



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante
Marcia Costa Lobo
Instituto de Ciencia y
Tecnología de los Alimentos
Facultad de Ciencias Agrarias

**FORMULACIÓN DE UN BIOPESTICIDA PARA COMBATIR
LA PUDRICIÓN HÚMEDA EN CALA (*Zantedeschia spp*)
PRODUCIDA POR *Erwinia carotovora***

Tesis de Grado presentada como parte
de los requisitos para optar al grado de
Licenciado en Bioquímica y Título
Profesional de *Bioquímico*

ANNESI GISELA GIACAMAN FONSECA

VALDIVIA – CHILE

2006

“Porque entre el sueño y la realidad sólo media la oportunidad”

Con mucho cariño a mis padres, hermanos y abuelitos
Sylvia, Eduardo, Nadia, Belen, Israel, Najibe, Erna y Omer.

Agradecimientos

Primeramente agradecer a Dios por esta enriquecedora experiencia de vida.

Expresar mis más sinceros agradecimientos a mi profesora patrocinante Ing.Civil Bioq.

Marcia Costa Lobo, por su gran dedicación y apoyo incondicional.

Hago extensivo mis agradecimientos a mis profesores informantes M.Sc., Ph.D. Luigi

Ciampi y Dr. en Ciencias Jaime Figueroa.

Al personal docente del ICITAL, en especial a la profesora Sade Selaive y profesora

Mariela Horzella.

No puedo dejar de agradecer a una persona muy especial, a mi compañero y amigo

Pedro Arriagada por su apoyo, comprensión y cariño.

Por último agradecer en forma especial a todos mis amigos y compañeros que conocí

en el transcurso de mi carrera universitaria, en forma especial a Annette, M^o Clara y

Jocelyn.

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN FINANCIADO POR EL PROYECTO FONDEF DO3I

1140

INDICE GENERAL

Capítulo		Página
1	RESUMEN	1
1.1	SUMARY	2
2	INTRODUCCIÓN	3
2.1	El cultivo de calas (<i>Zantedeschia</i> spp.)	3
2.1.1	Características de la planta	3
2.1.2	Cultivo de Cala a nivel mundial	5
2.1.3	Cultivo de cala en Chile	5
2.1.4	Fitopatógenos que afectan a cala	6
2.1.5	Pérdidas Económicas	7
2.2	El complejo <i>Erwinia</i>	7
2.2.1	Características taxonómicas del género <i>Erwinia</i>	7
2.2.2	Características taxonómicas del género <i>Erwinia carotovora</i>	8
2.2.3	Pudrición blanda producida por <i>Erwinia</i>	8
2.2.3.1	Mecanismo de virulencia	8
2.2.3.2	Sintomatología	10
2.2.3.3	Cronología del proceso infeccioso	11
2.2.2.4	Condiciones óptimas para la infección	11
2.3	Biocontrol	12
2.3.1	Definición de control biológico	12

2.3.2	Antecedentes históricos	13
2.3.3	Ventajas del control biológico en relación a otros métodos de control	14
2.3.4	Clases de control biológico	15
2.3.5	Mecanismos de control biológico	16
2.3.6	Principales géneros o grupos de bacterias antagonistas	19
2.3.7	Mecanismos de antagonismos asociados a bacterias	20
2.3.8	Control biológico y manejo integrado de plagas	20
2.4	<i>Bacillus</i> spp. como agente de control biológico	21
2.4.1	Características taxonómicas del género <i>Bacillus</i> spp.	21
2.4.2	Características del grupo <i>subtilis</i>	21
2.4.3	Síntesis y función específica de antibióticos producidos por <i>Bacillus subtilis</i>	22
2.4.3.1	Lantibióticos	22
2.4.3.2	Lipopéptidos cíclicos: Iturinas y Surfactinas	23
2.4.4	Producción de lipopéptidos	35
2.4.5	Purificación de lipopéptidos	40
2.5	Mecanismo de Inducción	41
2.6	Producción de una alta cantidad de biomasa	42
2.7	Hipótesis y objetivos	43
3	MATERIALES Y METODOS	49
3.1	Materiales	49
3.1.1	Material biológico	49

3.1.1.1	Cepa bacteriana	49
3.1.1.2	Organismo patógeno	50
3.1.2	Reactivos	50
3.1.3	Equipos	51
3.2	Métodos	52
3.2.1	Caracterización de la cepa BC10	52
3.2.2	Afinamiento de las pruebas de antagonismo <i>in vitro</i>	53
3.2.3	Estudios preliminares para el crecimiento de la cepa BC10	54
3.2.4	Determinación de la cinética bacteriana	56
3.2.5	Producción de la cepa BC10	57
3.2.5.1	Condiciones de cultivo en matraz agitado	58
3.2.5.2	Condiciones de cultivo en batch	59
3.2.5.3	Condiciones de cultivo continuo	59
3.2.6	Obtención de un superconcentrado celular de la cepa BC10	60
3.2.7	Estabilidad del concentrado celular	61
3.2.8	Recuento celular	61
3.2.9	Aislamiento y caracterización parcial de la sustancia antagonista	62
3.2.9.1	Protocolos de aislamiento de la sustancia antagonista	62
3.2.9.2	Inducción de la producción de sustancia antagonista por BC10 en presencia de <i>Erwinia carotovora</i>	63
3.2.9.3	Purificación parcial de la sustancia antagonista por medio de Centriplus®	64

3.2.9.4	Determinación de la concentración de proteínas mediante el método de Sedmak	67
3.2.9.5	Espectro de absorción de la sustancia antagonista	68
3.2.9.6	Hemólisis de eritrocitos humanos	68
3.3	Estabilidad de los extractos crudos	69
4	RESULTADOS	71
4.1	Caracterización de la cepa BC10	71
4.2	Afinamiento de las pruebas de antagonismo <i>in vitro</i>	71
4.3	Estudios preliminares para el crecimiento óptimo de la cepa BC10	80
4.4	Determinación de la cinética bacteriana	81
4.5	Producción de la cepa BC10	83
4.6	Obtención de un superconcentrado celular de la cepa BC10	89
4.7	Estabilidad del concentrado celular	89
4.8	Recuento celular	93
4.9	Aislamiento y caracterización parcial de la sustancia antagonista	93
4.9.1	Inducción de la producción de la sustancia antagonista por BC10 en presencia de <i>Erwinia carotovora</i>	95
4.9.2	Purificación parcial de la sustancia antagonista por medio de Centriplus	95
4.9.3	Determinación de la concentración de proteínas a través del método Sedmak	98

4.9.4	Estimación del peso molecular	101
4.9.5	Espectro de absorción de la sustancia antagonista	101
4.9.6	Hemólisis de eritrocitos humanos	101
4.9.7	Estabilidad del extracto crudo	101
5	DISCUSIÓN	105
5.1	Características fenotípicas de la cepa BC10	106
5.2	Afinamiento de las pruebas de antagonismo <i>in vitro</i>	106
5.3	Estudios preliminares para el crecimiento de la cepa BC10	109
5.4	Cinética de crecimiento	113
5.5	Recuentos celulares	115
5.6	Producción de cantidades de antagonista	115
5.7	Pruebas de inducción	116
5.8	Purificación y caracterización parcial del metabolito antagonista	119
5.8.1	Estrategia de purificación parcial	119
5.8.2	Caracterización parcial	120
5.9	Estudios de estabilidad del formulado líquido	122
5.10	Conclusiones	124
6	BIBLIOGRAFÍA	128
7	ANEXOS	149

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Variantes de la familia de iturinas, surfactina y liquenisinas	48
2	Diseño preliminar de medios de cultivo	54
3	Composición de los medios de cultivos líquidos usados para la cepa BC10	57
4	Condiciones del cultivo en batch	60
5	Diseño experimental de las pruebas de inducción	66
6	Resultados de las pruebas bioquímicas realizada a la cepa BC10	72
7	Porcentajes de identificación de los taxones significativos para la cepa BC10	76
8	Medidas de los halos externos de inhibición	78
9	Parámetros cinéticos obtenidos con la cepa BC10 en los distintos medios de cultivos líquidos	83
10	Operación en cultivo continuo	88
11	Duración y densidad óptica de cada etapa del cultivo continuo	89
12	Diámetro de los halos de inhibición de los E.C.I	98

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Lantibióticos producidos por <i>Bacillus subtilis</i> . Estructura esquemática de subtilina y mersacidina	45
2	Estructura primaria de los lipopéptidos A) Iturina A, B) Surfactina ,C) Liquenisina	46
3	Estructura protonada de Surfactina	47
4	Diagramas del ensayo de antagonismo <i>in vitro</i> a <i>Erwinia carotovora</i>	55
5	Equipo Spintrex TM y esquema de operación en recirculación	65
6	Detalle de la cámara de contaje (Neubauer)	65
7	Diagrama de flujo del proceso de purificación parcial de la sustancia antagonista	70
8	Crecimiento de la cepa BC10 en medio sólido APD	73
9	Fotografía al microscopio óptico de la cepa BC10	74
10	Micrografía electrónica de barrido de la cepa BC10	75
11	Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i>	77
12	Visualización del doble halo de inhibición	79
13	Micrografías de microscopía electrónica de barrido de la “nata o velo”	82
14	Cinética de crecimiento de la cepa BC10 en el medio	84

	A) MBA y B) MCP	
15	Cinética de crecimiento de la cepa BC10 en el medio A)MBM C/Ca ⁺² y B) MBM S/Ca ⁺²	85
16	Muestra representativa de los antagonismo <i>in vitro</i> en agar papa dextrosa	86
17	Fotografía de la producción de la cepa BC10 en el microfermentador de 14L y los equipos adicionales del sistema	89
18	Producción de la cepa BC10 mediante cultivo continuo	90
19	Obtención del superconcentrado celular a través del sistema Spintrex™	92
20	Estabilidad del concentrado celular	94
21	Ensayos de inducción	96
22	Gráfica comparativa de la Cinética de crecimiento	97
23	Antagonismo <i>in vitro</i> de los extractos crudos inducidos	99
24	Purificación parcial de metabolito antagonista	102
25	Prueba de antagonismo <i>in vitro</i> de la fracción del filtrado YM-3	103
26	Espectro UV-visible de E.C.U.I.	104

INDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Identificación cepa BC10 sistema API	150
2	Determinación del pH de la tierra	150
3	Preparación buffer fosfato	151
4	Cálculos cultivo continuo	152
5	Preparación de medios sólidos para los ensayos de antagonismo <i>in vitro</i>	154
6	Protocolos de purificación que fueron probados antes de los ensayos de inducción	155
7	Método de Sedmak	162
7.1	Preparación ácido clorhídrico	162
7.2	Azul de Coomassie G250 diluido en HCl	162
7.3	Preparación Suero fisiológico	163
7.4	Estándar de albúmina	163
8	Composición de la melaza lansa utilizada para la producción de levadura Collico	164
9	Hidrólisis de almidón	165
10	Sistema de filtración estacionaria con vibrador Millipore	166

ABREVIATURAS

BC10	Cepa <i>Bacillus Subtilis</i>
LC10	Cepa <i>Erwinia carotovora</i>
APD	Agar papa dextrosa
MB Ca ⁺²	Medio base con calcio
MBM _a	Medio base con manitol
MBG	Medio base con glucosa
MBA	Medio en base a Azúcar
MCP	Medio complejo con peptona
MCP-Ca ⁺²	Medio complejo con peptona y calcio
MBS	Medio en base a suero
MBM S/Ca ⁺²	Medio en base a Melaza sin calcio
MBM C/Ca ⁺²	Medio en base a melaza sin calcio
μ	Velocidad específica de crecimiento
t_d	Tiempo de duplicación
vvm	Volumen de aire/ volumen de medio x min
Dc	Dilución crítica
C.B.I.E	cultivo de BC10 inducido por <i>Erwinia</i>
E.C.	Extracto crudo
E.C.I.	Extracto crudo inducido
E.C.U.I.	Extracto crudo ultrafiltrado inducido

PM	Peso molecular
PPCO	Polipropileno copolímero

1. Resumen

La cala (*Zantedeschia spp.*), flor ornamental de gran interés comercial, se ve afectada por la putrefacción blanda causada por *Erwinia carotovora*.

El objetivo de la presente investigación, consistió en formular un biopesticida contra este fitopatógeno a partir de la cepa antagonista BC10, por lo que se efectuaron estudios de crecimiento y la producción de una mayor cantidad de ésta en tres modalidades; Batch de L, 14 L y cultivo continuo. Al mismo tiempo, se aisló y purificó parcialmente el metabolito que produce el efecto inhibitorio a través de sucesivas etapas de ultrafiltración, para finalizar con un estudio en el tiempo de la persistencia del efecto antagonista del formulado.

Los resultados mostraron, que el cultivo de la cepa en medios de bajo costo es adecuado, además, fue posible determinar que el metabolito que produce el antagonismo resulta inducible a la presencia de *Erwinia carotovora*, siendo liberado al medio en la segunda mitad de la fase exponencial de crecimiento del *Bacillus*. por otra parte, los ensayos realizados indicaron la presencia de un metabolito extracelular, con peso molecular estimado bajo los 3000 Da, que tiene un pick de absorción en el espectro UV. Respecto a la estabilidad del concentrado celular y el extracto crudo, estos persisten por 240 días y dos semanas respectivamente. En conclusión, el efecto antagónico observado *in vitro* y la estabilidad del concentrado celular permiten que este formulado sea efectivo contra la infección de *Erwinia* y la proyección de su uso en la agricultura.

1.1 SUMMARY

The calla is an ornamental flower of commercial interest that is affected by soft rot caused by *Erwinia carotovora*.

The objective of this research was to formulate a biopesticide against this phytopathogen from antagonistic strain BC10. Therefore, studies targeting the growth and the production of a greater amount of the stock in three modalities; Batch of L, 14 L and continuous culture were done. At the same time, the metabolite responsible for the inhibiting effect was isolated and purified partially through successive stages of ultrafiltration, finalizing with a study of the persistence in time of the antagonistic effect of the crude extract.

The results showed that the culture of the strain in a low cost medium is adequate. In addition it was possible to determine that the metabolite responsible for the antagonism is induced by the presence of *Erwinia carotovora*, being released into the culture in the second half of the exponential phase of growth of the *Bacillus*. On the other hand, the tests indicated the presence of an extracellular metabolite, with molecular weight under the 3000 Da, that has an absorption peak in the UV range of the spectrum. In relation to the stability of cellular concentrate and the crude extract, these respectively persist by 240 days and two weeks. In conclusion, the antagonistic effect observed in vitro and the stability of the cellular concentrate anticipate that this formulation is effective against the *Erwinia carotovora* infection, and the applications of its use in agriculture are viable.

2. Introducción

2.1 El Cultivo de la cala (*Zantedeschia* spp.)

2.1.1 Características de la planta

La Cala, se cultiva como ornamental por sus vistosas flores, es originaria del continente africano, particularmente de Sudáfrica (Seemann y Andrade, 1999; Snijder, 2004). En general, el género *Zantedeschia* es diploide, con 32 cromosomas (Snijder, 2004). El tubero, es de forma globosa y redondeada, con diámetros que pueden llegar a los 8 ó 9 cm y una altura de 5 cm o más.

La clasificación botánica es la siguiente:

Clase	Monocotiledóneas
Orden	<i>Spadiciflorae</i>
Familia	<i>Araceae</i>
Subfamilia	<i>Philodendrae</i>
Tribu	<i>Zantedeschieae</i>
Género	<i>Zantedeschia</i>

(Mohsen y Ebrahim, 2004).

Dentro del género *Zantedeschia*, existen diversas especies que se han separado en dos grupos según las diferencias en cuanto a su órgano de reserva, a la persistencia del follaje y época de floración. Es así como, las plantas de *Z. aethiopica*, la cala blanca que se encuentra comúnmente en jardines se caracteriza por poseer un rizoma, mantener su parte aérea activa durante todo el año y florecer desde final de invierno hasta la primavera. El segundo grupo, las calas de colores, está formado por seis especies: *Z. rehmannii*, *Z. elliotiana*, *Z. albomaculata*, *Z. jucunda*, *Z. pentlandii* y *Z. odorata*. Todas estas, tienen un potencial económico interesante hoy en día, su órgano basal subterráneo es un tubero y su follaje sufre una senescencia completa tras el verano, época en la que florecen (Plummer *et al.*, 1990; Seemann y Andrade, 1999; Snijder, 2004).

Si bien el cultivo de cala es natural del sur de África y zonas con clima templado, su cultivo ha resultado exitoso en zonas de clima frío ([http:// www.callas.net.nz](http://www.callas.net.nz)). La temperatura mínima para el crecimiento es de 5°C y la temperatura óptima 25°C (Funnell 1994, citado por Wright 2002).

Kuehny *et al.*, (1998 y 2000), sugieren que aunque las calas pueden tolerar temperaturas más altas (>27°C), el riesgo de infecciones por *E. carotovora* subsp. *carotovora* aumenta. Estas infecciones puede ocurrir a temperaturas sobre los 10°C, pero la óptima para el desarrollo de estas enfermedades es, entre 25 -30°C (Wright, 1998).

2.1.2 Cultivo de cala a nivel mundial

Cala es cultivada en numerosos países del mundo donde el líder mundial indiscutido en los años 1992/1993 fue Nueva Zelanda, que exportó más de 3 millones de varas florales y más de 1,4 millones de túberos. Lo seguía Holanda, segundo país de importancia en la producción de calas de colores y Estados Unidos en tercer lugar (Seemann y Andrade, 1999).

Entre los años 1990 y 1998, Nueva Zelanda aumentó drásticamente la exportación de calas de \$ 1,9 millones NZ a \$9,7 millones NZ. Los principales mercados de comercialización fueron Japón que absorbió el 30- 40 % de las cosechas, seguido por Europa (30-35 %), y Norteamérica (10-15 %). Las principales áreas de cultivo en Nueva Zelanda son, Auckland y Cantorbery, donde los túberos de calas normalmente son plantados en el campo entre noviembre-septiembre (Wright y Burge, 2000).

2.1.3 Cultivo de cala en Chile

El cultivo de cala en Chile, se realiza normalmente en primavera y se mantienen durante el verano, procediendo de esta forma a su cosecha en otoño.

(http://www.sitec.cl/Doc/flores_corte)

Según información publicada por Sitec (Servicio de Información Técnico y Comercial para la Agricultura Familiar Campesina) en su sitio online, en el año 2004, las calas representaron un 11% del total de flores exportadas por Chile. Su producción y exportación ha adquirido gran importancia en los últimos dos años. El 61% de sus exportaciones tiene como destino Holanda, y el 39% restante, Estados Unidos.

