



Artículo Científico

Optimización de la temperatura y el tiempo de fermentación para la producción de un extracto antifúngico de *Bacillus amyloliquefaciens* B17

Maria Magdalena Rivera-Salas¹, José Basilio Heredia¹, Juan Manuel Tovar-Pedraza¹, Cesar San Martín-Hernández², José Benigno Valdez-Torres¹, Isabel Cruz-Lachica¹, Raymundo Saúl García-Estrada^{1*}, ¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Coordinación Regional Culiacán, Carretera El Dorado Km 5.5, Campo el Diez, CP 80110, Culiacán, Sinaloa, México; ²Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, CP 56264, Estado de México, México.

*Autor de correspondencia:
Raymundo Saúl
García-Estrada
rsgarcia@ciad.mx

Sección:
Edición periódica

Recibido:
22 Mayo, 2024

Aceptado:
22 Julio, 2024

Publicado:
23 Agosto, 2024

Cita:
Rivera-Salas MM, Heredia JB, Tovar-Pedraza JM, San Martín-Hernández C, y Valdez-Torres JB, et al. 2024. Optimización de la temperatura y el tiempo de fermentación para la producción de un extracto antifúngico de *Bacillus amyloliquefaciens* B17. Revista Mexicana de Fitopatología 42(3): 33. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2405-11>



RESUMEN

Antecedentes / Objetivo. Actualmente, las especies del género *Bacillus* están ganando interés debido a su capacidad para producir metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas contra diversos hongos fitopatógenos. El objetivo de este estudio fue optimizar la temperatura y el tiempo de fermentación para la producción de un extracto antifúngico de *Bacillus amyloliquefaciens* B17 y verificar su actividad contra *Gilbertella persicaria*, *Choanephora cucurbitarum*, *Colletotrichum asianum* y *Botrytis cinerea*.

Materiales y Métodos. Se utilizó un diseño central compuesto (DCC) con dos factores y cinco niveles (temperatura de fermentación: 23.7, 25, 28, 31 y 32.2 °C y tiempo de fermentación: 25, 46, 95, 144 y 164.3 h). Trece combinaciones de temperatura y tiempo de fermentación se realizaron de manera aleatoria. Los trece extractos crudos de *B. amyloliquefaciens* B17 se obtuvieron, del caldo de fermentación libre de células, mediante precipitación ácida seguida de solubilización alcalina. La variable de respuesta fue el diámetro de los halos de inhibición generados al colocar gotas de los diferentes extractos crudos sobre el medio inoculado con una suspensión de esporas de *Gilbertella persicaria*.

Resultados. Las condiciones óptimas para la producción del extracto con mayor actividad antifúngica en *B. amyloliquefaciens* B17 fueron 26.8 °C y 158.6 h.

Conclusión. El extracto crudo optimizado de *B. amyloliquefaciens* B17 exhibió una gran capacidad para inhibir el crecimiento micelial y la germinación de esporas de *Gilbertella persicaria*, *Choanephora cucurbitarum*, *Colletotrichum asianum* y *Botrytis cinerea*.

Palabras clave: *Bacillus*, Biocontrol, Extracto antifúngico, Hongos

INTRODUCCIÓN

Los hongos fitopatógenos causan pérdidas significativas en cultivos agrícolas en todo el mundo, y las pérdidas económicas en el sector agrícola debidas a enfermedades fúngicas alcanza los 200 mil millones de dólares a nivel mundial (Horbach *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2022). Dentro de la amplia variedad de hongos fitopatógenos, la división Ascomycota incluye alrededor de 75% de las especies fúngicas que causan daños significativos a los cereales, frutas y hortalizas, siendo *Alternaria*, *Fusarium*, *Diplodia*, *Monilinia*, *Penicillium*, *Botrytis*, y *Colletotrichum* los géneros más importantes (Arroyave-Toro *et al.*, 2017; García-Rico y Fierro, 2017; Hoffmann *et al.*, 2013). Además, la división Mucoromycota también contiene especies patógenas de crecimiento rápido tales como *Rhizopus* spp., *Mucor* spp., *Choanephora cucurbitarum*, y *Gilbertella persicaria* (Benny, 1991; Hoffmann *et al.*, 2013).

Aunque el control químico es esencial para limitar las enfermedades de plantas causadas por hongos patógenos, el uso indiscriminado de fungicidas químicos ha contribuido a la resistencia antifúngica, así como a la contaminación ambiental y al deterioro de la salud humana. Por lo tanto, es necesario desarrollar métodos alternativos para el control que tengan impactos mínimos en el ambiente y en la salud humana (Ginting *et al.*, 1996; Ragazzo-Sánchez *et al.*, 2011). El control biológico, incluyendo el uso de microorganismos o de ciertos metabolitos microbianos, ha resultado ser una alternativa viable para el control enfermedades fúngicas pre- y postcosecha (Juárez-Becerra *et al.*, 2010; Pérez-García *et al.*, 2011; Ragazzo-Sánchez *et al.*, 2011).

Las bacterias del género *Bacillus* son actualmente de gran interés porque tienen múltiples mecanismos de acción para el control biológico de microorganismos fitopatógenos. Los mecanismos de biocontrol de las especies de *Bacillus* incluyen la competencia con el fitopatógeno por el sustrato, la estimulación de la defensa de la planta y la producción de enzimas orgánicas y líticas volátiles, así como compuestos antimicrobianos. Entre los compuestos antimicrobianos producidos por *Bacillus* spp., los lipopéptidos son de especial importancia, ya que estas moléculas son bioactivas contra una amplia gama de agentes patógenos (bacterias, hongos y

oomicetos). Los lipopéptidos consisten de un péptido cíclico unido a una cadena de ácidos grasos que, con base en su estructura, se clasifican principalmente en tres grupos o familias: surfactina, iturina y fengicina (Bonmatin *et al.*, 2003; Cawoy *et al.*, 2014; Fira *et al.*, 2018; Pedraza-Herrera *et al.*, 2020).

La producción de lipopéptidos está influenciada por varios factores, como el tipo de cepa, la composición del medio y las condiciones de fermentación. El tiempo de fermentación puede influir en el tipo y la concentración de lipopéptido producido (Inès y Dhouha, 2015). Los lipopéptidos con actividad antimicrobiana, tales como las surfactinas, son producidos durante la fase exponencial del crecimiento bacteriano, mientras que los lipopéptidos con actividad antifúngica, tales como las iturinas y las fengicinas, son producidas durante la fase estacionaria (Abushady *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2020). Aunque la biosíntesis de lipopéptidos puede llevarse a cabo entre los 25 y 45 °C, la temperatura de fermentación también afecta el tipo de lipopéptido producido. En algunos tipos de cepas de *Bacillus*, se ha reportado que una temperatura de 37 °C favorece la producción de surfactina, mientras que una temperatura de 25 °C beneficia la producción de iturina (Abushady *et al.*, 2005; Inés y Dhouha, 2015; Ohno *et al.*, 1995).

