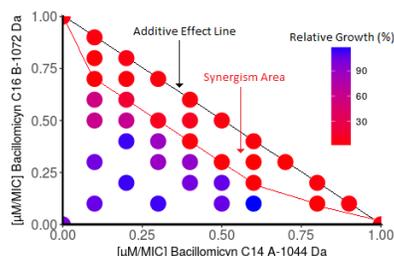


Figura 1. Ensayo de aditividad de Loewe para dos homólogos de bacilomicina D (C₁₄ y C₁₆) utilizando una MIC₁₀₀ contra esporas.

Tabla 1. Efecto de mezclas surfactina C₁₃-C₁₆/bacilomicina D C₁₄ sobre el crecimiento del hongo en g_{bseca}/l. Tratamientos que no comparten una letra son estadísticamente distintos (Tukey, n=9, α=0.05).

Bacilomicina C ₁₄ (μM)	Surfactina C ₁₃ -C ₁₆ (μM)			
	0	12.5	31.3	50
0	4.4 +/- 0.4 ^d	4.0 +/- 0.8 ^{bcd}	5.0 +/- 0.9 ^{abcd}	5.5 +/- 0.8 ^{abcd}
9	4.7 +/- 0.6 ^{bcd}	4.5 +/- 0.5 ^{cd}	5.0 +/- 0.7 ^{bcd}	5.2 +/- 0.8 ^{abcd}
17	2.3 +/- 1.4 ^e	6.1 +/- 0.5 ^{ab}	5.6 +/- 0.7 ^{abcd}	5.8 +/- 0.7 ^{abc}
25	0.4 +/- 0.2 ^e	0.9 +/- 1.0 ^e	5.3 +/- 2.2 ^{abcd}	6.7 +/- 1.0 ^a

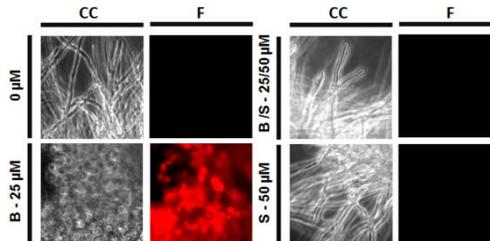


Figura 2. Efecto de bacilomicina (B), surfactina (S) y su mezcla (B/S) sobre la integridad de membrana de *C. gloeosporioides* 09. Microscopía: CC (Contraste de fase) y F (Fluorescencia). Fluorescencia en rojo indica daño en membrana.

Conclusiones. En solución acuosa, mezclas de estos compuestos presentan una actividad antimicrobiana distinta con respecto a su efecto individual. Lo anterior podría estar íntimamente ligado a la funcionalidad del agregado formado. Es importante aclarar que nuestras observaciones podrían diferir ampliamente con respecto a lo ocurrido en la naturaleza debido a que estos compuestos forman parte de un *Biofilm* (en fase sólida) lo cual no ocurre en los medios líquidos agitados.

Agradecimientos. Agustín LB y Cristina SV agradecen al CONACyT por la beca otorgada (404462 y 247473, respectivamente). Este proyecto contó con apoyo del CONACyT (247473) y DGAPA (IG200608)

Bibliografía.

- Ongena M y Jacques P. (2007). *Trends in Microbiol.* 16(3):115-125.
- Luna-Bulbarela A et al. (2018). *Biol. Control.* 127: 145-154.
- Zhang T et al (2013). *Biochim. Biophys. Acta.* 1828: 302-308.