Aproximadamente el 50% de los envíos se realizan durante el mes de diciembre (ODEPA, 2005).

Respecto al mercado nacional para esta flor, Mera (2004), mediante entrevistas personales a dueños de 119 florerías de Santiago y de las principales ciudades del sur de Chile (Concepción, Temuco, Valdivia, Osorno y Puerto Montt), determinó una demanda anual aproximada de 160.000 varas concentradas entre noviembre y febrero de cada temporada, las cuales son adquiridas principalmente por personas de estratos altos y medios.

Esta especie es producida por medianos y grandes agricultores de la IX y X del país (ODEPA, 2005), mostrando una buena adaptación a las condiciones edafoclimáticas de esta zona.

2.1.4 Fitopatógenos que afectan a cala

Según Wright (1998); Snijder y Tuyl (2002); (<http://www.actahort.org>), la patología más importante que afecta a cala, provocando importantes pérdidas económicas, es la incidencia de la pudrición blanda en tejidos de túberos, causada por *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc).

Otras bacterias asociadas a la putrefacción blanda de calas incluyen, *E. carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca) y *Pseudomonas marginalis* (Wright, 1998).

2.1.5 Pérdidas Económicas

Funnell (1993), citado por Blom y Brown (1999), señala que en las plantaciones de calas, las pérdidas ocasionadas por *Erwinia carotovora* (Dye) hall, alcanzan en muchas ocasiones el 30%. En 1980, pérdidas mundiales atribuidas a la putrefacción bacteriana se estimaron por sobre los US \$100 millones/año. En Nueva Zelanda la industria de cala pierde más de 2 millones \$NZ por año (Vanneste hort net.; Wright, 1998) y en Chile, Etcheverría (2002), señala que la pudrición causada por *E. carotovora* en los túberos de cala puede causar pérdidas hasta del 100% en una plantación.

2.2 El complejo Erwinia

Del total de bacterias asociadas a pudriciones húmedas, las más importantes como patógenos primarios de plantas en crecimiento así como en productos cosechados, son aquellas pertenecientes al género *Erwinia*, siendo estas las más comunes y destructivas (Pérombelon y Kelman, 1980).

2.2.1 Características taxonómicas del género *Erwinia*

Los miembros del género *Erwinia*, pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* (Toth *et al.*, 2001), son bacilos rectos 0,7-1,5 μ , Gram negativos, no esporulados, móviles por flagelos peritricos. Son anaerobios facultativos, catalasa negativa y oxidasa positiva. Las colonias son usualmente blancas, grises o amarillentas, con temperaturas óptimas de cultivo de 27-30° C (Dye, 1969; Roberts y Boothroyd, 1975; Pérombelon y Kelman, 1987).

2.2.2 Características taxonómicas del género *Erwinia carotovora*

Dentro del género *Erwinia*, se encuentra un grupo patogénico que se caracteriza por causar la pudrición blanda en muchas especies de plantas a nivel mundial. Dentro de este grupo se encuentran Ecc y Eca, las que crecen a temperaturas diferenciales, es decir *E. carotovora subsp. carotovora* crece a 27 y 33,5°C, y *atroseptica* crece a 27°C (Toth *et al.*, 2001).

E. carotovora, es un miembro de la familia *Enterobacteriaceae* recientemente llamadas *Pectobacterium carotovorum*, (Pérombelon, 2002; Toth *et al.*, 2003; Smadja *et al.*, 2004). Son bacilos Gram negativos, poseen flagelos peritricos (Wright, 1998), producen enzimas pectinolíticas que causan pudrición blanda (Roberts y Boothroyd, 1975) y se encuentra a nivel mundial sobre un amplio rango de hospederos (Smadja *et al.*, 2004).

2.2.3 Pudrición blanda producida por *Erwinia*

2.2.3.1 Mecanismo de virulencia

Las *Erwinias* que causan pudrición blanda se encuentran sobre la superficie de las plantas o en el suelo. Las vías de penetración son a través de heridas o de aperturas naturales en la superficie de la planta. Una vez dentro, estos residen en el tejido vascular y espacio intracelular del tejido parenquimático (Toth *et al.*, 2003).

La principal arma que utilizan las *Erwinias* que causan pudrición blanda, es la producción de múltiples exoenzimas, como las pectinasas, celulasas y proteasas, que dañan la pared celular (Barras *et al.*, 1994; Pérombelon, 2002).

Pectinasas, en especial la pectin transeliminasa o pectatoliasa (PL) y poligalacturonasa (PG), son las principales exoenzimas, relacionadas en el desarrollo de la enfermedad (Starr y Chatterjee, 1972). Estas utilizan las pectinas de la lamela media y la pared celular, causando el colapso del tejido (Barras *et al.*, 1994; Pérombelon, 2002).

Collmer y Keen (1986), señalan que PL, rompe las uniones glucosídicas del ácido poligalacturónico insaturado (4 deoxi-5 oxo D-glucuronato), mientras que PG, actúa por hidrólisis enzimática, produciendo monómeros y dímeros del ácido galacturónico.

Liao (1989) y Toth *et al.*, (2003), señalan que la actividad de Pel y Prt (proteasa), contribuyen a la aparición de síntomas, durante el ataque de *E. carotovora*. Las pectatoliasas están asociadas al catabolismo de los hexuronates y estos con la maceración de los tejidos de la planta hospedera, mientras que, las celulasas exhiben actividad endoglucanasa, dañando la celulosa de la pared celular primaria y secundaria de la planta huésped. Por último, las proteasas pueden actuar proveyendo amino ácidos para la biosíntesis de las proteínas microbianas. Durante la maceración, algunas proteínas contenidas en la célula o en la pared celular y la membrana citoplasmática, pueden ser degradadas por las proteasas, liberando aminoácidos, que proveen una fuente de nitrógeno para el patógeno (Marits *et al.*, 1999, citado por Smadja, 2004).

- **Regulación y secreción de exoenzimas**

La acción de las pectinasas sobre la pectina y pectato de la lamela y las células de la pared, está regulada por sustancias relacionadas con la inducción de exoenzimas, que actúan a través de un mecanismo de *feed back* positivo, acelerando la producción de

exoenzimas. Los productos intermediarios, 5-ceto-4-deoxiuronato (DKI), 2,5-diceto-3-dexigluconato (DKII) interactúan con el represor transcripcional, KdgR. En ausencia de infección, KdrR se une a los sitios conservados de unión de los operones de un gran número de genes relacionados a la pectinólisis, incluyendo las pectatoliasas y otras enzimas como celulasas y proteasas. Los intermediarios producidos durante el proceso infeccioso, interactúan con KdgR, causando su disociación al sitio de unión y por ende la inducción de los determinantes de patogenicidad (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1996; Toth *et al.*, 2003).

N-(3-oxohexanoil)-l- homoserina lactona (OHHL), es una molécula de difusión pequeña, que se expresa en forma constitutiva en niveles basales. Sin embargo, cuando la población bacteriana se incrementa aproximadamente en 10^6 UFC/mL, OHHL alcanza niveles críticos, suficientes para la completa activación de los genes *expR* y *carR*, acelerando la producción de factores de patogenicidad. Esta molécula recibe el nombre de activador transcripcional, ya que induce la producción de exoenzimas (Fuqua *et al.*, 2001; Pérombelon, 2002; Snijder, 2004).

2.2.3.2 Síntomatología

Aparentemente, la primera respuesta patológica del tejido afectado por las bacterias pectinolíticas, es la maceración que resulta de la hidrólisis del material péctico en la lamela media (Roberts y Boothroyd, 1975; Snijder, 2004). Las plantas infectadas se tornan amarillas, emitiendo muy mal olor, pudiendo ser completamente macerada al cabo de unos días provocando su muerte (Wright, 1998).

2.2.3.3 Cronología del proceso infeccioso

Según Mäe *et al.*, (2001), citado por Smadja *et al.*, (2004) la cronología del proceso infeccioso de la pudrición blanda es particularmente significativo. Primero, la bacteria presente (inicialmente en estado latente) en un área de infección privilegiada, como una herida, lenticelas, o tallo, comienza la multiplicación activa, sin macerar las células vegetales (Marty *et al.*, 1997). Cuando alcanzan un número crítico, generalmente estimado en 10^7 - 10^8 células/g de tejido podrido o sitio de infección (Pérombelon, 2002) las bacterias secretan una gran variedad de enzimas líticas extracelulares, que degradan la células vegetales, órganos y tejidos (Barras *et al.*, 1994).

Blom y Broncea (1999), aclara que la infección no siempre resulta en la putrefacción blanda de los tejidos, sino que, en algunas oportunidades la bacteria puede permanecer en forma latente durante mucho tiempo.

2.2.2.4 Condiciones óptimas para la infección

Según Maher y Kelman (1983), la pudrición blanda causada por *E. carotovora* es más severa cuando los tubérculos están bajo condiciones de oxígeno reducido, ya que la baja tensión de oxígeno provoca que los túberos sean cubiertos por una película de agua. El número de colonias formadoras (UFC) de *Erwinia carotovora*, que se requieren para iniciar la pudrición, disminuye de 10^9 a 10^5 UFC en el sitio de infección, cuando la concentración de oxígeno decrece de 20 a 5%. Smadja *et al.*, (2004), agrega que las condiciones medioambientales, como humedad, temperatura, $P_{P_{O_2}}$ y $P_{P_{CO_2}}$ influyen en gran manera en la aparición y magnitud del daño causado. El estrés de las plantas

causada por la irrigación excesiva o deficiente puede predisponer a las plantas a la enfermedad (Wright y Burge, 2000).

2.3 Biocontrol

Las presiones económicas y ecológicas, han llevado a las instituciones ejecutoras y financieras a generar alternativas al control químico exclusivo en la protección de plantas. Dentro de estas alternativas, el control biológico es un método relativamente moderno, cuyo objetivo principal es el mantener, a través de ciertas prácticas y de la introducción de una biomasa de antagonista, todos los componentes del agrosistema en perfecto equilibrio (Bettiol, 1991).

El control biológico junto con otras medidas ofrece una solución al problema de la pudrición blanda provocada por *E. carotovora*. En este ámbito, se han descrito algunos microorganismos que tienen efectos inhibitorios sobre *Erwinia* en tubérculos de papa (Emmert y Handelsman, 1999), entre los que se puede mencionar a los géneros *Pseudomonas* spp. (Xu y Gross, 1986 ab) y *Bacillus* spp. (Visser *et al.*, 1986).

2.3.1 Definición de control biológico

Entre los autores no existe aún consenso sobre lo que constituye el control biológico. De Batch (1964) citado, por Deacon (1983), lo define como la acción de depredadores, parásitos, o patógenos en el mantenimiento de la densidad poblacional de otro organismo en un promedio inferior del que ocurriría en su ausencia.

Deacon (1983), propone una definición basada en Garrett (1970), la cual comprende tanto a parásitos como patógenos de plantas. El control biológico es la práctica o el proceso por el cual, los efectos indeseables de un organismo se reducen por la acción de otro organismo que no es la planta huésped, ni el parásito o patógeno, ni el ser humano. En otras palabras, el biocontrol está mediado por un tercero; en el caso del biocontrol microbiano este es un microorganismo.

Una manera tradicional de definir control biológico de enfermedades de plantas es considerarlo como: el control de un microorganismo a través de otro microorganismo (Bettiol, 1991)

Baker y Cook (1974), definen control biológico como la reducción de la densidad del inóculo o de las actividades determinantes de la enfermedad de un patógeno o parásito, en sus estados de actividad o de latencia por uno o más organismos, realizado naturalmente o a través de la manipulación del ambiente, hospedero o antagonista. Esta definición fue completada por Baker y Cook (1983), quienes explican que actividades determinantes de enfermedad comprenden: crecimiento, infectividad, virulencia, agresividad y otras cualidades del patógeno o procesos que determina infección, desenvolvimiento de síntomas o reproducción.

2.3.2 Antecedentes históricos

Según Campbell (1989), el control biológico nace como un método científico hacia el final del siglo XIX. En 1920 se observa un incremento en el número de publicaciones reportando el uso de antagonistas fúngicos como control biológico.

2.3.3 Ventajas del control biológico en relación a otros métodos de control (Deacon, 1983).

El control biológico presenta las siguientes ventajas:

- a) Poco o ningún efecto nocivo de los enemigos naturales hacia otros organismos, incluido el hombre. En comparación con algunos agentes de control químico, estos microorganismos tienen la particularidad de no acumularse en la cadena alimentaria, no existiendo problemas de intoxicaciones.
- b) El control es relativamente a largo plazo, con frecuencia permanente.
- c) Se le puede usar dentro del contexto del manejo integrado de plagas, siendo compatible con otros agentes de control, incluyendo los químicos.
- d) En general, los agentes de control biológico han mostrado tener escasos efectos sobre el equilibrio ecológico.

- **Efectos adversos de la aplicación de agroquímicos en la salud humana.**

El control biológico surge como una opción atractiva para el manejo de fitopatógenos y como alternativa a la aplicación de agroquímicos. Si bien estas sustancias químicas son un instrumento importante en el control de plagas agrícolas, provocan serios efectos ecotóxicos y como señala Márquez *et al.*, (2005) representan una fuente de exposición significativa a agentes potencialmente tóxicos.

La exposición a pesticidas se ha asociado con el asma aguda y crónica, dermatitis alérgica, y enfermedades respiratorias (Zuskin *et al.*, 1993). Existen Informes sobre el envenenamiento agudo, problemas respiratorios, problemas de visión, dolores de

cabeza, y depresión. Además, los pesticidas han sido estudiados por su riesgo a largo plazo, incluyendo su asociación con aumentos en la incidencia de cáncer, como la leucemia (Daniels *et al.*, 1997), cáncer de vejiga (Viel y Chalier, 1995), y cáncer pancreático (Ji *et al.*, 2001) y efectos citogenéticos estudiados en mujeres temporeras (Márquez *et al.*, 2005).

2.3.4 Clases de control biológico

- **Control biológico por conservación.** El primer paso en el control biológico consiste en conservar (promover la actividad, sobrevivencia y reproducción) a los enemigos naturales nativos (o ya presentes en un cultivo), a fin de incrementar su impacto sobre las plagas. Esta clase de antagonista debería ser preferido a otros organismos foráneos que igualmente son antagonista sobre los patógenos, ya que posiblemente los microorganismos de otros ambientes estarían menos adaptados a vivir por un largo periodo en el fitoplano y en consecuencia existiría la necesidad de ser reaplicados más frecuentemente (Bettiol, 1991).
- **Control biológico por introducción.** La colonización por microorganismos artificialmente introducidos en el medio ambiente, es una alternativa cuando no hay enemigos naturales que controlen efectivamente a la plaga. Esta forma de control, es también conocida con el nombre de control biológico clásico, y es utilizada más frecuentemente en el control de plagas exóticas, las cuales comúnmente llegan a una nueva área sin factores naturales de control. Sin embargo, también se puede usar en el control de plagas nativas que carecen de enemigos naturales (Campbell, 1989; Bettiol, 1991). Entretanto según lo

señalado por Alexander (1971), citado por Bettioli (1991), la microflora existente en el ambiente pone resistencia a los recién llegados, previniendo su establecimiento en el ecosistema.

- **Control biológico por incremento.** Cuando los enemigos naturales son biológicamente efectivos, pero fallan en controlar a las plagas no obstante los esfuerzos de conservación o introducción, se puede recurrir al incremento, es decir, a su crecimiento masivo. Debido a que esta forma de control biológico puede ser más cara que las otras, sólo se deberá recurrir a ella si las otras formas de control son ineficientes. Por último, es necesario que sea competitiva en términos económicos, particularmente con el control químico (Campbell, 1989).

2.3.5 Mecanismos de control biológico

Según lo señalado por Henis y Chet (1975), citado por Bettioli (1991), la dinámica del equilibrio ecológico prevaleciente en los ecosistemas naturales, depende entre otros factores de la relación entre los habitantes microbianos. Esas interacciones complejas pueden ser neutras, benéficas o ditrimental. De acuerdo con Blakeman y Fokkenma (1982), un conocimiento sobre los mecanismos de antagonismos de los organismos colabora en la determinación de la época, la forma y la cantidad adecuada de aplicación de los antagonistas.

No es fácil determinar con precisión, los mecanismos que intervienen en las interacciones entre antagonistas y patógenos a nivel de las plantas. En general, los

antagonistas no tienen un único modo de acción y la diversidad de mecanismos, es una característica a seleccionar en un antagonista para aumentar las posibilidades de éxito. Se han descrito varios mecanismos de acción de antagonistas en el control del desarrollo de patógenos. Ellos son: antibiosis, competencia, parasitismo, depredación, hipovirulencia e inducción de defensa por parte del hospedero (Baker y Cook, 1974; Blakeman y Fokkema, 1982)

- **Antibiosis**, se refiere a la interacción entre organismos en la cual uno o más metabolitos producidos por un organismo, tienen un efecto perjudicial sobre otro. Usualmente ocurre inhibición del crecimiento y/o en la germinación, pudiendo ser letal debido a que el metabolito puede penetrar una célula e inhibir su actividad por toxicidad química. Innumerables autores muestran el potencial de organismos que producen antibióticos para control biológico de plantas (Bettiol, 1991).
- **Competición**, se refiere a la interacción entre dos o más organismos empeñados en la misma acción. Un factor esencial para que exista competencia es que haya "escasez" de un elemento. Una competencia entre microorganismo ocurre principalmente por alimento (carbohidratos, nitrógeno y factores de crecimiento), por espacio y por oxígeno (Bettiol, 1991).
- **Interacción directa**, existen dos tipos de interacciones directas entre los antagonistas y los patógenos. Ellas son el parasitismo y la depredación.
- **Parasitismo**, el término parasitismo se refiere al hecho de que un microorganismo parasite a otro. Puede ser definido como una simbiosis

antagónica entre organismos y consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista. Generalmente se ven implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas, que lisan o digieren las paredes de los hongos (Campbell, 1989).

- **Predación** En el caso de la predación el antagonista se alimenta de materia orgánica entre la cual ocasionalmente se encuentra el patógeno. No ha sido un mecanismo de acción muy importante en el desarrollo de agentes de biocontrol. Los reportes más conocidos citan la presencia de amebas en los suelos como agentes supresores de enfermedades, las que ejercen su efecto al alimentarse de las hifas (cuerpos) de los hongos patógenos (Campbell, 1989).