En estudios previos se ha reportado la significativa actividad antimicrobiana de *Bacillus amyloliquefaciens* B17. Esta cepa, aislada de la rizósfera de las plantas del tomate, ha presentado una significativa actividad oomiceticida, aunque su actividad antifúngica aún no ha sido reportada (Ley-López *et al.*, 2022; Ley-López *et al.*, 2018). El objetivo de esta investigación fue optimizar la temperatura y el tiempo de fermentación para la producción de un extracto antifúngico de *Bacillus amyloliquefaciens* y determinar el efecto del extracto en el crecimiento micelial y la germinación de esporas de los hongos fitopatógenos *Gilbertella persicaria*, *Choanephora cucurbitarum*, *Colletotrichum asianum* y *Botrytis cinerea*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos y condiciones de cultivo. Los microorganismos usados en este estudio fueron suministrados por el Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (Coordinación Regional de Culiacán). *Bacillus amyloliquefaciens* B17 (número de accesión del GenBank: KX953161), aislado de la rizósfera de cultivos de tomate en diferentes ubicaciones geográficas en Sinaloa, se mantuvo en un agar nutritivo (NA, BD Bioxon) a 27 °C. *Gilbertella persicaria* HP15 (números de accesión: KR076758 y KR076761), *Choanephora cucurbitarum* CCCFMX01 (números de accesión: OQ269823 y OQ269827) y *Colletotrichum asianum* UACH299 (número de accesión: MK016315) se cultivaron en Papa-Dextrosa-Agar (PDA, BD Bioxon) a 27 °C. *Botrytis cinerea*

HF02 (números de acceso: OQ191231, OQ286120 y OQ286119) se mantuvo en placas con PDA a 22 °C.

Preparación del inóculo. *Bacillus amyloliquefaciens*, cultivado en un medio LB, se usó como inóculo. Las células bacterianas se obtuvieron mediante raspado de una placa NA y se agregaron a un matraz de 250 mL con 120 mL de caldo LB. Después de incubar a 27 °C y agitar a 150 rpm por 24 h, la concentración de las células bacterianas fue de 1.2×10^9 UFC/mL (según la escala de McFarland) (Ley-López *et al.*, 2022).

Obtención de extractos crudos. Se agregaron ocho mililitros de inóculo en un matraz de 1 L con 200 mL de medio Landy (glucosa, 20 g/L; ácido L-glutámico, 5g/L; extracto de levadura, 1g/L; K_2HPO_4 , 1g/L; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g/L; KCl, 0.5 g/L; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 1.6 mg/L; $Fe_2(SO_4)_3 \cdot 7H_2O$, 0.4 mg/L; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 1.2 mg/L) previamente ajustado a un pH inicial de 7. El medio Landy, un medio de cultivo habitual para la producción de lipopéptidos por *Bacillus* spp., se usó para llevar a cabo la fermentación en matraces agitados (230 rpm). Una vez transcurrido el tiempo de fermentación, las células bacterianas en el medio Landy se removieron por centrifugación a 10,000 rpm por 12 min a 4 °C, y se recolectó el sobrenadante libre de células. El sobrenadante se acidificó con 6N HCl a un pH de 2 y se almacenó toda la noche a 4 °C para precipitar los compuestos péptidicos. El precipitado se recuperó por centrifugación (10,000 rpm, 20 min a 4 °C) y se disolvió en 10 ml de agua destilada. El pH de la solución se ajustó a 8 con 0.5 M NaOH. Después, esta solución se filtró con membranas de nylon para obtener el extracto crudo del *Bacillus*. Debido a que un solo método es insuficiente para purificar los compuestos péptidicos, es común incluir múltiples pasos en la purificación de estos compuestos. Por lo tanto, para este estudio, se usó para la extracción una combinación de precipitación ácida, solubilización alcalina y filtración. Para la precipitación ácida, se redujo el pH del medio de fermentación (~2) con ácido clorhídrico concentrado. Así, las cargas negativas sobre las moléculas de los péptidos fueron neutralizadas, lo que reduce su solubilidad en la fase acuosa y facilita su separación por precipitación. Posteriormente, los compuestos que precipitaron se solubilizaron nuevamente en la fase acuosa al alcalinizar el medio (pH=8) y los compuestos péptidicos que no se solubilizaron fueron eliminados por filtración (Ley-López *et al.*, 2022; Motta Dos Santos *et al.*, 2016; Torres *et al.*, 2016).

Optimización de la temperatura y tiempo de fermentación por RSM. Para determinar la temperatura y el tiempo de fermentación óptimos para la producción de un extracto crudo de *Bacillus amyloliquefaciens* B17 con la mayor actividad antifúngica, se usó un diseño compuesto central (DCC) con dos factores y cinco

niveles (temperatura de fermentación: 23.7, 25, 28, 31, y 32.2 °C, y tiempo de fermentación: 25, 46, 95, 144 y 164.3 h). Trece combinaciones (incluidas 5 réplicas del punto central) de la temperatura y el tiempo de fermentación fueron llevadas a cabo de forma aleatoria (Cuadro 1). La variable de respuesta fue el diámetro de los halos de inhibición generados al colocar alícuotas (5 μ L) de los diferentes extractos crudos, aplicados directamente como gotas sobre el medio (PDA) ya inoculado con 100 μ L de la suspensión de esporas de *G. persicaria* (1 x 10⁶ esporangiosporas/mL).

Cuadro 1. Resultados experimentales de los halos de inhibición generados por los extractos crudos de *B. amyloliquefaciens* obtenidos bajo diferentes condiciones de fermentación.

Corridas experimentales	Variables de proceso		Variable de respuesta
	Temperatura de fermentación (°C)	Tiempo de fermentación (h)	Diámetro del halo de inhibición (mm)
1	28	95	8.9
2	31	46	0
3	25	144	11.8
4	25	46	0
5	28	25.7	0
6	32.2	95	0.9
7	28	164.3	13.0
8	28	95	7.7
9	28	95	10.0
10	28	95	11.1
11	23.7	95	9.1
12	31	144	7.6
13	28	95	10.8

Rendimiento del extracto crudo optimizado. Después de validarse las condiciones óptimas de temperatura y tiempo de fermentación, el extracto crudo optimizado se liofilizó (FreeZone Triad Benchtop Freeze Dryer, LABCONCO) y se pesó para determinar el rendimiento del proceso de fermentación. El extracto optimizado y liofilizado se almacenó a 4 °C para mayores análisis posteriores.