Campbell (1989), agrega especificaciones respecto a algunos mecanismos de lisis, señalando que ésta se refiere a la completa o parcial destrucción de la célula por enzimas. Se pueden distinguir dos tipos de lisis; endolisis y exolisis, la endolisis (también llamada autolisis), es la interrupción del citoplasma de una célula por sus propias enzimas, lo que ocurriría después de su muerte, esto puede ser causado por carencia de nutrientes, por antibióticos u otras toxinas. Este mecanismo usualmente no está involucrado en la destrucción de la pared celular

En segundo lugar está la exolisis (también llamada heterolisis), la cual provoca la destrucción de la célula por enzimas o toxinas de otros organismos. Este mecanismo usualmente causa la destrucción de la pared celular por quitinas, celulasas, etc., lo cual resulta frecuentemente en la muerte celular.

Las toxinas a menudo son antibióticos que operan a bajas concentraciones: (menores a 10 ppm), que se diferencia de la producción de otras sustancias como la producción de ión hidrogeno (cambia el pH) o la producción de etanol, por requerir de una concentración relativamente alta para ser tóxicos o inhibir el crecimiento

Inducción de resistencia, Las plantas como otros seres vivos del planeta han pasado por un proceso evolutivo desde su aparición sobre la tierra, lo que les ha llevado a desarrollar mecanismos de defensa muy poderosos contra sus invasores. Estas presentan mecanismos bioquímicos y físicos o estructurales de resistencia, todos ellos gobernados genéticamente.

La inducción de defensa del hospedero por microorganismos no necesariamente antagonicos o sus metabolitos, tienen su acción dirigida a la planta hospedera y no al patógeno propiamente tal. El estímulo al hospedero, activa mecanismos de resistencia (protección inducida), como la producción de sustancias inhibidoras a la colonización (Campbell, 1989; Snijder, 2004).

2.3.6 Principales géneros o grupos de bacterias antagonistas

Entre los microorganismos más importantes se encuentran las bacterias del género, *Pseudomonas* y *Bacillus* y hongos de los géneros *Gliocladium*, *Fusarium* y *Trichodema* (Bettiol, 1991)

2.3.7 Mecanismos de antagonismos asociados a bacterias

Según Blakeman y Brodie (1976), los mecanismos básicos de antagonismo asociados a bacterias pueden ser de los siguientes tipos:

- a) Parasitismo directo o predación;
- b) Antibiosis
- c) Competición
- d) Estimulo del hospedero

2.3.8 Control biológico y manejo integrado de plagas

Existe una fuerte tendencia a la integración de diferentes métodos de control de enfermedades de plantas, como una alternativa con mayores posibilidades de éxito que la utilización de un único método, es así, que, la utilización exclusiva y continua de un funguicida específico para el control de una determinada enfermedad, puede generar cepas resistentes al patógeno, colocando en riesgo la eficiencia del control. (Bettiol, 1991).

Por otra parte, cuando se utiliza el control integrado debe haber una mínima interferencia entre los métodos aplicados, siendo interesante un efecto aditivo o sinérgico, en que cada control en su medida refuerce a los demás. En este aspecto, el control biológico por si mismo no provee una supresión económicamente aceptable de una plaga en los sistemas agrícolas, por ello debe ser desarrollado e implementado como un componente del Manejo Integrado de Plagas (MIP) (Baker y Cook, 1974).

2.4 *Bacillus* spp. como agente de control biológico

2.4.1 Características taxonómicas del género *Bacillus* spp.

En la búsqueda y selección de microorganismos como agentes de biocontrol, el género *Bacillus* spp. ha resultado de gran eficacia en el control de fitopatógenos (Katz y Demain, 1977).

El género *Bacillus* spp. consiste en un gran número de diversas formas de bastón, Gram positivo, oxidasa y catalasa positiva. Son bacterias móviles por flagelos peritricos y aeróbios estrictos en su mayoría (Sneath, 1989). En los medios de cultivo líquidos crecen formando un “velo” en la superficie (Wilson,2000). Miembros de este género son capaces de producir endosporas, las que resisten altas temperaturas y factores físicos perjudiciales como la desecación, la radiación, los ácidos y los desinfectantes químicos. (Sneath, 1989).

2.4.2 Características del grupo *subtilis*

Bacillus subtilis, es la especie tipo del género, se la encuentra comúnmente en el suelo y se caracteriza por ser una bacteria Gram positiva, catalasa positiva, producir una gran variedad de proteasas y otras enzimas que le permiten degradar una variedad de sustratos naturales contribuyendo al ciclo nutritivo (USA,1997). Respecto a las características de las colonias, estas se pueden observar redondeadas o irregulares, de superficie opaca, color crema o café. El cultivo activo es a pH 5,5-8,5. (Sneath, 1989).

B. subtilis, es un microorganismo ubicuo, no es considerado patógeno o toxigénico de los humano, animales, o plantas, por lo que el potencial riesgo asociado al uso de este, en instalaciones industriales es bajo. Es usado en la producción comercial ya que posee una reconocida actividad antimicrobiana, lo cual ha permitido emplearlo como un agente de control biológico (USA, 1997). *B. subtilis* produce más de dos docenas de antibióticos (Stein, 2005), donde la clase predominante son los de naturaleza peptídica (Katz y Demain, 1977).

2.4.3 Síntesis y función específica de antibióticos producidos por *Bacillus subtilis*

Respecto a la biosíntesis de antibióticos *B. subtilis* tiene genes especializados en esta función que corresponden al 4 -5 % del genoma de este. Se distinguen dos vías de biosíntesis:

- i) Síntesis ribosomal de péptidos, precursores lineales que están sujetos a la modificación post-traducciona l y procesamiento proteolítico.
- ii) Síntesis no ribosomal de péptidos, que está a cargo de un gran complejo multienzimático NRPSs (no ribosomal péptido sintetasa) (Stein, 2005).

2.4.3.1 Lantibióticos

Los lantibióticos son producidos por biosíntesis ribosomal como precursores peptídicos, los cuales son modificados posteriormente hasta obtener un compuesto biológicamente activo. (Schnell *et al.*, 1998 citado, por Rehm *et al.*, 1993). En la estructura de estos péptidos, se han encontrado un gran número de aminoácidos modificados y otros

residuos poco usuales, entre los cuales podemos mencionar a la lantionina, cuya formación implica modificaciones post-traduccionales que incluyen la deshidratación de serina y treonina y la posterior adición de grupos tioles (Guder *et al.*, 2000).

Según sus propiedades fisicoquímicas se ha sugerido que los lantibióticos pueden dividirse en dos grupos, lantibióticos tipo-A y tipo-B. Los primeros, contienen entre 21-38 residuos aminoacídicos, exhiben una estructura secundaria lineal y ejercen su efecto antimicrobiano mediante la formación de poros voltaje dependiente en la membrana citoplasmática. Del mismo modo, los lantibióticos tipo-B son generalmente más pequeños, compactos y de estructura globular. Actúan inhibiendo la biosíntesis de la pared celular (McAuliffe *et al.*, 2001; Stein, 2005).

Entre los lantibióticos producidos por cepas de *B. subtilis*, podemos mencionar la subtilina y la mersacidina (ver figura 1 página 45). La subtilina, es un pentaciclo péptido perteneciente al grupo de lantibióticos tipo-A, mientras que la mersacidina lantibiótico tipo-B se caracteriza por su fuerte actividad antimicrobiana, no obstante, es considerado el más pequeño de los lantibióticos (1825 Da) (Stein, 2005).

2.4.3.2 Lipopéptidos cíclicos: Iturinas y Surfactinas

Estos lipopéptidos cíclicos son metabolitos secundarios producidos por bacterias pertenecientes al género *Bacillus*, mediante un mecanismo no-ribosomal, su biosíntesis involucra grandes complejos multienzimáticos llamados peptido- sintetasas (NRPSs), los que utilizan el mecanismo de tiotemplado (Menkhaus *et al.*, 1993; Stein *et al.*, 1996; Duitman *et al.*, 1999). Los NRPSs, se organizan en dominios estructurales en que cada

módulo, de aproximadamente 1000 aminoácidos, cataliza la incorporación de un aminoácido al producto peptídico; estos módulos pueden subdividirse en 3 dominios: adenilación (A), tiolación (T) y condensación (C) (Moyne *et al.*, 2004).

B. subtilis produce una variedad de pequeños lipopéptidos antibióticos (<2000 Da) llamados, surfactinas, iturinas, fengisinas (Tosato *et al.*, 1997; Lang, 2002; Bonmatin *et al.*, 2003) y plioplastinas (Tsuge *et al.*, 1996). Se caracterizan por ser anfifílicos y poseer un heptapéptido cíclico de siete (surfactina e iturinas) ó 10 aminoácidos (fengisinas), que se une a una larga cadena alquil- hidrófoba (Lang, 2002).

En base a sus propiedades biológicas y fisicoquímicas, los lipopéptidos se han clasificado en tres grupos: surfactinas, liquenisinas e Iturinas. Las primeras se caracterizan por ser poderosos biosurfactantes bacterianos (Arima *et al.*, 1968; Yakimov *et al.*, 1995) mientras que, las iturinas se destacan por la eficacia contra una amplia variedad de patógenos clínicamente importantes, como levaduras y hongos (Bonmatin *et al.*, 2003). Investigaciones posteriores han revelado actividades biológicas adicionales de estas moléculas, que las califican para su potencial uso en la agricultura e industria farmacéutica; se ha demostrado que las iturinas pueden ser compuestos muy activos contra la mayoría de los hongos fitopatógenos (Phae *et al.*, 1990) mientras que las surfactinas poseen una eficiente actividad anti-micoplasma y antiviral y puede actuar como agente antitumoral e inhibir enzimas (Vollenbroich *et al.*, 1997). En la actualidad, los lipopéptidos son utilizados como biopesticidas para la protección de plantas, minimizando el uso de los fungicidas (McKeen *et al.*, 1986; Ron y Rosenberg, 2001; Vater *et al.*, 2002; Touré *et al.*, 2004).

Estudios estructurales, mostraron que estos tres grandes grupos, relacionados químicamente, sobre todo surfactinas y liquenisinas son prácticamente indistinguibles. La similitud más obvia es su estructura cíclica (mostrada en la Figura 2 que consiste en un heptapéptido cerrado por un β - aminoácido para el caso de iturinas y un β -hidroxiácido graso para surfactinas y liquenisinas. Todos estos poseen una cola hidrófoba con una configuración R absoluta en C β (Bomantin *et al.*, 2003), formando un anillo de lactam en iturinas (Peypoux *et al.*, 1978) y un anillo de lactona en surfactinas y liquenisinas (Kakinuma *et al.*, 1969)

- **Iturina, actividad antifúngica y mecanismo de acción.**

Iturina A, es el miembro más conocido de la familia de las iturinas. Fue aislado de una cepa de *B. subtilis* obtenida del suelo de Ituri (Zaire) durante el año 1957 (Delcambe, 1957 citado, por Bomantin *et al.*, 2003). Posteriormente, a partir de otras cepas de *B. subtilis* se aislaron otros lipopéptidos, a los que se les llamó iturina A_L, mycosubtilina, bacillomicina L, D, F y L_c (o bacillopeptina), los que coinciden en un patrón común de constitución química, adoptando el nombre genérico de “iturinas” (Peypoux *et al.*, 1978; Peypoux *et al.*, 1985). Estos lipopéptidos se caracterizan por ser neutros o monoaniónicos y tener: (i) la misma secuencia quiral constante LDDLLDL, con un número restringido de residuos: Asx, Glx, Pro, Ser, Thr, Tyr, (ii) una parte común del ciclo peptídico, β -aminoácido→L-Asx(1)→D-Tyr(2)→D-Asn(3) y (iii) un motivo variable que contiene cuatro residuos aminoacídicos (X4 a X7). La naturaleza de los residuos se resume en la Tabla.1, página 48. Las iturinas son una mezcla de isómeros de ácido iturinico, que contienen de 14 a 17 átomos de carbono en configuración n, iso, y

anteiso. La estructura primaria representativa de iturin A se muestra en el Figura 2. (Isogai *et al.*, 1982)

Las iturinas, tienen una acción destacada como antifúngico contra una variedad de levaduras y hongos, mientras que su actividad antibacteriana se restringe a *Micrococcus luteus* (Besson *et al.*, 1979). El mecanismo mediante el cual provoca la muerte de las células blanco, está relacionado con la capacidad de iturina de interactuar en forma directa, sobre los lípidos de la membrana celular. Parámetros importantes que parecen determinar la acción de iturina sobre la membrana celular, incluyen la composición de esteroles y/o de fosfolípidos de esta, la concentración de iturina y su capacidad de autoasociación.

Experiencias en bicapas lipídicas demuestran que, a concentraciones muy baja de Iturinas A, induce la formación de poros voltaje-independiente, que se caracterizan por ser anión selectivo y de tamaños variables. Esto apoya la idea de un modelo en que las moléculas de iturina, primero penetran la capa lipídica y después de una difusión lateral, se autoasocia y/o se asocian con lípidos formando estructuras conductantes (poros) a través de la membrana.

Respecto a la relación que existe entre la composición de la membrana y el mecanismo de acción, se ha establecido que si el colesterol está presente en la bicapa los poros tienden a permanecer abiertos por más tiempo (Maget Dana *et al.*, 1985), de hecho, en experimentos posteriores realizados en monocapas, se observó que iturina A interactúa fuertemente con el colesterol de la membrana, formando un complejo estequiométrico mixto Iturina/fosfolípido/ esteroles (Maget Dana *et al.*, 1994). Estudios adicionales

realizados por Latoud *et al.*, (1990), han confirmado que la susceptibilidad de las células blanco, aumenta en aquellas que contienen colesterol y otros esteroides con cadenas de C27. Volpon y colaboradores en 1999, determinaron que el grupo hidroxifenólico del residuo tirosil del lipopéptido estaría involucrado en la creación de este complejo mixto, formando un puente de hidrógeno con el esteroide de la membrana.

Respecto a la concentración de iturina, experimentos realizados a *Saccharomyces cerevisiae* muestran, que la concentración de esta y los cambios fisiológicos que provoca en la membrana celular de la levadura, pueden contribuir a la acción letal, ya que concomitante a la rápida salida de iones, iturina daña substancialmente los fosfolípidos, probablemente induciendo la activación de fosfolipasas que se encuentran asociadas a la membrana (Latoud *et al.*, 1988). El tratamiento de *S. cerevisiae* y *Candida albicans* con Iturina A, provoca la alteración de la morfología celular. Las membranas plasmáticas de estas levaduras se caracterizaron por la aparición de pequeñas vesículas, ocasionadas por la rápida salida de electrolitos intracelulares y componentes de alta masa molecular y por la presencia de agregados de partículas intramembranas. La alteración que causa Iturina, no solo afecta a la membrana plasmática si no que también a la membrana nuclear, la que se fragmenta adoptando una forma circular y a las membranas de las organelas citoplasmáticas (Thimon *et al.*, 1995).

Por otra parte, la hemólisis de los eritrocitos humanos causada por Iturina A, ocurren de manera dosis dependiente y bajo la concentración micelar crítica (CMC). Respecto al mecanismo mediante el cual provoca la lisis de estas células, ha sido informado que

Iturina forma un poro de diámetro medio de 32 Å en la membrana, que induce la salida de iones de K^{+1} (Aranda *et al.*, 2005).

Respecto a la capacidad de autoasociación, Harnois *et al.*, (1988) señalan que el daño causado por las iturinas se relaciona al hecho que todos los lipopéptidos prolonga su estado de autoasociación después de su inserción en el bicapa, prolongando su efecto. La propiedad de autoasociación a sido evaluada mediante la capacidad de iturina de encapsular una sonda fluorescente carboxifluoresceína (CF), para esto se trabajó a diferentes concentraciones por encima de su CMC (40 μ M). A concentraciones justo por encima de la CMC, 0.1 mM, la eficiencia de encapsulación es muy baja, compatible con un estado micelar. Sin embargo, a concentraciones muy superiores a la CMC, 0,7 y 1,4 mM, la eficacia de encapsulación de CF aumenta considerablemente, indicando la adopción de otro tipo de estado de agregación. Mediante microscopía electrónica por tinción negativa se demostró la presencia de vesículas cerradas con un tamaño medio de 150 nm. Estos experimentos sugieren que la iturina incorporada en una membrana biológica a concentraciones superiores a la CMC, mostrará una fuerte tendencia a agregarse, lo que podría explicar los intensos efectos biológicos de este lipopéptido (Grau *et al.*, 2001).

- **Relación estructura-actividad**

El residuo D-tirosil resulta esencial para la actividad funcional de iturina, mientras que la incidencia de otros residuos, como Ser y/o Thr es de menor importancia (Besson *et al.*, 1979; Volpon *et al.*, 1999). En la estructura en 3D de iturina (Bonmatin *et al.*, 1994), se

observa que el residuo tirosil se encuentra en la superficie de la molécula y si bien no está envuelto en ninguna interacción intramolecular, puede involucrarse en la interacción específica con otras moléculas, formando un puente de hidrógeno a través de su grupo OH de los esteroides (Volpon *et al.*, 1999). Considerando que las interacciones quedan anuladas al metilar el residuo tirosil, los derivados O-metil Tyr exhiben una disminución drástica de sus propiedades biológicas (Besson *et al.*, 1979; Volpon *et al.*, 1999). Experimentos en monocapa suponen la ausencia de un complejo con colesterol o ergosterol para el caso de los derivados O-metilTyr de iturina A (Maget-Dana *et al.* 1989). Sin embargo, aun cuando la metilación suprime la actividad biológica de la molécula impidiendo la interacción con el esteroide, el derivado no pierde su capacidad de interactuar con los fosfolípidos y formar micelas (Grau *et al.*, 2001). Bajo éstas condiciones, la simple sustitución de Tyr/Tyr O-CH₃ no puede, explicar la disminución drástica de la actividad biológica (Harnois *et al.*, 1989, citado por Bonmatin *et al.*, 2003).

La especificidad biológica también debe considerar otros parámetros como, el cambio de L-Asp1/L-Asn1 en el ciclo de iturina A (Besson, *et al.*, 1979) Aunque, estas variaciones locales, se consideran menores, probablemente se ve alterada la conformación de la cadena lateral, afectando las interacciones de la molécula con el ambiente y en la interface de la membrana. La secuencia conservada L-Asx (1)-D-Tyr (2)-D-Asn (3) al parecer juega un papel importante en el proceso de micelación, interactuando con los lípidos de la membrana y posiblemente con los iones alcalinos (Rautenbach *et al.*, 2000 citado, por Bonmanti, 2003).

Respecto a la importancia en la actividad biológica del ciclo peptídico, tomaremos como ejemplo lo que sucede con Iturina C y Bacilomicina L. La sustitución de L-Asn1 /L-Asp1 en iturina C crean una molécula totalmente inactiva. No así bacilomicina L que también tiene un residuo aspartil en posición 1 pero una secuencia totalmente diferente en las posiciones X4 - X7, manteniendo su actividad antifúngica y hemolítica (Quentin *et al.*, 1982), en este contexto, sólo una modificación conformacional permite explicar las diferentes propiedades de las moléculas. Esto indicaría que estos lipopéptidos eventualmente podrían ser tolerantes a los cambios de secuencia, con tal que estos no modifiquen el equilibrio de hidrofiliidad/hidrofobicidad.

Otro punto interesante es mycosubtilina, que difiere de iturina A únicamente en la inversión de la secuencia de los dos residuos adyacentes Ser6-Asn7 (ver Tabla1 en página 48). Aunque esta inversión, corresponde a una variación local menor, lleva a una estructura bastante diferente (Genest *et al.*, 1987). En este contexto, independiente de la notable similitud de la estructura primaria, el modo preciso de acción de mycosubtilina, es diferente al de iturina A debido las diferencias conformacionales. Una de las diferencias más notable entre iturina A y mycosubtilina es la mayor flexibilidad de los residuos adyacentes a D-Tyr2 de esta última (Genest *et al.*, 1987). Estos datos concuerdan con el hecho de que mycosubtilina no sólo interactúa más extensamente con el colesterol que iturina A, si no además, que la estequiometría del complejo lipopéptido-colesterol es 1:2 en lugar de 1:1 (Maget-Dana *et al.*, 1990).

El rol que juega el tamaño de la cadena acil en la actividad de iturina, se estudio comparando la actividad antifúngica de homólogos. Un aumento en la actividad se

observó al aumentar el número de carbonos, (Bomanti *et al.*, 2003). Si se asume que la actividad funcional de iturina es la consecuencia de una complejización con un estero, estos resultados, prueban que las cadenas C16, y C17 tienen una longitud favorable para la interacción óptima con la cadena lateral del ergosterol.

Podría concluirse que las diferentes actividades biológicas de iturinas, sobre todo su propiedad antifúngica, depende de la cola lipídica y el anillo peptídico, Este último juega un rol importante por el residuo D-Tyr, que interactúa con las células blanco, a través de su grupo hidroxil libre. Es por eso que cada modificación en el ciclo peptídico, resultada en la disminución significativa de la actividad antifúngica.

- **Surfactinas y Liquenisininas**

Durante el año 1968, Arima y colaboradores aislaron a partir de una cepa de *B. subtilis* otro lipopéptido (1050 Da), que denominaron surfactina debido a su alto poder surfactante. Por otro lado, liquenisina, aislada a partir de *B. licheniformis* sólo difiere de surfactina por la presencia de L-Gln en lugar de Glu en posición 1 de la secuencia peptídica (Yakimov *et al.*, 1995). Estos dos Lipopéptidos están constituidos por un heptapéptido, con una secuencia quiral LLDLLDL cerrada por un β -hidroxi ácido graso, contienen entre 13 a 15 átomos de carbono en configuración n, iso y anteiso. Los residuos aminoacídicos hidrófobos, se localizan en las posiciones 2, 3 ,4 ,6 y 7, mientras un residuo aspartil se encuentra en la posición 5. Sus estructuras se muestran en el Figura 2 y 3 (páginas 46 y 47).

Las diferentes propiedades estructurales de los lipopéptidos se reflejan en diferentes actividades. La selectividad de acción de estas moléculas se debe principalmente, a la naturaleza de los aminoácidos que modulan la anfipaticidad de la molécula (Deleu *et al.*, 1999).

Estudios conformacionales de surfactina, demuestran como la estructura juega un rol importante en sus propiedades quelantes (Thimon *et al.*, 1993). Un estudio acucioso de estas, revelan la existencia de dos dominios; un dominio polar, constituido por las cadenas laterales del ácido Glu1 y Asp5 y un dominio hidrófobo, constituido por el residuo 4, la cola lipídica y los residuos 2 y 6. Los grupos carboxilos de los residuos Glu1 y Asp5, tienen cargas negativas que les permite forman puentes salinos con cationes divalentes (Vass, 2001), lo que explica la habilidad de surfactinas de unir y diferenciar cationes como Ca^{2+} y Mg^{2+} (Mulligan, 2005). El catión Ca^{2+} forma un complejo con surfactina en una proporción 1:1, creando un puente intramolecular entre los residuos ácidos (Osman *et al.*, 1998), esto estabiliza la estructura de surfactina permitiendo un aumento considerable en la actividad surfactante (Grau *et al.*, 1999).

Respecto al análisis estructural de liquenisininas, la estructura primaria de esta, se diferencia de surfactina en que la primera posee un residuo Gln en vez del residuo Glu en posición 1, lo que provoca un cambio en la conformación de la cadena lateral, aumentando la efectividad de quelación en desmedro de la selectividad por los cationes (Grangemard *et al.*, 2001). Así mismo, el cambio de Glu/Gln permite que el lipopéptido cíclico, adopte una posición más vertical favoreciendo las interacciones intermoleculares hidrófobas (Becher 1965 citado, por Mulligan, 2004). Ahora bien, el

cambio conformacional de la cadena lateral y el aumento del efecto hidrofóbico, contribuyen a la eficaz estabilización de los cationes, a la vez que estos promueven la formación de dímeros durante el proceso de micelización, donde la estequiometría del complejo liquenisina-cación es 2:1 en lugar de 1:1 como sucede con surfactina (Deleu *et al.*, 1999).

Dentro de la secuencia peptídica de surfactina, el residuo 2 se encuentra estrechamente relacionado en la interacción de los grupos carboxilos con los cationes. La sustitución de Leu por Ile, modifica el impedimento estérico del grupo carboxilo de la cadena lateral, permitiendo una mejor accesibilidad al catión Ca^{2+} , razón por la cual las constantes de asociación llegan a valores similares a los obtenidos por liquenisina. Así mismo, el residuo 4 también parece jugar un rol importante, la sustitución de L-Val4/L-Ile4, aumenta el ambiente hidrófobo de la cola lipídica mejorando la actividad surfactante, lo que trae como consecuencia la disminución de la CMC (Grangemard *et al.*, 1997).

Por último, el tamaño de la cadena acil de surfactina, está estrechamente relacionada a la actividad surfactante y a la actividad antiviral, es así que una cadena Acil de 14 carbonos favorece la actividad surfactante, mientras que una cadena de 15 átomos de carbono, aumenta la actividad antiviral (Bonmantin *et al.*, 2003).

Como se mencionara anteriormente surfactina es reconocido por ser un poderoso biosurfactante, y como tal disminuye la tensión superficial, actúa como un excelente detergente, emulsionante y forma *biofilms* (Ron *et al.* 2001). A concentraciones moderadas, forma dominios segregados dentro de la mono o bicapa lipídica, que puede

contribuir a la creación de poros ion-conductor, sin embargo a altas concentraciones prevalece el efecto detergente (Grau *et al.*, 1999; Deleu *et al.*, 1999). En general, los biosurfactantes son capaces de reforzar o disminuir la hidrofobicidad de la superficie bacteriana y por consiguiente, la adherencia microbiana a las superficies sólidas. Su efecto depende de la hidrofobicidad bacteriana inicial, así como el tipo de lipopéptido y su concentración. Podría esperarse que los lipopéptidos excretados por *subtilis* jueguen un papel importante en la adherencia de tal microorganismo a las frutas y plantas, aspecto que parece esencial en las propiedades antifúngicas de los lipopéptidos involucrados en el control biológico de enfermedades de plantas. (Ahimou *et al.*, 2000). La aplicación de estos en el medioambiente es promisorio debido a su baja toxicidad, y por ser biodegradables. (Ahimou *et al.*, 2000; Lang 2002).

Si bien surfactina es reconocido como un potente agente surfactante, ejerce otras actividades biológicas como, inhibir la formación de coágulos de fibrina (Arima *et al.*, 1968), actividades antitumorales (Kameda *et al.*, 1974), inhibición de la cAMP fosfodiesterasa (Hosono y Suzuki, 1983) y propiedades anti-VIH (Itokawa *et al.*, 1994). Posteriores estudios han determinado que surfactina solubiliza los glicosil-fosfatidilinositol, involucrados en la fijación de fosfatasa alcalina a la membrana, este efecto puede ser explicado por las propiedades quelantes de los grupos carboxilos de los residuos Glu y Asp (Bortolato *et al.*, 1997). Además, Surfactinas ha mostrado ejercer una variedad de actividades sobre los virus y Mycoplasmas, que puede tener potenciales aplicaciones en la industria farmacéutica (Itokawa *et al.*, 1994). Otras propiedades, como el efecto inhibitorio de acil-CoA: colesterol acyltransferasa, o el

efecto estimulante en la secreción de apolipoproteína E en células Hep G2, muestran la actividad hipocolesterolémica que ejerce ésta. (Kim *et al.*, 1998).

Por último, se ha descrito la producción simultánea de más de un lipopéptido con mecanismos de acción diferentes, por la misma cepa. Este efecto fue observado primeramente por Sandrin *et al.*, (1990) y Ohno *et al.*, (1995), los cuales informaron la coproducción de surfactina e Iturina A por una cepa de *Bacillus subtilis*. Estos concluyeron, que la acción individual de surfactina no inhibe el crecimiento de hongos, sin embargo refuerza significativamente la actividad antifúngica de Iturina A, observándose un sinergismo entre ambos compuestos (Touré *et al.*, 2004). El mecanismo que explica la acción de estas sustancias hace referencia a la actividad lítica de surfactina, la cual debilita la membrana celular, facilitando el ataque de Iturina A. (Sandrin *et al.*, 1990; Hiraoka *et al.*, 1992; Ohno *et al.*, 1995). A su vez, Feigner *et al.*, (1995), señalan que todas las cepas productoras de Iturinas coproducen surfactinas. Más recientemente, Tsuge *et al.*, (1996), informaron la existencia de cepas coproductoras de surfactinas y piplastatina B1.

2.4.4 Producción de lipopéptidos

La producción de una gran cantidad de lipopéptidos es dependiente de la composición de los medios de cultivos (Kluger *et al.*, 1989; Ullrich *et al.*, 1991; Peypoux *et al.* 1991; Besson y Michel 1992; Yakimov *et al.*, 1995; Gu *et al.*, 2004). Al respecto, las fuentes de carbono usadas para la producción de biosurfactantes pueden ser divididas en tres categorías: hidratos de carbonos hidrocarburos y aceites vegetales, las cuales dependiendo el microorganismo productor podrán ser utilizadas en forma individual o

combinada (Mulligan *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1997). Entre los hidratos de carbonos probados para el cultivo de *Bacillus subtilis*, se ha observado que la glucosa y la sacarosa producen el rendimiento más alto de surfactantes (Kim *et al.*, 1997), por otra parte, Sandrin *et al.*, (1990) evaluaron las condiciones de co-producción de surfactina e iturina A llegando a la conclusión, que tanto la glucosa como la fructosa eran sustrato eficaces para la producción de ambos lipopéptidos, mientras que la sacarosa resulto eficaz sólo para la producción de surfactina, del mismo modo, se ha podido observar que la glucosa es la fuente de carbono más eficaz para la producción y co-producción de bacillomycina L, plipastatina, y surfactina, (Roongsawang *et al.*, 2002) lo que sugiere un sistema de regulación común en la expresión del gen de biosurfactantes. Al respecto, recientemente se demostró que la glucosa y la fructosa pueden estimular la activación de la secuencia *tata comA* que se encuentra río arriba de la región promotora *srfA*, aumentando el nivel de expresión del gen surfactin sintetasa, *srfA*, (Nakano y Zuber, 1989; Kim *et al.*, 2001).

Así mismo, se ha podido determinar que el modelo de los β -aminoácidos en iturinas o β -hidroxiácidos grasos en surfactinas y liquenisinas no sólo depende de la cepa involucrada, si no también de los nutrientes del medio de cultivo. Particularmente, la adición de un suplemento de aminoácidos como, valina o isoleucina, llevan a variaciones, en relación a la estructura del aminoácido (Besson *et al.*, 1992; Grangemard *et al.*, 1997).

Por otra parte, se ha observado que la adición de sales al medio de cultivo modula la concentración de biomasa y la producción de surfactina, un ejemplo claro es lo que

ocurre al adicionar 0,01 mM de Mn^{2+} al medio de cultivo; aumenta la concentración de biomasa y la producción de Surfactina de $0,33 \text{ g L}^{-1}$ a $2,6 \text{ g L}^{-1}$ (Wei y I-Ming Chu, 2002). Del mismo modo, Yan *et al.*, (2003), agregan que el $FeCl_3$ tiene efectos significativos sobre la producción de antimicrobianos. Ellos observaron que a medida que aumentaba la concentración de $FeCl_3$ en el medio de cultivo, había un aumento considerable en los diámetros de los halos de inhibición. Finalmente, según Bernal *et al.*, 2002, la adición de 0,5 % de Ca^{+2} al medio de cultivo, aumenta significativamente la concentración de antibióticos en el medio extracelular del cultivo de *Bacillus*. Estos explican que el aumento en la concentración del antibiótico en el medio extracelular puede deberse a un aumento en la permeabilidad de la pared celular del *Bacillus* inducida por el calcio, lo que está de acuerdo con lo señalado por Petit-Glatron *et al.*, (1993).

Respecto a las condiciones ambientales para la adecuada producción de lipopéptidos, se ha informado una clara dependencia entre la temperatura y la co-producción de Iturina A y surfactina, la temperatura óptima para la producción de Iturina A es $25^{\circ}C$ mientras que para surfactina es $37^{\circ}C$ (Ohno *et al.*, 1995).

Por otro parte, Stein (2005) señala que si bien la esporulación de las bacterias no es un fenómeno obligado para la biosíntesis de antibióticos, se han reportado algunos casos en que la síntesis de éstos está regulada por factores compartidos con los procesos de esporulación. En este aspecto otros autores (Katz y Demain, 1977; Errington, 2003), agregan que tanto la síntesis de antibióticos como la esporulación de las células son procesos controlados por represión catabólica. (Errington, 2003; Stein, 2005).

El mecanismo exacto mediante el cual surfactina actúa como agente microbiano no está dilucidado completamente, dado los antecedentes que existen se cree que podría estar relacionado a la habilidad de dañar las membranas biológicas (Peypoux *et al.*, 1999) o alterar las propiedades químicas y físicas del *biofilms* de otros microorganismos (Neu, 1996). Por otra parte, estudios recientes señalan la existencia de una correlación entre la producción de antibióticos y la formación del *biofilms*, en este aspecto, se ha observado que la colonización de plantas por *B. subtilis* está asociada a la producción de surfactina y esta a la formación de un *biofilms*. (Bais *et al.*, 2004; Hofemeister *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2003)

Respecto a los *biofilms*, estos son comunidades bacterianas incluidas en una matriz de exopolisacáridos producida por las bacterias y adheridas a una superficie viva o inerte. La densidad bacteriana alcanzada puede llegar hasta las 10^{12} CFU/cm³ (Savage y Fletcher 1885 citado, por Yan *et al.*, 2003).

Dependiendo de ciertos parámetros ambientales como, disminución o aumento de la disponibilidad de nutrientes y de hierro, el pH, la tensión de oxígeno y la temperatura, una misma bacteria puede crecer adherida a una superficie o en forma planctónica nadando libremente en el medio líquido, existiendo grandes diferencias en el metabolismo bacteriano de las células que conforman un *biofilms*, lo que explicaría el efecto de este en la producción de metabolitos secundarios. (Davies *et al.*, 1993).

En la naturaleza, la formación de un *biofilms*, constituyen un modo de crecimiento protegido que permite la supervivencia de las bacterias en un medio hostil (Ophir *et al.*, 1994; O'Toole *et al.*, 1998; Lapping y Costerton, 1995 citado, por Yan *et al.*, 2003).

Estudios realizados utilizando microscopia confocal han mostrado que la arquitectura de la matriz del *biofilm* no es sólida y presenta canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno incluso hasta las zonas más profundas de ésta. Sin embargo, la existencia de estos canales no evita, que dentro de esta matriz se puedan encontrar ambientes distintos en los que la concentración de nutrientes, pH u oxígeno es diferente. El *biofilm* estructuralmente está constituido por tres componentes: la masa de células la cual puede estar formada por una sola especie o por múltiples especies microbiológicas, los espacios intercelulares o canales (2) y la matriz extracelular que lo rodea, la cual tiene una composición variable, en función del sistema en estudio. En general, el componente mayoritario es el agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total, además de agua y de las células bacterianas, la matriz del *biofilm* es un complejo formado principalmente por exopolisacáridos secretados por las propias células que forman parte del mismo. En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, DNA y productos diversos procedentes de lisis de las bacterias. El componente mejor estudiado es el exopolisacarido, que posiblemente juegue varios papeles en la estructura y función del *biofilm* (Sutherland, 1985). Entre los beneficios atribuidos a estos, se destaca el hecho de que actúan como protectores de una gran variedad de condiciones de estrés ambiental como rayos ultravioleta, cambios de pH, shock osmótico y desecación.

Por otra parte, los mecanismos a través de los cuales las bacterias son transportadas hacia una superficie incluyen contacto al azar con el substrato debido al movimiento Browniano, sedimentación por diferencias en gravedad específica entre las bacterias y el medio en el que se encuentra, transporte hacia la superficie por el movimiento del

medio y transporte activo mediado por actividad flagelar que puede incluir o no quimiotaxis (Van Loosdrecht *et al.*, 1990).

2.4.5 Purificación de lipopéptidos

La recuperación y purificación parcial de los lipopéptidos del caldo de cultivo, es el mayor problema al que se enfrenta la comercialización de estos. Los métodos comúnmente utilizados, involucran la precipitación a pH extremos (Baugart *et al.*, 1991) y extracción con solventes orgánicos (Arima *et al.*, 1968), lo que normalmente conlleva la liberación de otros subcomponentes considerados impurezas o a la formación de intermediarios inactivos (Peypoux *et al.*, 1978; Deutscher, 1990).

En la búsqueda por desarrollar un método más económico y menos dañino, se encontró que los lipopéptidos pueden ser purificados parcialmente mediante el sistema de ultrafiltración y diafiltración escalonada. Estos métodos tienen un rendimiento aceptable y, comparados con otros procesos de purificación convencionales, presentan la ventaja de poder separar eficazmente los lipopéptidos de otras macromoléculas, a la vez que minimizan la pérdida de éstos por adherencia a las membranas (Lin Sung-Chyr y JIang Horng-Jyh, 1997). Además, el efecto de denaturación es menor comparado con los métodos de precipitación (Deutscher, 1990). El empleo de este sistema en la purificación de lipopéptidos ha sido informada por varios autores entre los que podemos mencionar a, Lin and Jiang 1997; Mulligan y Gibbs, 1990.