Determinación de la concentración efectiva media (CE₅₀). Para determinar la concentración del extracto crudo optimizado que inhibe 50 % del crecimiento micelial (CE₅₀), se agregaron diferentes concentraciones de extracto liofilizado (3.75, 7.5, 15, 30, 45, 60 μ g/mL) a un medio PDA estéril (45 °C) antes de ser vertido en placas Petri. Como control se usó medio PDA sin extracto. Se dejó a las placas gelificar a temperatura ambiente durante 24 h, después de lo cual se

colocaron discos miceliales (6 mm de diámetro) de *G. persicaria*, *C. cucurbitarum*, *C. asianum*, y *B. cinerea* (después de 7 días de crecimiento) en el centro de las placas. Las placas con *G. persicaria*, *C. cucurbitarum* y *C. asianum* se incubaron a 27 °C, mientras que las placas con *B. cinerea* se incubaron a 22 °C hasta que el crecimiento micelial cubriera cada una de las respectivas placas control. El porcentaje de inhibición del crecimiento se determinó usando la siguiente fórmula (Ramírez-Benítez *et al.*, 2019).

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(\text{diámetro de crecimiento micelial en el control}) - (\text{diámetro de crecimiento micelial en placa Petri tratada})}{(\text{diámetro de crecimiento micelial en el control})} \times 100$$

Por medio de los resultados del porcentaje de inhibición de crecimiento, se generó una curva dosis-respuesta y se determinó la CE_{50} .

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). La CMI se determinó de acuerdo a la metodología de Toral *et al.* (2018) con algunas modificaciones. Se agregaron cien microlitros de suspensión de esporas (1×10^6 esporas/mL) de cada hongo (*G. persicaria*, *C. cucurbitarum*, *C. asianum* y *B. cinerea*) en cada pozo de las microplacas con 900 μ L del caldo papa-dextrosa (CPD, Difco) y diferentes concentraciones del extracto (0, 0.75, 1.5, 2.25, 3, 3.75, 4.5, 5.25, 6, 6.75, 7.5, 9, 10.5, 12, 13.5, and 15 mg/mL). CPD sin extracto crudo se usó como control. Las microplacas con *G. persicaria* y *C. cucurbitarum* se incubaron a 27 °C durante 48 h, mientras que *C. asianum* se incubó a 27 °C durante 96 h y las microplacas con *B. cinerea* se incubaron a 22 °C por 96 h. El experimento se llevó a cabo por triplicado y la CMI se determinó de forma visual como la concentración más baja del extracto optimizado que inhibió el crecimiento fúngico por completo.

Determinación de la concentración mínima fungicida (CMF). La CMF se determinó después de evaluar la CMI correspondiente. Se transfirieron alícuotas de 5 μ L de cada pozo de las microplacas que no presentaron crecimiento de los hongos a placas PDA por triplicado. Las placas inoculadas se incubaron a 27 °C por 96 h para *G. persicaria* y *C. cucurbitarum*; 27 °C por 144 h para *C. asianum* y 22 °C por 144 h para *B. cinerea*. La CMF se determine como la concentración más baja de extracto que mata a cada uno de los hongos (Cortés *et al.*, 2020).

Efecto del extracto crudo optimizado. Después de evaluar la CMI, se colocaron alícuotas de 10 μ L de cada pozo de las microplacas con CPD, esporas fúngicas y diferentes concentraciones de extracto en portaobjetos y se observó el crecimiento

micelial y la germinación de esporas por triplicado usando un microscopio Imager A2 (Zeiss, Alemania).

Análisis de datos. Se analizaron los diámetros de los halos de inhibición por medio de regresión múltiple para determinar el modelo matemático que explica la variación en la variable de respuesta de manera adecuada. Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para examinar la significancia estadística de los términos del modelo obtenido por regresión. Una vez obtenido el modelo ajustado de predicción para la variable de respuesta estudiada (diámetro de los halos de inhibición), se usó el método de deseabilidad numérica (D) para determinar la temperatura y el tiempo de fermentación que maximizó los diámetros de los halos de inhibición. El objetivo de la optimización fue encontrar los valores más altos posibles de D que estuvieran asociados con las condiciones óptimas de temperatura y tiempo de fermentación. Se usó el software estadístico Minitab (versión 18) para el diseño experimental y el análisis de regresión de los datos experimentales.

RESULTADOS

Optimización de RSM. El diseño experimental (DCC) y los resultados de la variable de respuesta (diámetro de los halos de inhibición) generados por los 13 extractos de crudo se muestran en el Cuadro 1. El diámetro de los halos de inhibición varió entre 0 y 13 mm. Las variables de respuesta obtenidas de los 13 extractos crudos se analizaron por regresión múltiple y se creó un modelo matemático que explicara adecuadamente la variación en las variables de respuesta.

Los resultados del ANDEVA y el análisis de regresión para el modelo cuadrático del halo de inhibición aparecen en el Cuadro 2. El modelo de regresión explicó 94.23 % de la variabilidad total en los diámetros de los halos de inhibición, con un nivel de significancia de 0.05. El ANDEVA reveló que el valor p del modelo fue de 0.000, lo que implica que el modelo fue significativo ($P < 0.05$).

El modelo de regresión con variables codificadas obtenidas para predecir el diámetro de inhibición fue el siguiente:

$$Y = 9.702 - 1.983X_1 + 4.72X_2 - 1.050X_1X_2 - 2.571X_1^2 - 1.831X_2^2$$

donde Y corresponde al diámetro del halo de inhibición estimado y X_1 y X_2 son los valores codificados de temperatura y tiempo de fermentación, respectivamente. Los términos que tuvieron efectos significativos ($p < 0.05$) sobre el diámetro de los halos de inhibición fueron los términos lineales (X_1 , X_2) y cuadráticos (X_1^2 , X_2^2) de temperatura y tiempo de fermentación. La falta de ajuste de datos no fue significativa porque el valor p fue mayor a 0.05 para la prueba de falta de ajuste.

Cuadro 2. ANDEVA y análisis de regresión para la variable de respuesta (diámetro del halo de inhibición) generado por los extractos crudos de *B. amyloliquefaciens* obtenidos bajo diferentes condiciones de fermentación.