Al respecto, Lin Sung- Chyr y Jiang Horno-Jyh (1997), aclaran un punto importante, señalando que las surfactinas a concentraciones mayores a su CMC (concentración

crítica micelar), tienden a asociarse formando micelas, dejando un número pequeño de moléculas libres. Esto acarrea ciertos problemas ya que, mientras las moléculas de surfactina no asociadas son filtradas fácilmente constituyendo el permeado, las micelas de surfactina quedan retenidas comportándose como macromoléculas, con un peso molecular de 30.000 a 50.000 daltons.

2.5 Mecanismo de Inducción

La inducción de la producción de metabolitos con actividad biológica ha sido observada por varios autores, entre ellos; Sip *et al.*, (1998) quienes registran un aumento en la producción de diversina (bacteriocina) producto de la introducción de *Carnobacterium piscicola* al medio de cultivo donde crece *Carnobacterium divergens*, Así mismo, Sadfi *et al.*, (2002), aislaron y purificaron parcialmente a partir de una cepa de *Bacillus*, unos metabolitos con actividad inhibitoria sobre los micelios de *F. roseum var. sambucinum*, fitopatógeno de los túberos de papa. Estos metabolitos fueron producidos en dos modalidades; cultivando la cepa antagonista en un medio sólido en presencia del hongo y en un cultivo líquido sólo con la cepa antagonista. En estos estudios se observó que el extracto crudo obtenido del medio sólido tiene mayor efectividad antagonista que el obtenido a partir del cultivo individual de *Bacillus* en un medio líquido. Los resultados sugirieron que la producción de la sustancia inhibitoria es inducida por la presencia del hongo y es dependiente de las características del medio y de las condiciones de cultivo. Ellos agregan que la aparente inhabilidad de producir inhibidores en el medio de cultivo líquido puede ser probablemente una consecuencia de una inactivación de la sustancia

antagonista por las condiciones de cultivo o la adsorción de estos metabolitos a las células de *Bacillus*, cepa productora de estos.

2.6 Producción de una alta cantidad de biomasa

Los componentes empleados en la industria de fermentación son generalmente complejos, siendo importante considerar diferentes aspectos como el costo de los mismos, la disponibilidad, la estabilidad en su composición química, el tipo de fermentación, rendimiento del producto final y los costos adicionales de otros compuestos nutritivos requeridos por los microorganismos. Respecto al costo de los nutrientes, estos pueden llegar a representar entre el 10 y el 60 % del costo total de muchos productos obtenidos mediante procesos de fermentación, por lo que se hace prioritaria la incorporación de constituyentes baratos (Dale y Linden 1984 citado, por Rehm *et al.*, 1993)

Las principales materias primas utilizadas en los procesos de fermentación son los carbohidratos, los que usualmente constituyen la fuente de energía y la base para la síntesis de macromoléculas de muchos microorganismos. Dentro de las fuentes de carbono encontramos a los azúcares puros como, la glucosa y la sucrosa, sin embargo, estos son demasiado costosos para ser usados industrialmente, por lo que usualmente es necesario encontrar otras fuentes más baratas (Rivière, 1977 citado por Rehm *et al.*, 1993) Al respecto, las materias primas que se utilizan con mayor frecuencia en la formulación de medios a nivel industria son, los granos, melaza, celulosa y suero de queso, entre otras. (Ortega, 1998; Shuler, M. y Kargi, F. 2002). La melaza tiene un alto valor nutritivo, aportando un 50,46% de azúcares fermentables y un 53,83% de

azúcares reductores, dentro de los cuales encontramos la glucosa, rafinosa y sacarosa, siendo esta última la que se encuentra en mayor concentración (~45%). La melaza, además de ser una buena fuente de carbono de fácil asimilación para el microorganismo, es un alimento rico en vitaminas del grupo B, contiene aminoácidos esenciales y minerales como calcio, sodio, cloro, magnesio, potasio, hierro y cobre. (Bronn, 1985 citado por Rehm *et al.*, 1993).

2.7 Hipótesis y objetivos

En base a estos antecedentes, se postuló la siguiente hipótesis:

“Si se determina la cinética de crecimiento y producción del efecto antagonista sobre *Erwinia*, para luego formular y producir cantidades de un biocida contra *Erwinia carotovora*, se podrá resguardar las cosechas de Cala (*Zantedeschia* spp.) y mejorar su rentabilidad”.

➤ **Objetivos generales:**

Formular un preparado biocida de alta actividad y persistencia del efecto antagonista sobre *Erwinia carotovora*, para controlar los cultivos de cala (*Zantedeschia* spp).

Purificar y/o caracterizar parcialmente la sustancia con actividad antagonista producida por la cepa BC10.

➤ **Objetivos específicos:**

- a) Determinar las cinéticas de crecimiento y del efecto antagonista de la cepas BC10 sobre *Erwinia carotovora*.
- b) Producir cantidades del antagonista para *Erwinia carotovora*, en medios de cultivo de bajo costo, para formular un biocida de aplicación directa en plantaciones de cala.
- c) Determinar la persistencia de la capacidad antagonista del preparado en el tiempo.
- d) Determinar si el antagonista obtenido es un producto extra o intra celular para luego purificar y/o caracterizar parcialmente el componente activo que produce la inhibición.

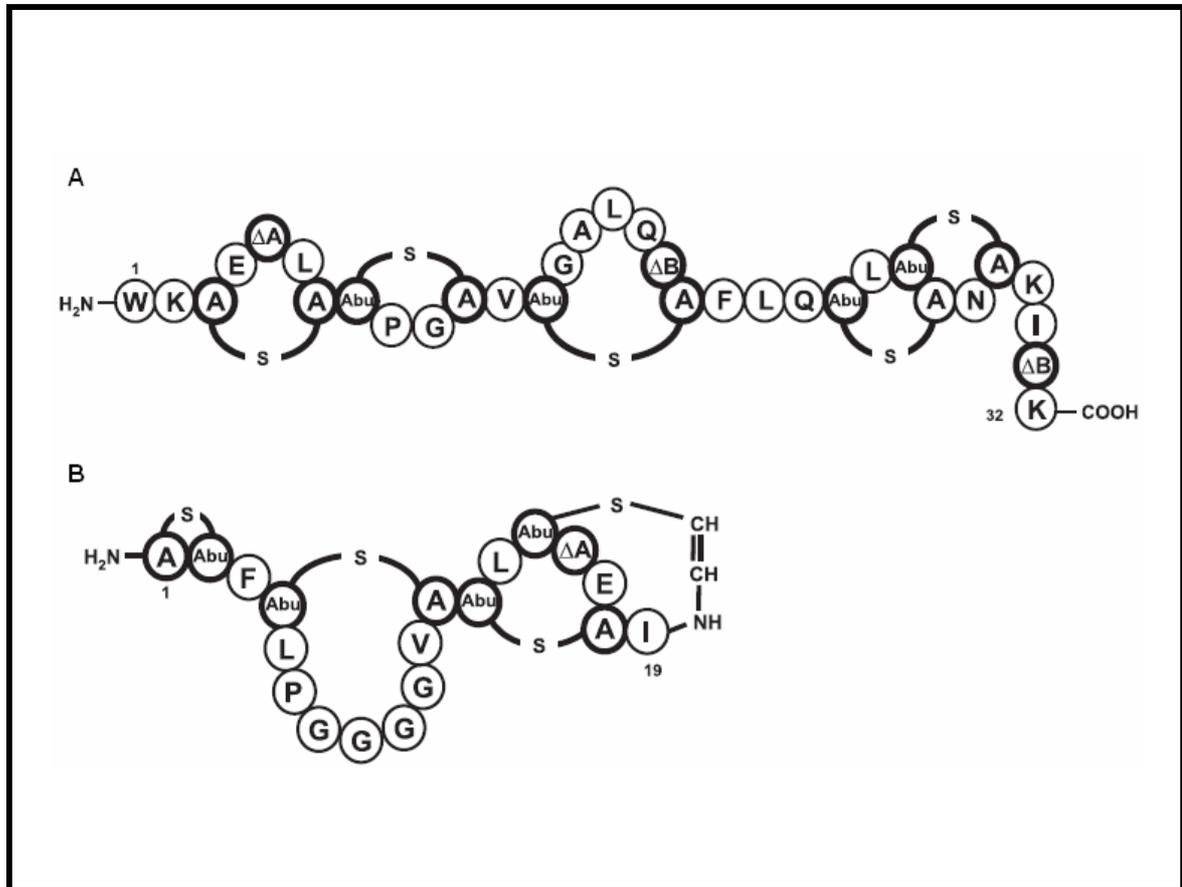


Figura 1. Lantibióticos producidos por *Bacillus subtilis*. Estructura esquemática de los péptidos maduros A) subtilina B) Mersacidina. A-S-A, meso-lantionina; Abu-S- A, 3-metilantionina; ΔA, 2,3-didehidroalanina; ΔB, 2,3-didehidrobutirina.

Adaptado de Stein et al., 2005

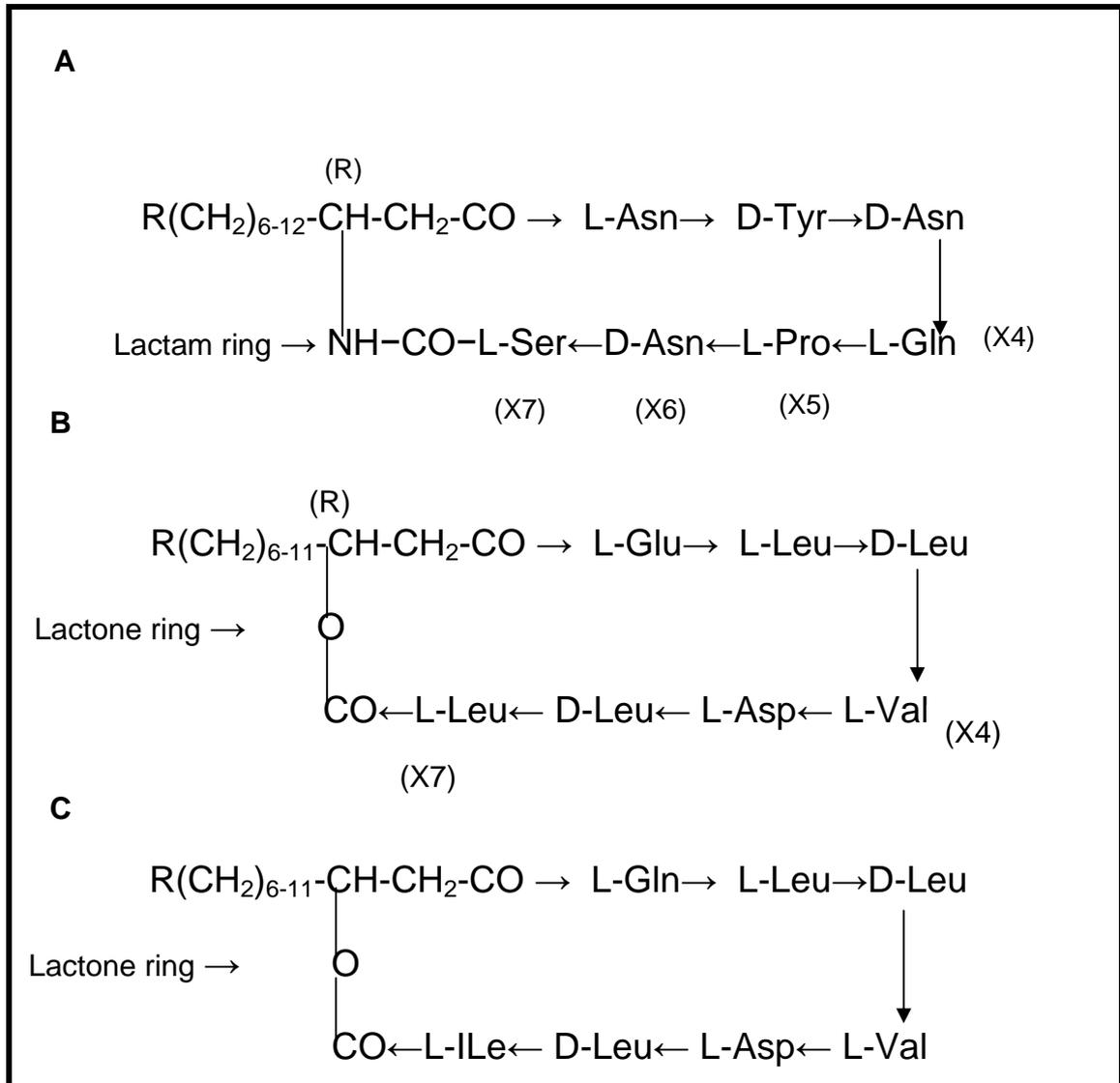


Figura 2. Estructura primaria de los lipopéptidos.A) Iturina A: R es un CH_3 , $\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)$ ó $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)$ con $n\text{C}_{14}$, isoC_{15} , anteisoC_{15} β -aminoácido
 B) Surfactina C) Liquenisina: R es un CH_3 , $\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)$ ó $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)$ con isoC_{13} , anteisoC_{13} , $n\text{C}_{14}$, isoC_{15} ó anteisoC_{15} β -hidroxi ácidos grasos.
Adaptado de Bonmantin et al., 2003

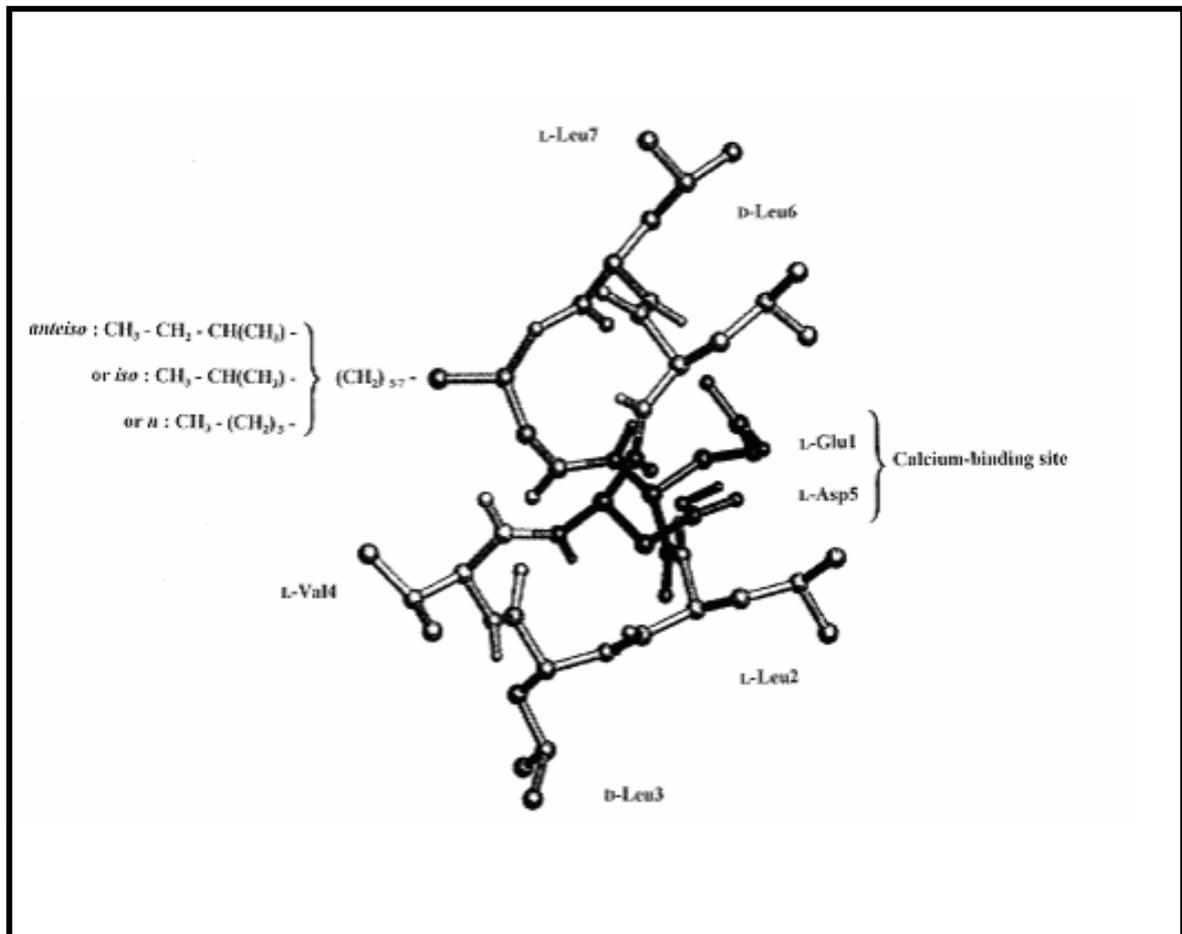


Figura 3. Estructura protonada de surfactina; Se observa un parte de mayor polaridad que corresponde a la cadena lipídica y otra de menor polaridad con los residuos Glu 1 y Asp5, que constituyen el sitio de unión con calcio

Adaptado de Grangemard *et al.*, 1997

Tabla 1 Variantes de la familia de Iturinas, surfactina y liquenisinas

Nombre o nomenclatura del lipopéptido cíclico	Péptido						
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7
Iturina A	Asn	D-Tyr	D-Asn	Gln	Pro	D-Asn	Ser
Ituina C	Asp	D-Tyr	D-Asn	Gln	Pro	D-Asn	Ser
Iturina AL	Asn	D-Tyr	D-Asn	Gln	Pro	D-Asn	Ser
Micosubtilina	Asn	D-Tyr	D-Asn	Gln	Pro	D-Ser	Asn
Bacilomicina F	Asn	D-Tyr	D-Asn	Gln	Pro	D-Asn	Thr
Bacilomicina L	Asn	D-Tyr	D-Asn	Ser	Gln	D-Ser	Thr
Bacilomicina D	Asn	D-Tyr	D-Asn	Pro	Glu	D-Ser	Thr
Bacilomicina LC	Asn	Leu	D-Asn	Ser	Glu	D-Ser	Thr
Surfactina	Glu	Leu	D-Leu	Val	Asp	D-Leu	Leu
Orn2 Surfactina	Glu	Leu	D-Leu	Val	Asp	D-Leu	Ile
Ala4 Surfactina	Glu	Leu	D-Leu	Ala	Asp	D-Leu	Leu
Leu4 Surfactina	Glu	Leu	D-Leu	Leu	Asp	D-Leu	Leu
Ile5 Surfactina	Glu	Leu	D-Leu	Ile	Asp	D-Leu	Leu
Val7 Surfactina	Glu	Leu	D-Leu	Val	Asp	D-Leu	Val
Ile7 Surfactina	Glu	Leu	D-Leu	Val	Asp	D-Leu	Ile
Cys7 Surfactina	Glu	Leu	D-Leu	Val	Asp	D-Leu	Cys
Orn7 Surfactina	Glu	Leu	D-Leu	Val	Asp	D-Leu	Orn
Phe7 Surfactina	Glu	Leu	D-Leu	Val	Asp	D-Leu	Phe
Ile2,4Surfactina	Glu	Ile	D-Leu	Ile	Asp	D-Leu	Leu
Val2,7 Surfactina	Glu	Val	D-Leu	Val	Asp	D-Leu	Val
Val2, Ile7 Surfactina	Glu	Val	D-Leu	Val	Asp	D-Leu	Ile
Ile2, Val7 Surfactina	Glu	Ile	D-Leu	Val	Asp	D-Leu	Val
Ile2,4,7 Surfactina	Glu	Ile	D-Leu	Ile	Asp	D-Leu	Ile
Liquenisina	Gln	Leu	D-Leu	Val	Asp	D-Leu	Ile
Ile4liquenisina	Gln	Leu	D-Leu	Ile	Asp	D-Leu	Ile
Val7liquenisina	Gln	Leu	D-Leu	Val	Asp	D-Leu	Val
Ile2,4liquenisina	Gln	Ile	D-Leu	val	Asp	D-Leu	Ile

Adaptado de Bonmantin *et al.*, (2003).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

La presente investigación se llevó a cabo en los Laboratorios de Microbiología y Biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, ICYTAL, de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile, en el Campus Isla Teja en la ciudad de Valdivia, Xª Región.

3.1.1 Material biológico

En este estudio se utilizaron dos cepas bacterianas relacionadas, el fitopatógeno (*Erwinia carotovora* LC10) y su antagonista (BC10).

3.1.1.1 Cepa bacteriana

La cepa BC10, es productora de sustancias inhibitorias al desarrollo de *Erwinia carotovora*, microorganismo fitopatógeno de Cala.

La cepa BC10, fue aislada en el Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile, desde una muestra extraída del ambiente natural de los alrededores de Valdivia.

3.1.1.2 Organismo Patógeno

La cepa LC10 de *Erwinia carotovora*, había sido previamente aislada desde túberos de cala en descomposición, y fue proporcionada por el Laboratorio de Fitopatología para realizar el presente estudio.

3.1.2 Reactivos

- NaOH y HCl (Merck)
- Agar Papa Dextrosa (Merck)
- Caldo cerebro corazón (Merck)
- Extracto de levaduras, Gibco
- Sulfato de amonio, Merck
- CaCl_2 , Merck
- Solución de sales para cultivos bacterianos
- Suero de queso
- K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Merck
- Azúcar lansa como fuente de sacarosa
- Glucosa, Merck
- Manitol, Merck
- Melaza lansa proporcionada por la empresa Levaduras Collico
- Peptona de caseína, Gibco
- Agua desionizada
- Filtros y ultrafiltros Millipore :

- Centriplus® YM-3, YM-10
- Filtros de 0,22 Millex-GP
- Filtros de 0,45 Millex- HV
- Tabletas de Paladio BBL gas Pak Plus (Becton Dickinson Microbiology Systemis)
- API® 20 E y 50 CHB/E (Biomérieux, Hazelwood, MI, USA)

3.1.3. Equipos

- Shaker, agitador orbital termorregulado, marca Trilab
- Fermentador modular Gallenkamp, England, 1 L
- Fermentador Microferm, New Brunswick Sci, USA, 14 L
- Sonicador Ultrasonik, USA, modelo 20T/H.
- Centrifuga refrigerada Beckman, USA modelo J2-HS con rotor JA-20 (ángulo fijo).
- Spintrex™ de New Brunswick, NJ, USA
- Sistema de filtración estacionaria con vibrador Millipore USA, con membrana de 150 mm y 30 kD, Amicon
- Campana de flujo laminar
- Espectrofotómetro Genesys 5
- pHmetro, Hanna
- Bomba de vacío
- Balanza analítica
- Baño de agua
- Agujas y jeringas

- Material de uso común de laboratorio: baguetas, matraces, micropipetas, espátulas, etc.

3.2 Métodos

3.2.1 Caracterización de la cepa BC10

Para caracterizar la cepa se procedió a describir su morfología, tinción de Gram, pruebas bioquímicas y requerimientos de oxígeno.

La caracterización de la cepa se realizó a partir de colonias aisladas, obtenidas de siembras en estrías en placas de agar papa dextrosa, APD.

- La descripción y caracterización morfológica, se llevó a cabo mediante tinción de Gram, utilizando microscopía de campo claro y microscopía electrónica.
- Se realizaron algunas pruebas bioquímicas tales como: indol, citrato, hidrólisis de almidón, crecimiento a 32°C, crecimiento a 65°C, utilización de glucosa, Voges Proskauer, oxidasa, catalasa, crecimiento en cloruro de sodio al 7%, utilización de urea, hidrólisis de la yema de huevo y anaerobiosis.
- Para la anaerobiosis se utilizó un sistema anaeróbico con catálisis de Paladio BBL gas Pak Plus.
- Además la cepa BC10 se identificó con el API[®] 50 CHB/E combinado con el sistema API[®] 20 E.

3.2.2 Afinamiento de las pruebas de antagonismo *in vitro*.

Con la finalidad de afinar y obtener una mejor respuesta de la prueba de antagonismo (actividad antagonista), se procedió a realizarla sobre nueve medios diferentes, de manera tal de seleccionar aquel que revelara de mejor forma el efecto antagónico (nitidez del halo de inhibición). Los medios en agar probados fueron: tripticasa, Saboroud, peptona, nutritivo, papa dextrosa, plate count, MBCa⁺², MBM_a, MBG (ver Anexo 5).

Para la prueba de antagonismo de los extractos crudos, concentrados y superconcentrados celulares, se utilizó la técnica de la “gota sobre césped”, descrita por Barefood y Klaenhammer (1983). Los ensayos se realizaron por triplicado, primeramente se procedió a marcar tres puntos guías en cada placa para ubicar la gota, luego dependiendo el caso, se colocaron 10 µL del concentrado celular (caldo con células) ó 15 µL de extracto crudo (caldo sin células) en forma de gota, sobre placas de Petri que contenían agar papa dextrosa y un césped de *E. carotovora* fresco (cultivo de 12 h), seguidamente las placas fueron secadas por aprox. 30 min en la cámara de flujo laminar, y posteriormente incubadas en una estufa a 25±2°C por 72 horas, finalmente para los concentrados celulares se midió el radio externo, como lo muestra la representación esquemática en la Figura 4 A, y para el extracto crudo se midió el diámetro como se muestra en la Figura 4 B. En cada caso se obtuvo un promedio de estos.

Por último, con la finalidad de estudiar el efecto bacteriostático y /o bactericida de la sustancia antagonista sobre *Erwinia* en las dos áreas visualizadas en agar papa

dextrosa y agar manitol (efecto de doble halo), se tomaron asadas de estas dos zonas y se sembraron mediante estrías e incubaron durante 72 h.

3.2.3 Estudios preliminares para el crecimiento de la cepa BC10

La cepa antagonista deberá actuar en los suelos donde se cultiva la cala en forma intensiva, es por ello que como primera actividad se procedió a determinar el pH del suelo, para así dejar el pH como una variable fija (Anexo 2).

Con la finalidad de diseñar un medio de cultivo adecuado para el crecimiento y futura producción, se probaron distintos componentes de bajo costo, conforme a lo descrito en la Tabla 2. El estudio se llevó a cabo a nivel de matraces Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio de cultivo, con agitación (220 rpm) y a 32°C.

Tabla 2 Diseño preliminar de medios de cultivo¹⁾

Componentes	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
(NH ₄) ₂ SO ₄ , g/L	2		2		5	5	2	
Melaza, g/L	10	10	20	20	10	10		
Suero de queso, g/L							50	50
Extracto de levadura, g/L					1	1		
Sacarosa, g/L					2	2		
Solución de sales, mL/L					10	10		
CaCl ₂ , g/L						5		
¹⁾ Se usó como diluyente tampón fosfato, ajustado a pH 5,5 (Anexo 3)								

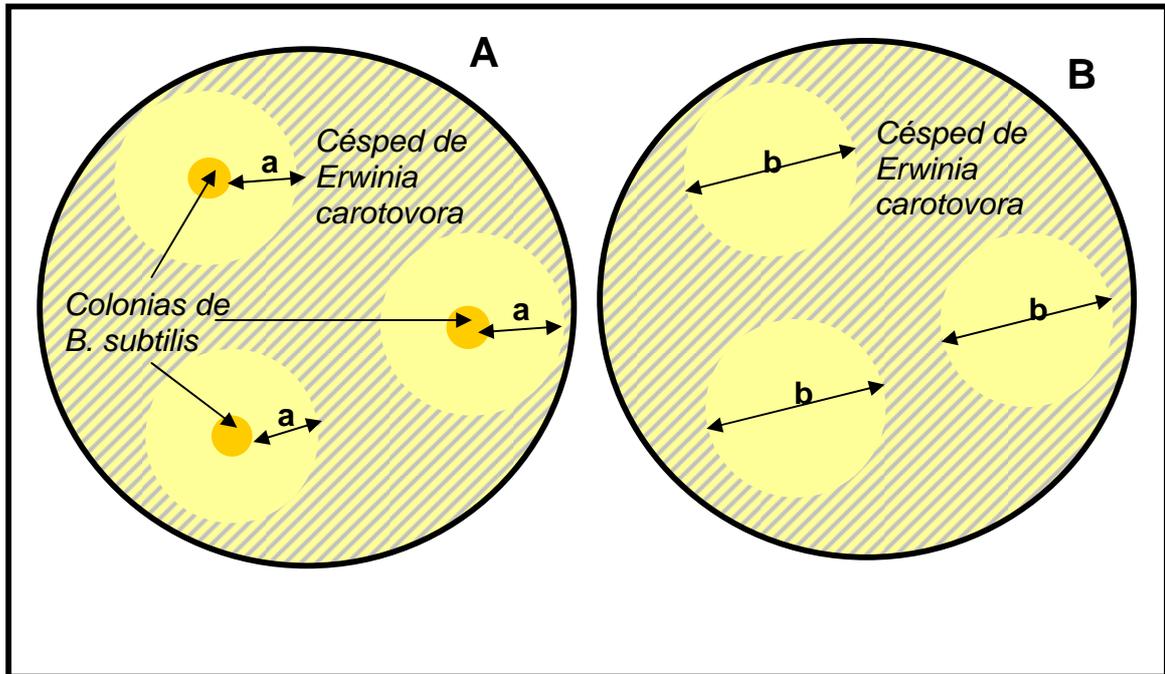


Figura 4. Diagramas del ensayo de antagonismo *in vitro* a *Erwinia carotovora*. A) con el concentrado celular y B) con el extracto crudo de la cepa BC10.

En los medios sólo se varió las concentraciones de las fuentes de carbono (y energía) y nitrógeno, en este caso: azúcares, sulfato de amonio y extracto de levaduras. Se adicionaron 5g/L de CaCl_2 , a algunos medios.

Los medios fueron inoculados con una asada extraída de un tubo de agar inclinado fresco (cultivo de 24 h) e incubados en agitador orbital durante 24 h. Se tomaron tres muestras de cada medio, al inicio, a las 12 h y al finalizar, determinando su absorbancia a 600 nm. Se guardaron alícuotas de estas muestras para realizar las pruebas de antagonismo *in Vitro*.

3.2.4 Determinación de la cinética bacteriana

Conforme a la etapa anterior, en aquellos medios de cultivos que se obtuvo mejor respuesta en el estudio preliminar, se confeccionaron los medios de cultivo descritos en la Tabla 3, con los que se realizaron los estudios de cinética de crecimiento y pruebas de antagonismo *in vitro* que aportarán información para el futuro escalamiento industrial y comercial. Con este fin, la cepa BC10 fue cultivada en matraces Erlenmeyer de litro, incubados a 220 rpm y a 32°C en los medios de cultivos (Tabla 3).

Para obtener la cinética de los diferentes medios de cultivo, se tomaron muestras cada 1h midiendo Abs_{600} , controlando al microscopio la pureza y realizando simultáneamente las pruebas de antagonismo *in vitro*.

Se obtuvo una curva de crecimiento de cada medio, graficando el logaritmo natural de Absorbancia a 600 nm vs tiempo (h). Se identificó la fase exponencial y a partir de ésta se calculó el tiempo de duplicación t_d y la velocidad específica de crecimiento μ .

Tabla 3 Composición de los medios de cultivos líquidos usados para la cepa**BC10** ¹⁾

Componentes ↓	Medio →	MBA	MBM	MCP	MCP-Ca ⁺²	MBS
Sacarosa, g		10,00	2,00	5,00		
Melaza, g			20,00			
Manitol, g				5,00	5,00	
Glucosa, g				5,00		
Peptona, g				0,50	0,50	
Peptona de caseína, g				1,00	1,00	
Suero de queso en polvo, g ²⁾						50,00
(NH ₄) ₂ SO ₄ , g/L		3,54	5,00			2,00
Extracto de levadura, g		0,50	1,00	0,20	0,20	
Solución de sales, mL		10,00		10,00	10,00	
CaCl ₂ , g ³⁾			5,00		5,00	

¹⁾ Se usó como diluyente tampón fosfato, ajustado a pH 5,5²⁾ El suero fue esterilizado y luego filtrado.³⁾ Medio probado con y sin calcio

3.2.5 Producción de la cepa BC10

Con la finalidad de realizar pruebas de campo y purificar la sustancia inhibitoria, es necesario acopiar cantidades del antagonista.

Para lo anterior, se realizaron 3 cultivos en diferentes modalidades, a saber: cultivos en batch de 1 y 14L y cultivo continuo de 1 L.

Las experiencias en fermentador requirieron de una etapa previa de propagación de la cepa a nivel de matraces.

3.2.5.1 Condiciones de cultivo en matraz agitado

La cepa BC10 se cultivó en el medio MBM (descrito anteriormente en la Tabla 3), en un agitador orbital termorregulado, a 220 rpm y 32°C. La cepa se obtuvo a partir de una colonia aislada proveniente de un agar inclinado inoculado 12 horas antes. Se tomó una asada y se inoculó un matraz de 100 mL, se dejó durante 12 horas en un agitador orbital a 32°C y 220 rpm y se inoculó al 10% al matraz de litro que contenía 250 mL de medio MBM. Se mantuvo durante 24 horas en agitador orbital a 32°C y 220 rpm.

La estimación de crecimiento bacteriano se obtuvo midiendo densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro.

Para efectuar las pruebas de actividad es necesario que la cepa patógena esté recientemente activada; es por ello que en cada oportunidad, la cepa de *E. carotovora* se obtuvo a partir de una colonia aislada de un tubo de agar inclinado, tomándose una asada de ésta e inoculándola al 10 %, bajo medidas de esterilidad, en un matraz de 100 mL con caldo cerebro corazón e incubándola durante 12 horas a 28°C en un agitador orbital a 250 rpm.

3.2.5.2 Condiciones de cultivo en batch

Con la finalidad de obtener cantidades mayores de cultivo y lograr altas concentraciones de biomasa, para poder efectuar experiencias en campo y continuar con las etapas de purificación de la sustancia antagonista, se llevó a cabo la producción de la cepa de *Bacillus*, en un sistema de cultivo por cargas o lotes (batch) en fermentador.

Estos cultivos se realizaron, como se señala en al Tabla 4, sin intercambio de materia con los alrededores, salvo lo referente a gases, utilizando dos fermentadores de distinta capacidad, agitados y aireados; los equipos contaban con controles automáticos de temperatura y pH. Por esta última razón el medio no se constituyó sobre la base de tampón fosfato sino agua destilada y/o agua de la llave, agregándosele KH_2PO_4 a razón de 1 g/L como fuentes de K y P.

3.2.5.3 Condiciones de cultivo continuo

Para obtener y acopiar cantidades de biomasa de distinta condición fisiológica, se diseñó una experiencia en cultivo continuo, con dos velocidades de dilución diferentes; una a 0,4 Dc y otra a 0,8 Dc, en el fermentador de 1 L, por tiempos de residencia de 3τ para lograr estados estacionarios en cada situación, lo que se comprobó midiendo DO 600nm.

Tabla 4 Condiciones del cultivo en batch

Tipo de fermentador	Gallenkamp	Microferm, NBSc.
Medio de cultivo	MBM	MBM ¹⁾
Temperatura, °C	32	30
Volumen de inóculo	60 mL	1,1 L
Volumen del medio	600 mL	10 L
Flujo de aire	600 mL/min	11 L/min
vvm	0,91	0,99
Agitación	250 rpm	250 rpm
pH 5,5 regulado con	NaOH 1N, HCl 1 N	NaOH 5 N, HCl 5 N
Antiespumante, mL	5	10
Tiempo de cultivo, h	12	48

¹⁾ Preparado con agua de la llave

3.2.6 Obtención de un superconcentrado celular de la cepa BC10.

Una vez que se alcanzó el crecimiento máximo de los cultivos en batch y cultivo continuo, se obtuvo el superconcentrado celular de la cepa BC10 mediante Spintrex™, tecnología de filtración tangencial, que contiene una membrana dispuesta en un dispositivo cilíndrico que rota. Este permite configurar el sistema en cuatro tipos de filtración; recirculación, diafiltración y batch, en este caso se utilizó en modalidad de recirculación (ver Figura 5, en página 65).

Para cada caso se filtró bajo las siguientes condiciones:

- Tamaño de poro de la membrana polisulfona : 0,45 μm
- Presión : 10 psi
- Agitación : 1500 rpm

3.2.7 Estabilidad del concentrado celular

A fin de determinar la estabilidad del concentrado celular, muestras de éste se almacenaron durante 8 meses a -20°C , 4°C , 25°C y temperatura ambiente; a los 45, 60, 120 y 240 días se les realizaron pruebas de antagonismo *in vitro*.

Las muestras que fueron guardadas a -20°C , se les agregó en diferentes proporciones dos tipos de crioprotectores: glicerol al 10% y 20% y leche en polvo al 20%; otra parte de las alícuotas, se almacenaron sin crioprotector a -20°C , 4°C , temperatura ambiente y 25°C .