Fuente	Coefficientes del modelo	Suma de cuadrados	GL	Media de cuadrados	Valor F	Valor <i>p</i>
Modelo		275.94	5	55.19	22.88	0.000*
Intercepto	9.702					
X ₁ : Temperatura	-1.983	31.47	1	31.47	13.05	0.009*
X ₂ : Tiempo	4.720	178.25	1	178.25	73.91	0.000*
X ₁ X ₂	-1.05	4.41	1	4.41	1.83	0.218
X ₁ ²	-2.571	38.49	1	45.98	19.07	0.003*
X ₂ ²	-1.831	23.32	1	23.32	9.67	0.017*
Residual		16.88	7	2.41		
Falta de ajuste		8.70	3	2.9	1.42	0.330
Error puro		8.18	4	2.05		

*Significativo (para un valor *p* <0.05); GL = grados de libertad; R² = 0.9423; R² ajustada = 0.9012.

Considerando solo los términos significativos, el modelo para el diámetro de los halos de inhibición (Y) se pueden reescribir de la siguiente manera:

$$Y = 9.702 - 1.983X_1 + 4.72X_2 - 2.571X_1^2 - 1.831X_2^2$$

La Figura 1 muestra la gráfica de superficie de respuesta obtenida con los datos estimados con el modelo de predicción matemático. Debido a que los valores deseados para el diámetro del halo de inhibición fueron los más altos, estos valores se encontraron en el área donde había valores intermedios de temperatura (T) y valores altos de tiempo de fermentación (t).

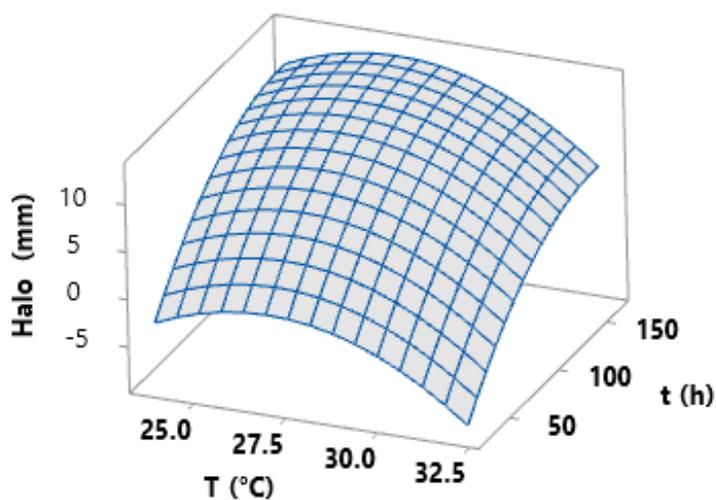


Figura 1. Gráfico de superficie de respuesta para el diámetro del halo de inhibición en función del tiempo y temperatura de fermentación.

La optimización se llevó a cabo usando el método de deseabilidad numérica (D) para encontrar los valores más altos posibles de D (valores cercanos a 1), que están asociados con las mejores condiciones de fermentación. La temperatura y tiempo de fermentación óptimos fueron de 26.8 °C y 158.6 h, respectivamente. Estas condiciones óptimas corresponden a un valor de D = 1 (Figura 2).

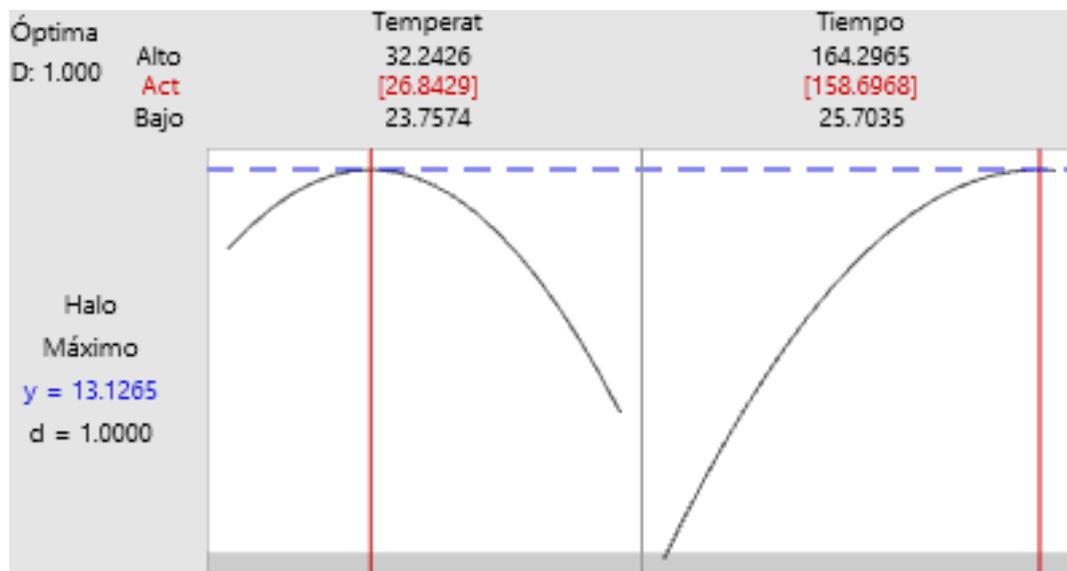


Figura 2. Gráfico de optimización que muestra el efecto de cada factor (temperatura y tiempo) sobre la respuesta (halo de inhibición). Las líneas verticales y los números rojos representan la configuración óptima de los factores. La línea horizontal y el número azul representan la respuesta para el nivel óptimo de los factores.

Determinación de CE_{50} , CMI y CMF. Para calcular la CE_{50} del extracto sobre *G. persicaria*, *C. cucurbitarum*, *C. asianum* y *B. cinerea*, los porcentajes de inhibición del crecimiento radial del hongo en medios sólidos se determinaron a diferentes concentraciones del extracto crudo. Estos resultados revelaron una reducción en el crecimiento radial en todos los hongos estudiados en todas las concentraciones (Figura 3). Las concentraciones de extracto crudo optimizados que inhibieron 50% del crecimiento radial (CE_{50}) de los hongos *G. persicaria*, *C. cucurbitarum*, *C. asianum* y *B. cinerea* fueron 3.7, 22.6, 34.5 y 36.3 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. La CMI y CMF del extracto crudo optimizado se estimaron en 1.2 y 1.5 $\mu\text{g/mL}$ para *G. persicaria*; 5.25 y 6 $\mu\text{g/mL}$ para *C. cucurbitarum*; 3 y 4.5 para *C. asianum* y para *B. cinerea*, se estimó que el CMI y el CMF tuvieron el mismo valor de 3 mg/mL (Cuadro 3).