3.2.8 Recuento celular

Con el propósito de conocer la relación entre la $\text{Abs}_{.600\text{nm}}$ y los recuentos celulares, se realizaron diluciones seriadas de las suspensiones bacterianas, sin embargo, no fue posible establecer tal relación debido a los sucesivos aumentos y disminución en el número de células viables. Por consiguiente, los recuentos celulares se realizaron mediante la utilización de la cámara de conteo (Neubauer). La primera parte de este ensayo consistió en diluir la suspensión bacteriana en una proporción conocida (1:10), a continuación, las células bacterianas fueron teñidas utilizando el colorante azul de

metileno, transcurridos aprox. 5 min. se tomaron 100 μ L de esta preparación y se agregaron en la cámara, donde se procedió a contar las cuatro áreas sombreadas (L) (ver Figura 6) para finalmente, estimar la concentración celular aplicando la siguiente formula: Concentración (células / mL) = 10000 (x / 4)

3.2.9 Aislamiento y caracterización parcial de la sustancia antagonista.

Dada la evidencia del efecto antagónico de BC10 sobre *E. carotovora*, se procedió a desarrollar distintos protocolos con el fin de aislar y caracterizar parcialmente la sustancia antagonista.

3.2.9.1 Protocolos de aislamiento de la sustancia antagonista

Con el fin de determinar si la sustancia antagonista era un producto extra o intra celular, para luego purificarla y/o caracterizarla parcialmente, en primera instancia se probó obtener actividad a partir de los extractos crudos (E.C.), que fueron obtenidos de la filtración de los cultivos, mediante la utilización de los filtros de 0,45 μ y 0,22 μ , posteriormente, con el propósito de facilitar la excreción al medio de los metabolitos y determinar la posible localización intracelular de la sustancia inhibitoria, se realizaron pruebas complementarias, como la extracción con solventes orgánicos, sonicación y otras descritas en el Anexo 6, obteniéndose una diversidad de extractos crudos y *Pellet*, a cada uno de los cuales les fueron realizadas las pruebas de antagonismo *in vitro*, sin embargo, ninguno de ellos mostró actividad inhibitoria sobre *E. carotovora*.

3.2.9.2 Inducción de la producción de sustancia antagonista por BC10 en presencia de *Erwinia carotovora*

Por las razones señaladas, los experimentos posteriores fueron destinados a probar la hipótesis de inducción, diseñándose experimentos con la finalidad de estudiar y comprobar que la regulación de la biosíntesis de la sustancia antagonista por la cepa BC10, correspondería a algún tipo de inducción por la presencia de *E. carotovora* en el medio de cultivo, ya sea ésta en forma vegetativa o muerta.

Una etapa previa en que ambas cepas involucradas fueron cultivadas en matraces agitados en forma paralela, la cepa BC10 en medio MBM (32°C, 12 h) y *Erwinia* por su parte, en caldo cerebro corazón, (28°C, 12 h).

Para la preparación del cultivo de BC10 inducido por *Erwinia* (C.B.I.E.) se probaron distintas formas y proporciones de adicionar *Erwinia* al medio de cultivo, descritas en la Tabla 5.

Luego de adicionar *Erwinia* se agregó la cepa BC10 y se dejó en un matraz agitado (a 30°C y 220 rpm) durante 24h. Para estudiar el comportamiento de la cepa BC10 en éstas nuevas condiciones, se determinó la cinética microbiana y se realizaron ensayos de antagonismo cada dos horas con los extractos crudos inducidos (E.C.I), obtenidos a partir de las muestras filtradas mediante filtros Millex Gp de 0,22 μ , siguiendo el procedimiento descrito en el punto 3.2.2.

3.2.9.3 Purificación parcial de la sustancia antagonista por medio de Centriplus®

Con la finalidad de purificar, y estimar el rango de peso molecular de la sustancia antagonista, se procedió a determinar la actividad *in vitro* de los permeados y retenidos obtenidos de la ultrafiltración de C.B.I.E (con *Erwinia* sonicada), utilizando el sistema de filtración estacionaria con vibrador Millipore, con membrana 30 kD y los sistemas de membranas de Centriplus YM-10 e YM-3, de 10 kD y 3 kD respectivamente, lo que será indicativo del rango de PM de las sustancias antagonistas. Esto se realizó de acuerdo al siguiente procedimiento:

1. El concentrado celular obtenido a partir del C.B.I.E (con *Erwinia* sonicada) fue centrifugado (8.000 xg, 10 min, 4°C), en tubos de PPCO estériles; siendo descartado el sedimento.
2. El sobrenadante fue extraído cuidadosamente con pipetas Pasteur y luego fue filtrado mediante un filtro de 0,22 µm (Millex G-P). A esta alícuota filtrada se le denominó extracto crudo inducido (E.C.I). Una fracción de este fue congelada - 20 °C para estudiar su estabilidad y con la otra se procedió como se indica en el siguiente punto (4).
3. Para utilizar por primera vez los sistemas de centriplus YM-10 e YM-3 es necesario lavarlos durante 5 minutos con agua desionizada estéril, para eliminar el glicerol protector contenido en la membrana.
4. La alícuota de E.C.I fue ultrafiltrada con centriplus YM-10 e YM-3, el volumen inicial fue de 10 - 15 mL, los cuales fueron centrifugados a 3000xg a 25°C por 90 minutos.

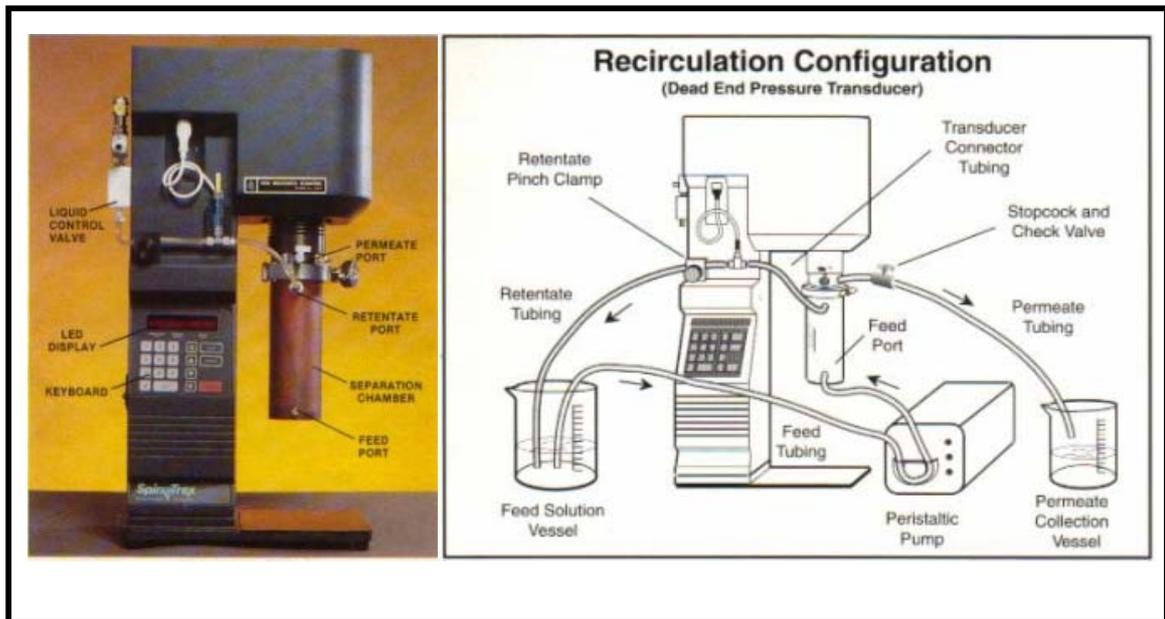


Figura 5. Equipo Spintrex™ y esquema de operación en recirculación

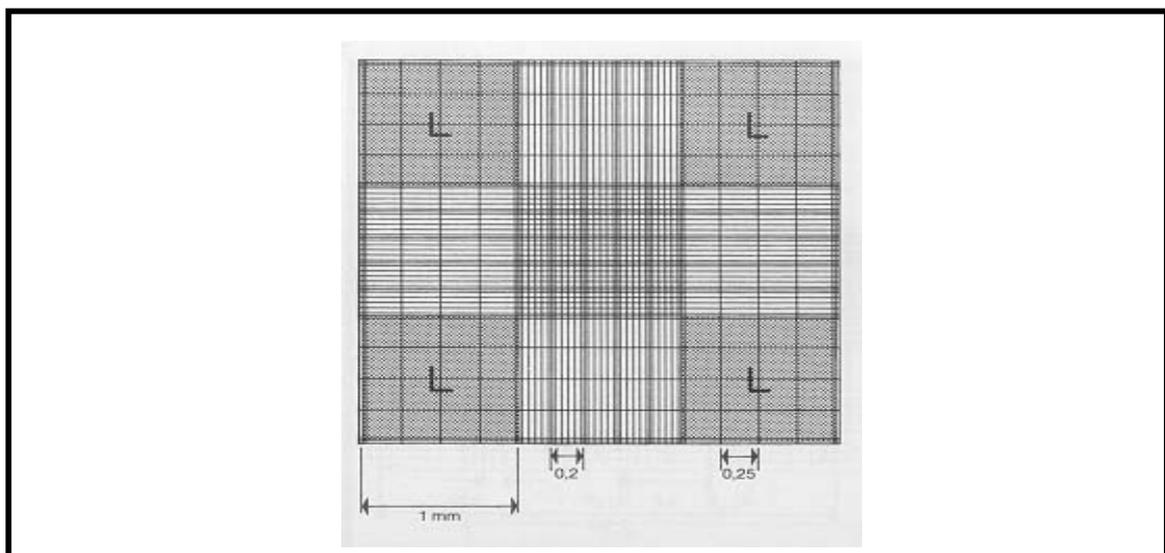


Figura 6. Detalle de la cámara de conteo (Neubauer), con cuatro áreas de 1 mm² (L) Fuente: <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/contajecelular.ht>

Tabla 5 Diseño experimental de las pruebas de inducción

Pre-tratamiento de <i>Erwinia carotovora</i>	<i>E. carotovora</i> adicionada (mL)	Cepa BC10 adicionada (mL)	C.B.I.E.(mL)
Sonicada 1 h con calor	30	50	300
Erwinia viva activada	200	20 ¹⁾	200 ²⁾
Erwinia viva activada	30	50	300
Erwinia viva activada	10	20	200
Erwinia muerta incluida en agar	20	30	300
Erwinia viva incluida en agar	20	30	300

¹⁾ en bolsa de diálisis

²⁾ en caldo cerebro corazón

5. El permeado obtenido de la primera centrifugación aprox. 4 mL, fueron colocados en la membrana YM-3, los cuales se centrifugaron a 3000xg a 25°C por 250 min.
6. El retenido de la membrana YM-10 fue diafiltrado 3 veces, utilizando agua desionizada y luego el centriplus fue colocado en posición invertida, realizado un “*spin down*”, a 2000xg por 2 min, esto se realiza para recuperar lo que queda retenido en la membrana.

7. Los diafiltrados de la membrana YM-10 se colocaron en la membrana YM-3, los permeados fueron recolectados
8. Se procedió a diafiltrar la membrana YM-3, tres veces realizando “*spin down*”, obteniéndose el extracto crudo ultrafiltrado inducido (E.C.U.I).
9. Alícuotas de cada proceso fueron guardadas para posteriormente determinar actividad antagonista y concentración de proteínas, para lo cual se utilizó el método de Sedmak.

Por otra parte, como alternativa al paso 1 y 2, el CBIE se pasó por el Spintrex™ y se recolectó el permeado, luego este fue filtrado mediante el Sistema de filtración estacionaria con vibrador Millipore, con membrana 30 kD, Amicon (Anexo 10), obteniéndose una mayor cantidad de ECI para utilizarlo en las siguientes etapas de purificación con las membranas de centriplus YM-10 e YM-3.

3.2.9.4 Determinación de la concentración de proteínas mediante Sedmak

Dado que en general las sustancias con actividad biológica tienen algún componente proteico, es que se decidió tomar como parámetros de la purificación de la sustancia antagonista, la actividad *in vitro* y la determinación de la concentración de proteínas presentes, es decir, en el permeado y retenido de las membranas centriplus y así obtener una relación entre ambas. Para lo anterior, se utilizó el método Sedmak (Sedmak y Grossberg, 1977), que se basa en la capacidad del colorante Azul de Coomassie Brillante G250 de pasar desde una coloración café-naranja (forma leuco) a un intenso color azul una vez que se encuentra unido a proteínas; con esta

metodología fue posible calcular la concentración de proteínas presentes en el extracto crudo ultrafiltrado inducido (E.C.U.I).

El método consiste en mezclar 0,5 mL de la solución ácida del colorante con 0,5 mL de la muestra a analizar y medir la absorbancia a 595 nm y 465 nm, utilizando como blanco reactivo una solución de suero fisiológico y colorante en proporción 1:1, ajustando el espectrofotómetro a cero con suero fisiológico. Con las absorbancias medidas se calcula la relación anteriormente señalada y a la relación obtenida se le resta la obtenida por el blanco reactivo. La curva de calibración se construyó del mismo modo (ver anexo 7, en página 162).

3.2.9.5 Espectro de absorción de la sustancia antagonista

Por largo tiempo se ha reconocido el potencial de *B. subtilis* para producir antibióticos, siendo predominantes los antibióticos de naturaleza peptídica (Stein, 2005). Respecto al espectro de emisión de estas sustancias, Bernal *et al.*, (2002), informaron de un lipopéptido provenientes de *Bacillus* que absorbe luz a 212 nm, es así que con el propósito de estudiar el espectro del permeado de la membrana YM-3 (último rango probado que presentó actividad antagonista) se realizó un barrido UV-visible.

3.2.9.6 Hemólisis de eritrocitos humanos

Según lo señalado en la literatura, un tipo de lipopéptidos cíclicos específicamente iturina A, es capaz de de inducir modificaciones morfológicas severas en eritrocitos humanos, provocando su hemólisis; con el fin de estudiar este efecto se colocaron 15 μ L del extracto crudo inducido, extracto crudo concentrado inducido y 10 μ L de

concentrado celular en una placa de agar sangre y se la dejó incubando en una estufa a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 72 h.

3.3 Estabilidad de los extractos crudos

A fin de determinar la estabilidad de las alícuotas obtenidas en las distintas etapas de purificación, se realizaron las pruebas de antagonismo *in vitro* descrito en el punto 3.2.2 para las muestras que fueron guardadas a -20°C , 4°C , 25°C y temperatura ambiente a tiempo 0, 7 y 14 d.

Asimismo a las fracciones obtenidas a partir de la filtración con filtros Millex GP-0,22 μm , que fueron previamente centrifugadas a $8.000\times g$ por 10 min a 4°C , fueron guardadas a -20°C y su estabilidad fue medida durante dos semanas.

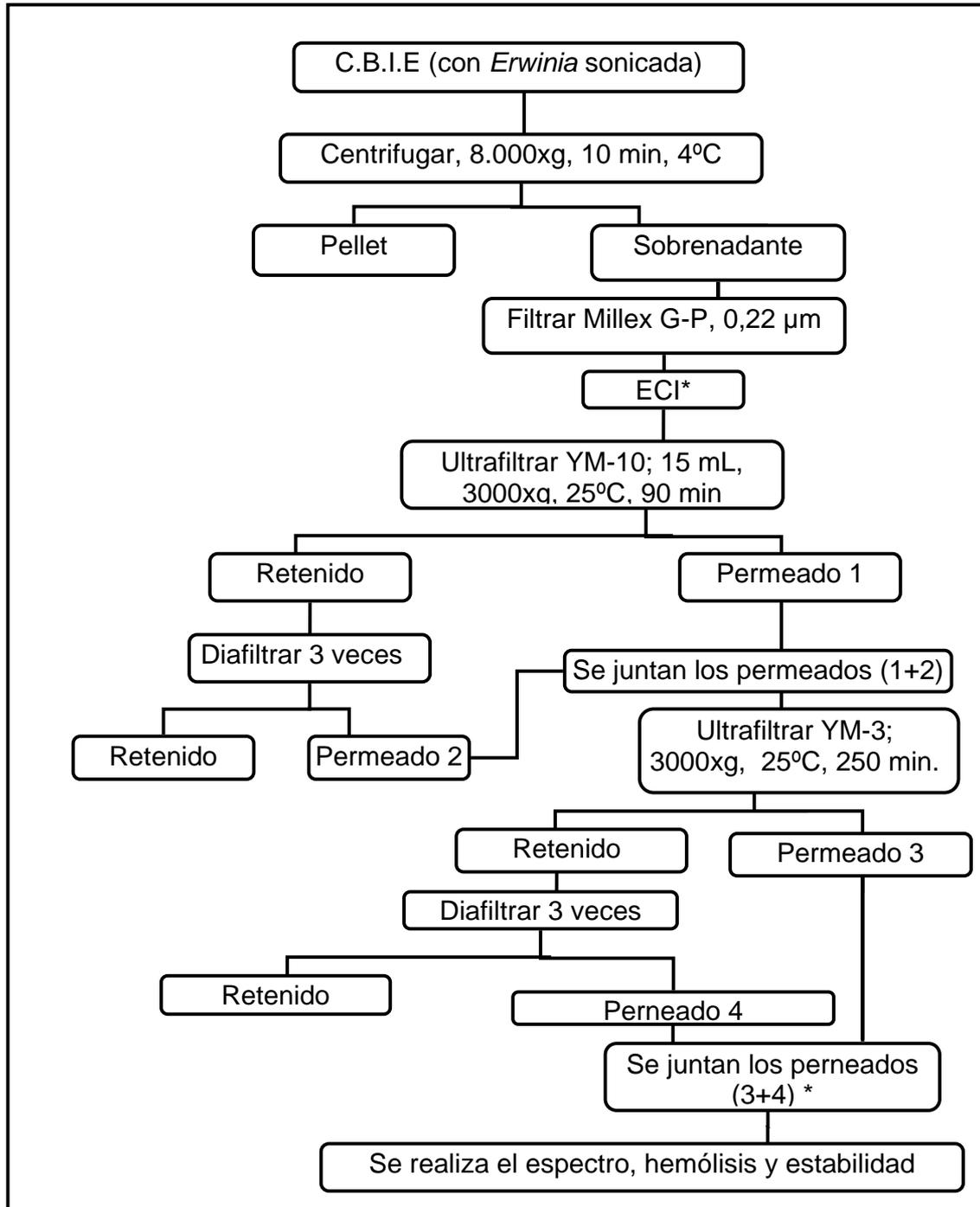


Figura 7. Diagrama de flujo del proceso de purificación parcial de la sustancia antagonista. * Fracciones de éstas fueron guardadas a -20°C .