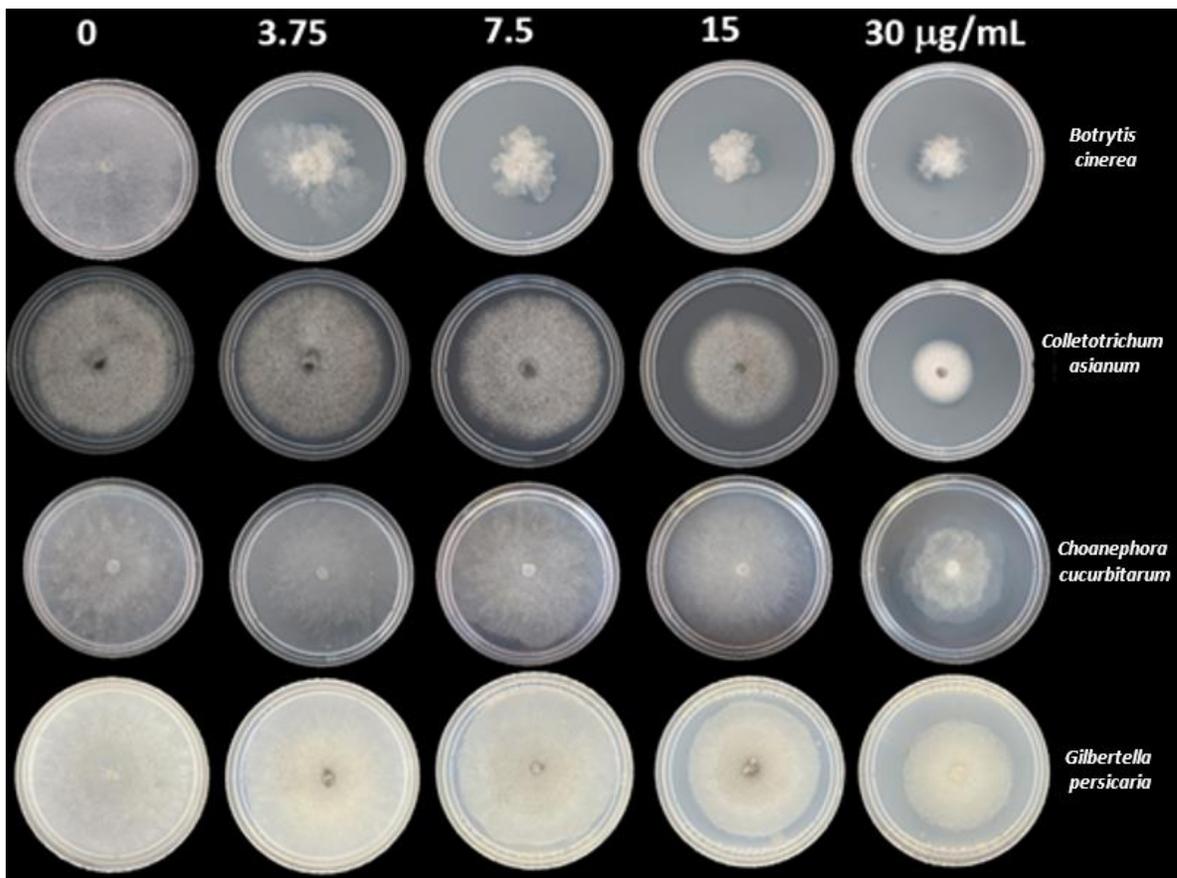


Figura 3. Efecto del extracto crudo de *Bacillus amyloliquefaciens* B17 sobre el crecimiento micelial. La inhibición del crecimiento fúngico radial en un medio sólido (PDA) se determinó a diferentes concentraciones del extracto crudo (0, 3.75, 7.5, 15 y 30 µg/mL). Esta serie de imágenes revelan una reducción en el crecimiento radial de todos los hongos evaluados: *Botrytis cinerea* (22 °C, 96 h), *Colletotrichum asianum* (27 °C, 168 h), *Choanephora cucurbitarum* (27 °C, 48 h) y *Gilbertella persicaria* (27 °C, 48 h). Estas observaciones corresponden a 3 repeticiones de cada serie.

Efecto del extracto crudo optimizado. El extracto crudo optimizado de *B. amyloliquefaciens* B17 tuvo efectos adversos sobre la germinación de esporas de los cuatro hongos (*G. persicaria*, *C. cucurbitarum*, *C. asianum*, and *B. cinerea*). A una baja concentración del extracto (1.5 mg/mL) en el medio de cultivo, se observó una reducción en la velocidad de germinación de las esporas (Figuras 4C, 5C, 6C y 7C), además del hecho de que las esporas germinadas presentan múltiples tubos germinativos (Figura 4C y Figura 5B) o las hifas generadas presentan abultamientos anormales (Figuras 4C, 6B y 7B). Se observó la presencia de células gigantes en *G. persicaria* y *C. cucurbitarum* (Figuras 4D y 5C), las cuales corresponden a esporas

Cuadro 3. CMI y CMF del extracto optimizado contra *Gilbertella persicaria*, *Choanephora cucurbitarum*, *Colletotrichum asianum* y *Botrytis cinerea*.

Extracto crudo optimizado (mg/mL)	<i>G. persicaria</i>		<i>C. cucurbitarum</i>		<i>C. asianum</i>		<i>B. cinerea</i>	
	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF
0.75	+	+	+	+	+	+	+	+
1.5	+	+	+	+	+	+	+	+
2.25	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	-	+	-	-
3.75	+	+	+	+	-	+	-	-
4.5	+	+	+	+	-	-	-	-
5.25	+	+	-	+	-	-	-	-
6	+	+	-	-	-	-	-	-
6.75	+	+	-	-	-	-	-	-
7.5	+	+	-	-	-	-	-	-
9	+	+	-	-	-	-	-	-
10.5	+	+	-	-	-	-	-	-
12	-	+	-	-	-	-	-	-
13.5	-	+	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-

“+” = Presencia de crecimiento micelial; “-” = Ausencia de crecimiento micelial.

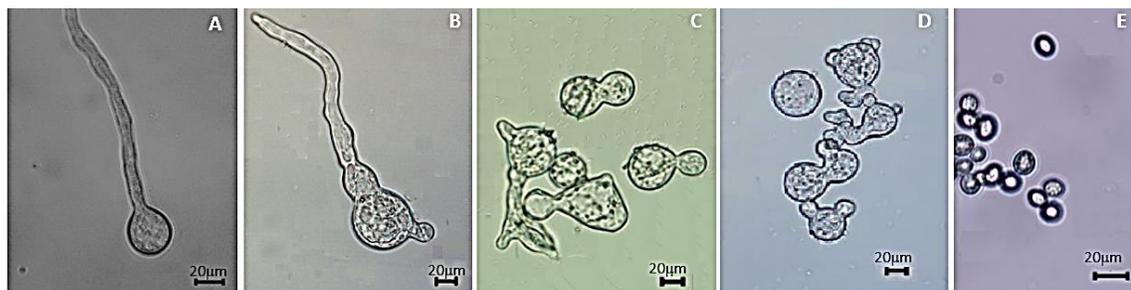


Figura 4. Efecto del extracto crudo de *Bacillus amyloliquefaciens* B17 sobre la germinación de esporangiosporas (27 °C, 48 h) de *Gilbertella persicaria*. (A) Control: esporangiosporas de *Gilbertella* en un medio de CPD sin extracto; (B) esporangiosporas de *Gilbertella* expuestas a una dosis de extracto de 0.75 mg/mL; (C) esporangiosporas de *Gilbertella* expuestas a una dosis de extracto de 1.5 mg/mL; (D) esporangiosporas de *Gilbertella* expuestas a una dosis de extracto de 6 mg/mL; (E) esporangiosporas de *Gilbertella* expuestas a una dosis de extracto de 15 mg/mL. Cada imagen representa un consenso de 3 observaciones.

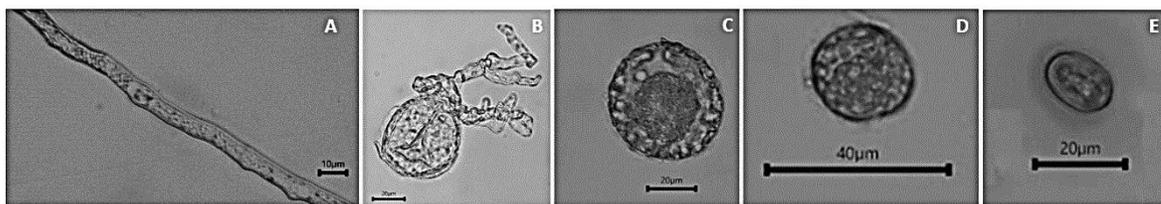


Figura 5. Efecto del extracto crudo de *Bacillus amyloliquefaciens* B17 sobre la germinación de esporangiosporas (27 °C, 48 h) de *Choanephora cucurbitarum*. (A) Control: esporangiosporas de *Choanephora* en un medio de CPD sin extracto; (B) esporangiosporas de *Choanephora* expuestas a una dosis de extracto de 0.75 mg/mL; (C) esporangiosporas de *Choanephora* expuestas a una dosis de extracto de 1.5 mg/mL; (D) esporangiosporas de *Choanephora* expuestas a una dosis de extracto de 2.25 mg/mL; (E) esporangiosporas de *Choanephora* expuestas a una dosis de extracto de 4.5 mg/mL. Cada imagen representa un consenso de 3 observaciones.

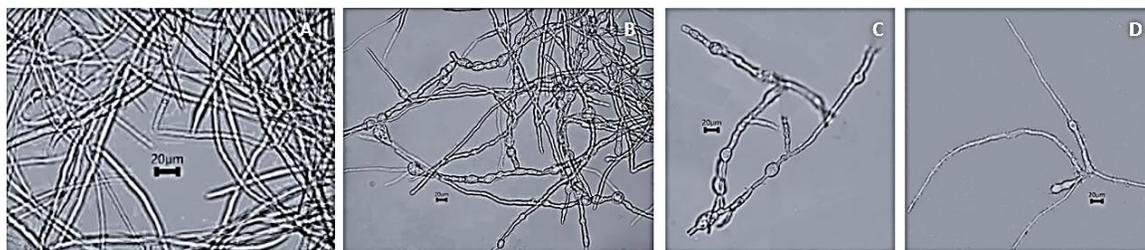


Figura 6. Efecto del extracto crudo de *Bacillus amyloliquefaciens* B17 sobre la germinación de conidios (27 °C, 96 h) de *Colletotrichum asianum*. (A) Control: conidios de *Colletotrichum* en un medio CPD sin extracto; (B) conidios de *Colletotrichum* expuestos a una dosis de extracto de 0.75 mg/mL; (C) conidios de *Colletotrichum* expuestos a una dosis de extracto de 1.5 mg/mL; (D) conidios de *Colletotrichum* expuestos a una dosis de extracto de 2.25 mg/mL. Cada imagen representa un consenso de 3 observaciones.

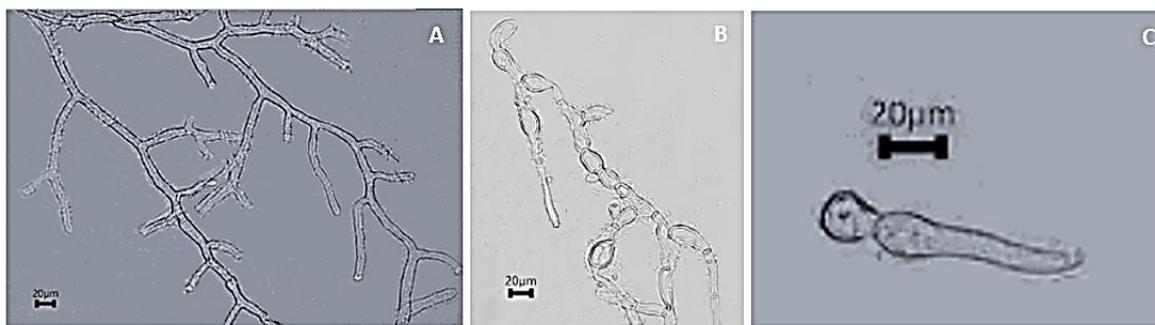


Figura 7. Efecto del extracto crudo de *Bacillus amyloliquefaciens* B17 sobre la germinación de conidios (27 °C, 48 h) de *Botrytis cinerea*. (A) Control: conidios de *Botrytis* en un medio de CPD sin extracto; (B) conidios de *Botrytis* expuestos a una dosis de extracto de 0.75 mg/mL; (C) conidios de *Botrytis* expuestos a una dosis de extracto de 1.5 mg/mL. Cada imagen representa un consenso de tres observaciones.

que solo presentan crecimiento esférico sin el desarrollo del tubo germinativo. Por otro lado, las esporas que germinaron en CPD sin agregar extracto (controles) presentaron una germinación normal, ya que las esporas germinaron y los tubos germinativos se elongaron para formar micelios sin abultamientos ni deformidades (Figuras 4A, 5A, 6A y 7A).

DISCUSIÓN

En el presente estudio, se recalcó la importancia de la temperatura y el tiempo de fermentación para que *Bacillus amyloliquefaciens* produzca metabolitos secundarios, los cuales tienen el potencial de controlar hongos fitopatógenos. Los lipopéptidos son los metabolitos más ampliamente estudiados en numerosas especies de *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mycoides* y *B. thuringiensis*) (Bhusal y Mmbaga, 2020; Ley-López *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2020; Meena *et al.*, 2020). En *B. amyloliquefaciens* B17, las condiciones óptimas para la producción de compuestos con actividad antifúngica fueron 26.8 °C y 158.6 h.

Bajo este esquema de producción y extracción, el rendimiento optimizado de *B. amyloliquefaciens* B17 fue de 756 mg de precipitado crudo por 1L de medio Landy, fermentado a 26.8 °C por 158.6 h. Este rendimiento fue mayor al reportado para la cepa *B. subtilis* KLP2015, que produjo un rendimiento de precipitado peptídico (específicamente identificado como lipopéptidos) de 545 mg/L (de caldo Luria Bertani, fermentado a 30 °C por 72 h) (Meena *et al.*, 2020). Las diferencias en rendimiento pueden explicarse por el tipo de cepa usada, así como al tiempo y la composición del medio de fermentación usado (Cozzolino *et al.*, 2020), ya que se ha reportado que los medios de fermentación ricos en sales de cationes divalentes (como el medio Landy) promueven una mayor producción de metabolitos secundarios tales como los lipopéptidos, dado que muchos de estos cationes (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+}) actúan como cofactores de enzimas bacterianas (Abushady *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2020). En cuanto a la actividad antifúngica, varios estudios han reportado la actividad antifúngica de los lipopéptidos producidos por *Bacillus* spp. contra varios hongos fitopatógenos (*Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Mucor* sp.) (Meena *et al.*, 2020; Moyne *et al.*, 2001; Tao *et al.*, 2011; Toral *et al.*, 2018; Villegas-Escobar *et al.*, 2018; Yan *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2020).

En un estudio previo con la misma cepa de *B. amyloliquefaciens* (B17), pero con diferentes condiciones de fermentación (31 °C y 144 h), solo se reportó la producción de fengicina y surfactina, siendo estos compuestos responsables de la

actividad oomicetocida contra *Phytophthora capsici*. En nuestra investigación es necesario identificar de antemano si hay lipopéptidos presentes en el extracto crudo y si estos compuestos son responsables por la actividad antifúngica del extracto (Ley-López *et al.*, 2022).

El extracto crudo optimizado de *B. amyloliquefaciens* fue efectivo contra los cuatro hongos fitopatógenos. *B. cinerea* y *C. asianum* fueron los hongos más sensibles (CE_{50} =3.7 y 22.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente) y *G. persicaria* y *C. cucurbitarum*, los menos sensibles (CE_{50} = 36.3 y 34.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente).

En este estudio se demostró la actividad antifúngica del extracto crudo de *B. amyloliquefaciens* B17 contra *G. persicaria*, *C. cucurbitarum*, *C. asianum* y *B. cinerea*, dado que el extracto produjo deformaciones en los tubos germinativos, así como protuberancias anormales en las hifas de los hongos. Se han reportado deformaciones en las hifas o segmentos hifales hinchados, similares a los obtenidos en este estudio, en *B. cinerea*, *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum* y *Mucor* sp. por el efecto de lipopéptidos, principalmente fengicina e iturina A (Meena *et al.*, 2020; Toral *et al.*, 2018; Yan *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2020).

CONCLUSIONES

La temperatura y el tiempo de fermentación se optimizaron para la producción de extracto antifúngico por *B. amyloliquefaciens* B17. La actividad antifúngica del extracto optimizado producido por *B. amyloliquefaciens* B17 fue evaluado contra *Gilbertella persicaria*, *Choanephora cucurbitarum*, *Colletotrichum asianum* y *Botrytis cinerea* y se observó que el extracto producido bajo condiciones de fermentación óptimas (26.8 °C y 158.6 h) tuvo efectos adversos, no solo en el crecimiento micelial, sino también en la germinación de las esporas de estos cuatro hongos fitopatógenos.

LITERATURA CITADA

- Abushady HM, Bashandy AS, Aziz NH and Ibrahim HMM. 2005. Molecular Characterization of *Bacillus subtilis* Surfactin Producing Strain and the Factors Affecting its Production. International Journal of Agriculture & Biology 7(3):337-344.
- Arroyave-Toro JJ, Mosquera S and Villegas-Escobar V. 2017. Biocontrol activity of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 cells and lipopeptides against postharvest fungal pathogens. Biological Control 114:195-200. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.08.014>
- Benny GL. 1991. Gilbertellaceae, A New Family of the Mucorales (Zygomycetes). Mycologia 83(2):150-157. <https://doi.org/10.1080/00275514.1991.12025991>
- Bhusal B and Mmbaga MT. 2020. Biological control of *Phytophthora* blight and growth promotion in sweet pepper by *Bacillus* species. Biological Control 150:104373. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104373>
- Bonmatin JM, Laprevote O and Peypoux, F. 2003. Diversity Among Microbial Cyclic Lipopeptides: Iturins and Surfactins. Activity-Structure Relationships to Design New Bioactive Agents. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening 6(6):541-556. <https://doi.org/10.2174/138620703106298716>

- Cawoy H, Mariutto M, Henry G, Fisher C, Vasilyeva N, Thonart P, Dommes J and Ongena M. 2014. Plant Defense Stimulation by Natural Isolates of *Bacillus* Depends on Efficient Surfactin Production. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27(2):87-100. <https://doi.org/10.1094/mpmi-09-13-0262-r>
- Cortés I, di Liberto MG, Kaufman TS, Derita MG and Bracca ABJ. 2020. Synthesis and evaluation of aromatic methoxime derivatives against five postharvest phytopathogenic fungi of fruits. Main structure–activity relationships. *Food Chemistry* 321:126701. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126701>
- Cozzolino ME, Distel JS, García PA, Mascotti ML, Ayub MJ, Benazzi LM, Di Masi SN and Silva PG. 2020. Control of postharvest fungal pathogens in pome fruits by lipopeptides from a *Bacillus* sp. isolate SL-6. *Scientia Horticulturae* 261:108957. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108957>
- Fira D, Dimkić I, Berić T, Lozo J and Stanković S. 2018. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology* 285:44-55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>
- García-Rico RO and Fierro F. 2017. Papel de las subunidades alfa de proteínas G en los procesos morfogénicos de hongos filamentosos de la división Ascomycota. *Revista Iberoamericana de Micología* 34(1):1-9. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2016.06.005>
- Ginting C, Zehr EI and Westcott SW. 1996. Inoculum Sources and Characterization of Isolates of *Gilbertella persicaria* from Peach Fruit in South Carolina. *Plant Disease* 80(10):1129-1134. <https://doi.org/10.1094/PD-80-1129>
- Hoffmann K, Pawłowska J, Walther G, Wrzosek M, de Hoog GS, Benny GL, Kirk PM and Voigt K. 2013. The family structure of the Mucorales: a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 30(1):57-76. <https://doi.org/10.3767/003158513x666259>
- Horbach R, Navarro-Quesada AR, Knogge W and Deising HB. 2011. When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi. *Journal of Plant Physiology* 168(1): 51-62. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.06.014>
- Inès M and Dhouha G. 2015. Lipopeptide surfactants: Production, recovery and pore forming capacity. *Peptides* 71:100-112. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.07.006>
- Juárez-Becerra GP, Sosa-Morales ME and López-Malo A. 2010. Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 4(2):14-23.
- Ley-López N, Basilio Heredia J, San Martín-Hernández C, Ibarra-Rodríguez JR, Angulo-Escalante MÁ and García-Estrada RS. 2022. Biosíntesis inducida de fengicina y surfactina en una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* con actividad oomicetocida sobre zoosporas de *Phytophthora capsica*. *Revista Argentina de Microbiología*. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2022.03.002>
- Ley-López N, Márquez-Zequera I, Carrillo-Fasio JA, León-Félix J, Cruz-Lachica I, García-Estrada RS and Allende-Molar R. 2018. Efecto de biocontrol e inhibición germinativa de *Bacillus* spp. sobre zoosporas de *Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(2). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1711-2>
- Li Y, Feng X, Wang X, Zheng L and Liu H. 2020. Inhibitory effects of *Bacillus licheniformis* BL06 on *Phytophthora capsici* in pepper by multiple modes of action. *Biological Control* 144: 104210. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104210>
- Meena KR, Sharma A, Kumar R and Kanwar SS. 2020. Two factor at a time approach by response surface methodology to aggrandize the *Bacillus subtilis* KLP2015 surfactin lipopeptide to use as antifungal agent. *Journal of King Saud University - Science* 32(1):337-348. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.05.025>
- Motta Dos Santos LF, Coutte F, Ravallec R, Dhulster P, Tournier-Couturier L and Jacques P. 2016. An improvement of surfactin production by *B. subtilis* BBG131 using design of experiments in microbioreactors and continuous process in bubbleless membrane bioreactor. *Bioresource Technology* 218:944-952. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.053>
- Moyne AL, Shelby R, Cleveland TE and Tuzun S. 2001. Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *Journal of Applied Microbiology* 90: 622-629.
- Ohno A, Ano T and Shoda M. 1995. Effect of Temperature on Production of Lipopeptide Antibiotics, Iturin A and Surfactin by a Dual Producer, *Bacillus subtilis* RB14, in Solid-State Fermentation. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80(5):517-519.
- Pedraza-Herrera LA, Lopez-Carrascal CE and Uribe Vélez D. 2020. Mecanismos de acción de *Bacillus* spp. (Bacillaceae) contra microorganismos fitopatógenos durante su interacción con plantas. *Acta Biológica Colombiana* 25(1):112-125. <https://doi.org/10.15446/abc.v25n1.75045>

- Pérez-García A, Romero D and de Vicente A. 2011. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology* 22(2):187-193. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.12.003>
- Ragazzo-Sánchez JA, Robles-Cabrera A, Lomeli-González L, Luna-Solano G and Calderón-Santoyo M. 2011. Selección de Cepas de *Bacillus* spp. Productoras de Antibióticos Aisladas de Frutos Tropicales. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 17(Especial 1): 5-11.
- Ramírez-Benítez JE, Arjona Sabido RA, Caamal Velázquez JH, Rodríguez Ávila NL, Solís Pereira SE and Lizama Uc G. 2019. Inhibición del crecimiento y modificación genética de *Phytophthora capsici* usando quitosano de bajo grado de polimerización. *Revista Argentina de Microbiología* 51(1): 12-17. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.03.003>
- Tao Y, Bie X-m, Lv F-x, Zhao H-z and Lu Z-x. 2011. Antifungal activity and mechanism of fengycin in the presence and absence of commercial surfactin against *Rhizopus stolonifer*. *The Journal of Microbiology* 49(1):146-150. <https://doi.org/10.1007/s12275-011-0171-9>
- Toral L, Rodríguez M, Béjar V and Sampedro I. 2018. Antifungal Activity of Lipopeptides From *Bacillus* XT1 CECT 8661 Against *Botrytis cinerea*. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01315>
- Torres MJ, Brandan CP, Petroselli G, Erra-Balsells R and Audisio MC. 2016. Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and *B. amyloliquefaciens* against *Macrophomina phaseolina*: SEM study of fungal changes and UV-MALDI-TOF MS analysis of their bioactive compounds. *Microbiological Research* 182:31-39. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.09.005>
- Villegas-Escobar V, González-Jaramillo LM, Ramírez M, Moncada RN, Sierra-Zapata L, Orduz S and Romero-Tabarez M. 2018. Lipopeptides from *Bacillus* sp. EA-CB0959: Active metabolites responsible for in vitro and in vivo control of *Ralstonia solanacearum*. *Biological Control* 12: 20-28. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.06.005>
- Wang H, Tian R, Chen Y, Li W, Wei S, Ji Z and Aioub AAA. 2022. In vivo and in vitro antifungal activities of five alkaloid compounds isolated from *Picrasma quassioides* (D. Don) Benn against plant pathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 188:105246. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2022.105246>
- Wang Q, Chen S, Zhang J, Sun M, Liu Z and Yu Z. 2008. Co-producing lipopeptides and poly- γ -glutamic acid by solid-state fermentation of *Bacillus subtilis* using soybean and sweet potato residues and its biocontrol and fertilizer synergistic effects. *Bioresource Technology* 99(8):3318-3323. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.052>
- Xu Y, Cai D, Zhang H, Gao L, Yang Y, Gao J, Li Y, Yang C, Ji Z, Yu J and Chen S. 2020. Enhanced production of iturin A in *Bacillus amyloliquefaciens* by genetic engineering and medium optimization. *Process Biochemistry* 90:50-57. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.017>
- Yan F, Li C, Ye X, Lian Y, Wu Y and Wang X. 2020. Antifungal activity of lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* MG3 against *Colletotrichum gloeosporioides* in loquat fruits. *Biological Control* 146:104281. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104281>
- Yu GY, Sinclair JB, Hartman GL and Bertagnolli BL. 2002. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology and Biochemistry* 34(7):955-963. [https://doi.org/10.1016/s0038-0717\(02\)00027-5](https://doi.org/10.1016/s0038-0717(02)00027-5)
- Zhu J, Tan T, Shen A, Yang X, Yu Y, Gao C, Li Z, Cheng Y, Chen J, Guo L, Sun X, Yan Z, Li J and Zeng L. 2020. Biocontrol potential of *Bacillus subtilis* IBFCBF-4 against *Fusarium* wilt of watermelon. *Journal of Plant Pathology* 102(2):433-441. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00457-6>