4. Resultados

4.1 Caracterización de la cepa BC10

Las colonias de la cepa, en agar papa dextrosa se observan opacas, de bordes redondeados e irregulares, centro transparente y de aspecto “seco” (ver Figura 8).

Al microscopio se observó la presencia de bacilos de 2µm de largo, agrupados de forma irregular, positivos a la tinción de Gram (ver Figura 9 y 10).

Algunas pruebas bioquímicas relevantes y disponibles en el laboratorio, permitieron identificar la cepa como correspondiente a la familia Bacillaceae, género *Bacillus* especie *subtilis*; los resultados de estas pruebas se muestran en la Tabla 6.

4.2 Afinamiento de las pruebas de antagonismo *in vitro*.

Se determinó que 10 µL de concentrado celular y 15 µL del extracto crudo, resultaron ser volúmenes de trabajo apropiados para la realización de las pruebas de antagonismo.

Asimismo, se estableció que 24°C era una temperatura adecuada para realizar las pruebas de antagonismo *in vitro*, ya que a esta temperatura se prioriza la producción de la sustancia antagonista por sobre el crecimiento, situación que resulta inversa a 32°C.

Tabla 6 Resultados de las Pruebas bioquímicas realizadas a la cepa BC10

Prueba	Lectura a 24 h	Lectura a 72h
Producción de Indol	-	-
Crecimiento en Citrato	-	+
Hidrólisis almidón	+++	+++
Crecimiento a 32°C	+	+
Crecimiento a 65°C	-	-
Utilización de Glucosa	+	+
Voges Proskauer	-	+
Oxidasa	+	+
Catalasa	+++	+++
Tolerancia NaCl 7%	+	+
Utilización de urea	-	-
Hidroliza yema de huevo	+	+
Anaerobiosis	-	-



Figura 8. Crecimiento de la cepa BC10 en medio de agar papa dextrosa (APD), incubada a 24°C durante 24h.



Figura 9. Fotografía al microscopio óptico de la cepa BC10. Una muestra líquida del cultivo MBM fue fijada y sometida a la tinción de Gram. Se puede observar el carácter positivo de los bacilos.

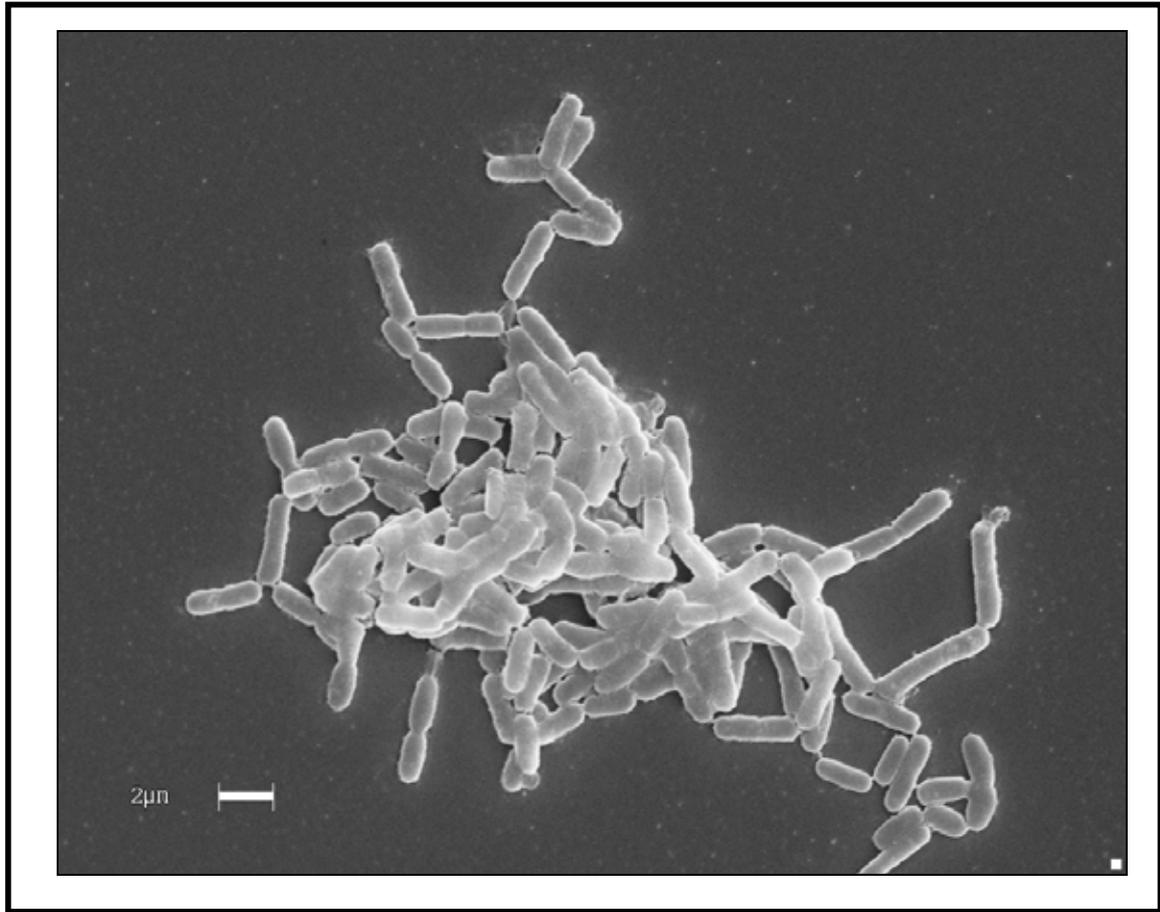


Figura 10. Micrografía electrónica de barrido de la cepa BC10. Una muestra líquida del cultivo MBM fue fijada y recubierta parcialmente con partículas de oro. Se puede observar la presencia de bacilos distribuidos en forma irregular.

El sistema de identificación API[®] 50 CHB/E combinado con el sistema API[®] 20 E, arrojó 4 taxones significativos, como se muestra en la Tabla 7

Tabla 7 Porcentajes de identificación de los taxones significativos para la cepa BC10

Taxones significativos	Porcentajes de Identificación
<i>B. subtilis</i>	59.8%
<i>B. megaterium</i>	20.6%
<i>B. licheniformis</i>	11.1%
<i>B. amyloliquefaciens</i>	6.0%

La base de datos de Bio Merieux determinó que existe buena identificación con el género *Bacillus* (Anexo 1).

En la Figura 11 y Tabla 8 se muestran los resultados de las pruebas de antagonismo realizadas en los nueve diferentes de medios sólidos donde es posible apreciar que la mejor nitidez la revela la prueba en agar APD, no obstante, los medio MBM_a y MBCa⁺², presentan un radio mayor.

Además es posible apreciar las diferencias de gran significancia en el tamaño del halo, entre los distintos medios sólidos evaluados.

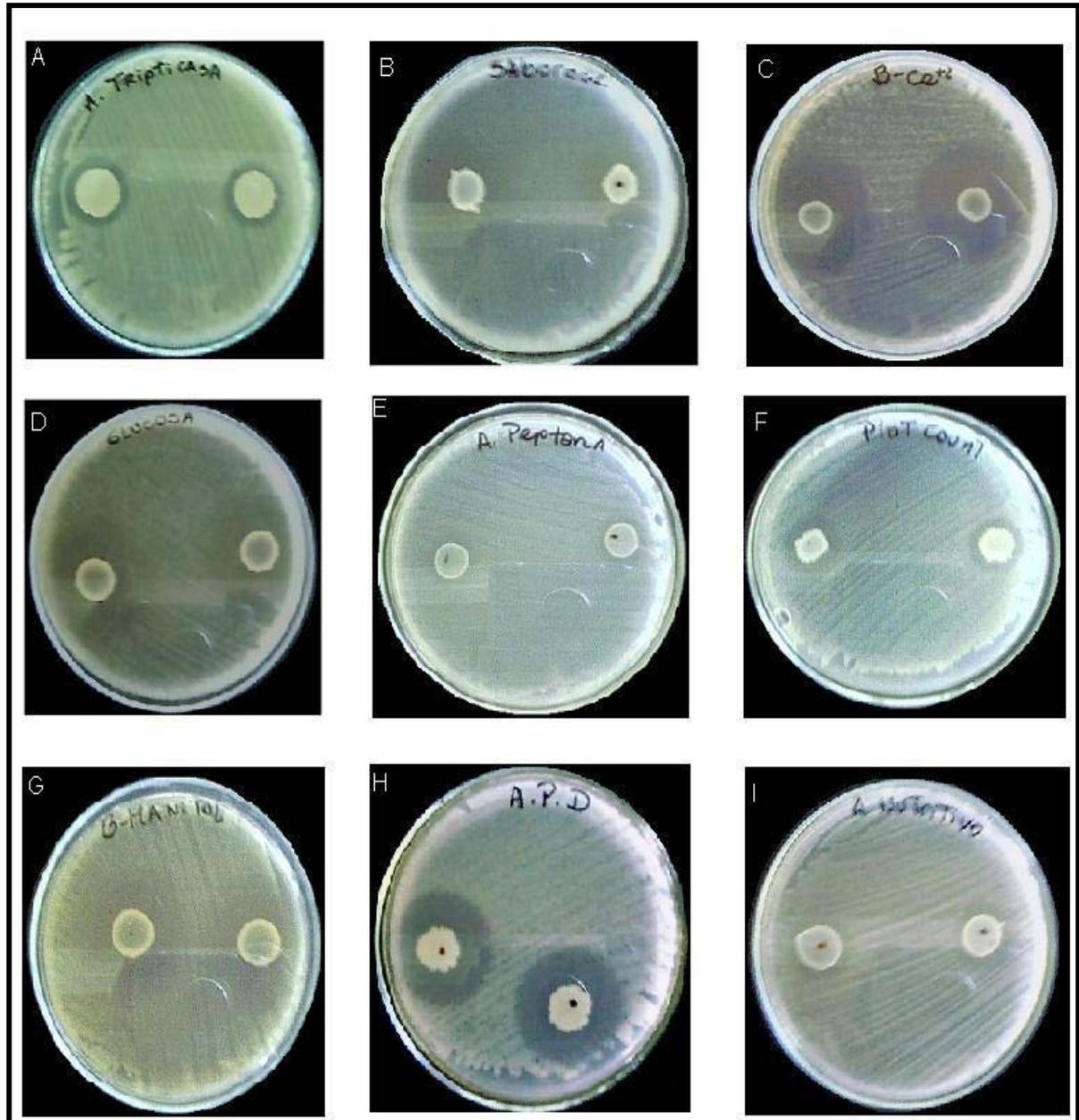


Figura 11. Pruebas de antagonismo *in vitro* en A). Agar soja tripticasa; B). Agar Saboroud; C) Agar MBCa²⁺; D) Agar MBG; E) Agar peptona; F) Agar común; G) Agar MBM_a; H) Agar papa dextrosa; I) Agar nutritivo.

Tabla 8 Medidas de los halos externos de inhibición visualizados en las pruebas de antagonismo *in vitro* en los distintos medios sólidos probados

Agar	Promedios de radios externo de inhibición (mm)	De Figura XX foto
Tripticasa	3	A
Saboroud	7	B
MBCa⁺²	12	C
MBG	10	D
Peptona	1	E
Plate Count	2,5	F
MBM_a	12	G
Papa dextrosa	9	H
Nutritivo	2	I

Las fotos A y B de la Figura 12 corresponden a la placa G de la Figura 11 tomadas desde otro ángulo, efecto que permitió visualizar la presencia de un doble halo. Por otra parte, resulta interesante destacar, que en repetidas ocasiones también en agar papa dextrosa (APD) fue posible observar la presencia de un doble halo; las dimensiones de los halos fueron de $1,6 \pm 0,33$ cm radio mayor y el menor $0,46 \pm 0,1$ cm, siendo el radio menor aquel más cercano a la gota. El efecto de ambas áreas sobre *Erwinia* mostró que el halo más pequeño presentó efecto bactericida y el más grande un efecto bacteriostático.

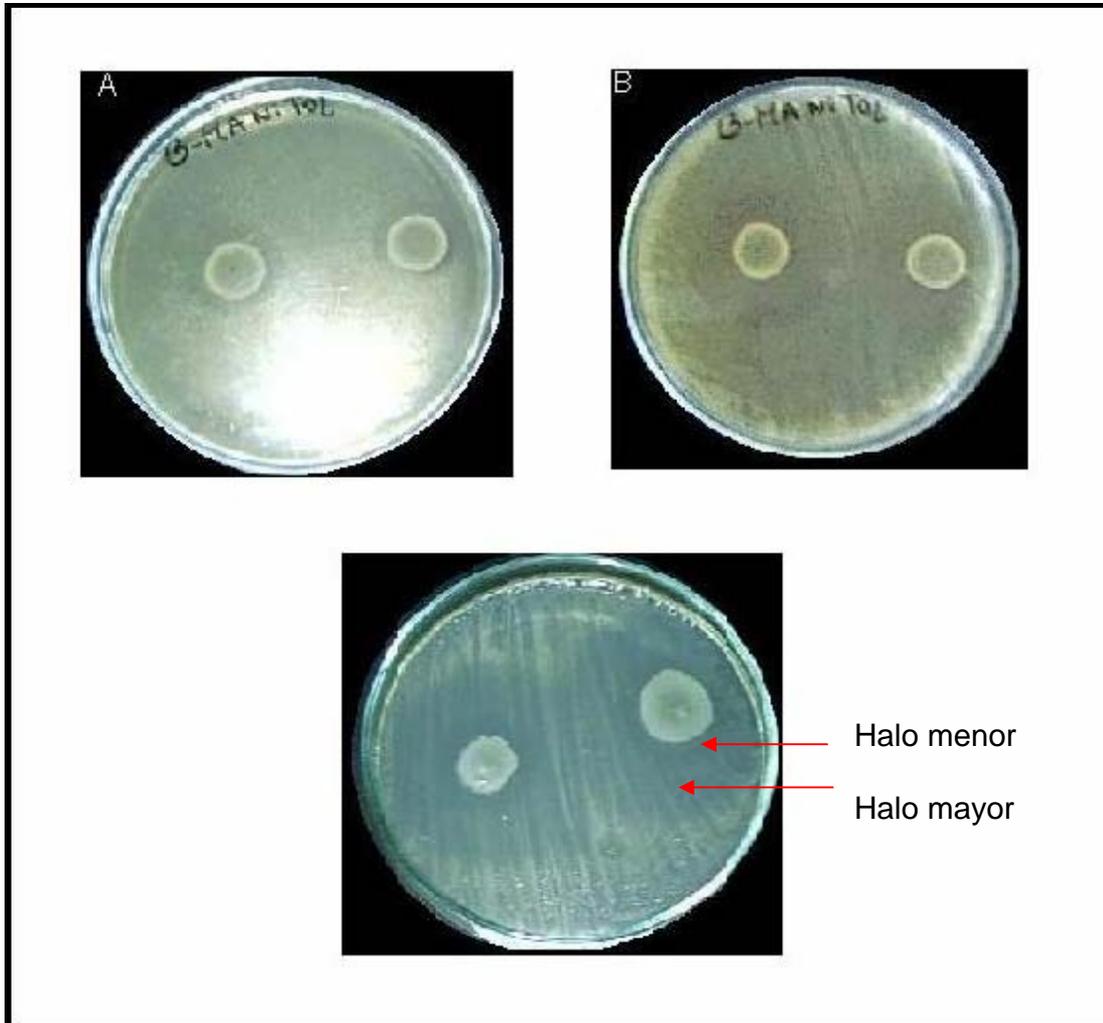


Figura 12. Visualización del doble halo de inhibición en. A) y B) agar manitol y C) agar papa dextrosa

Respecto a la actividad inhibitoria del extracto crudo y los concentrados y superconcentrados celulares:

- Los ensayos *in vitro* no revelaron actividad inhibitoria en el extracto crudo, ni en el extracto crudo ultrafiltrado, a pesar de haber probado distintos protocolos tendientes a demostrar el antagonismo.
- Se logró obtener una buena actividad inhibitoria sobre *Erwinia* a partir de los concentrados y superconcentrados celulares. El radio de inhibición observado fue en promedio 1,6 cm \pm 0,33.

4.3 Estudios preliminares para el crecimiento óptimo de la cepa BC10

Conforme lo señalada en 3.2.3, los resultados obtenidos se resumen en:

- De los ocho medios de cultivos diseñados sólo M5 y M6, a base de melaza como fuente de carbono, permitieron obtener una fase de latencia muy corta observándose un rápido crecimiento.
- Es importante señalar que estos medios resultaron ser de muy bajo costo.
- En las distintas fermentaciones se observó la producción de gran cantidad de espuma, principalmente al alcanzar la fase estacionaria.
- La adición de calcio, no modificó el crecimiento ni la actividad antagonista de la cepa, sin embargo, se observó floculación y cambios morfológicos al frotis.
- Respecto al pH 5,5 que corresponde al pH del sustrato donde crecen las calas, resultó ser adecuado para el crecimiento de la cepa.

- La temperatura de trabajo fue 32°C, menores a ésta retardaron el crecimiento y cercanas a los 4 °C, promovieron la esporulación de la cepa.
- Las pruebas de antagonismo realizadas a las alícuotas de los concentrados celulares obtenidas de los diferentes medios, no mostraron diferencias apreciables; no obstante los extractos crudos no dieron antagonismo.
- Se observaron diferencias en la morfología al frotis de la cepa BC10 en los distintos medios de cultivos probados.
- Se observó la presencia de una “nata o velo” sobre la superficie de los cultivos líquidos después de unas horas de que éstos quedaran en reposo, análisis al frotis de esta nata revelaron la presencia de bacilos en estado vegetativo, Gram positivos. Posteriormente, mediante microscopia electrónica se pudo visualizar los bacilos envueltos en una matriz, como se muestra en las Figura 13 A) y B).

4.4 Determinación de la cinética bacteriana

Debido a que al inicio de la presente investigación fue posible observar tiempos de latencia de hasta 12 h, se decidió trabajar con inóculos nuevos y recién activados, cada vez. Las cinéticas de crecimiento obtenidas en cada medio de cultivo se muestran en las Figuras 15 y 16 y los parámetros cinéticos, tiempo de duplicación t_d y la velocidad específica de crecimiento μ , se resumen en la Tabla 9.

Las pruebas de antagonismo *in vitro*, llevadas a cabo a partir de las alícuotas guardadas (siempre a temperatura ambiente) de cada medio se pueden observar en la Figura 14.

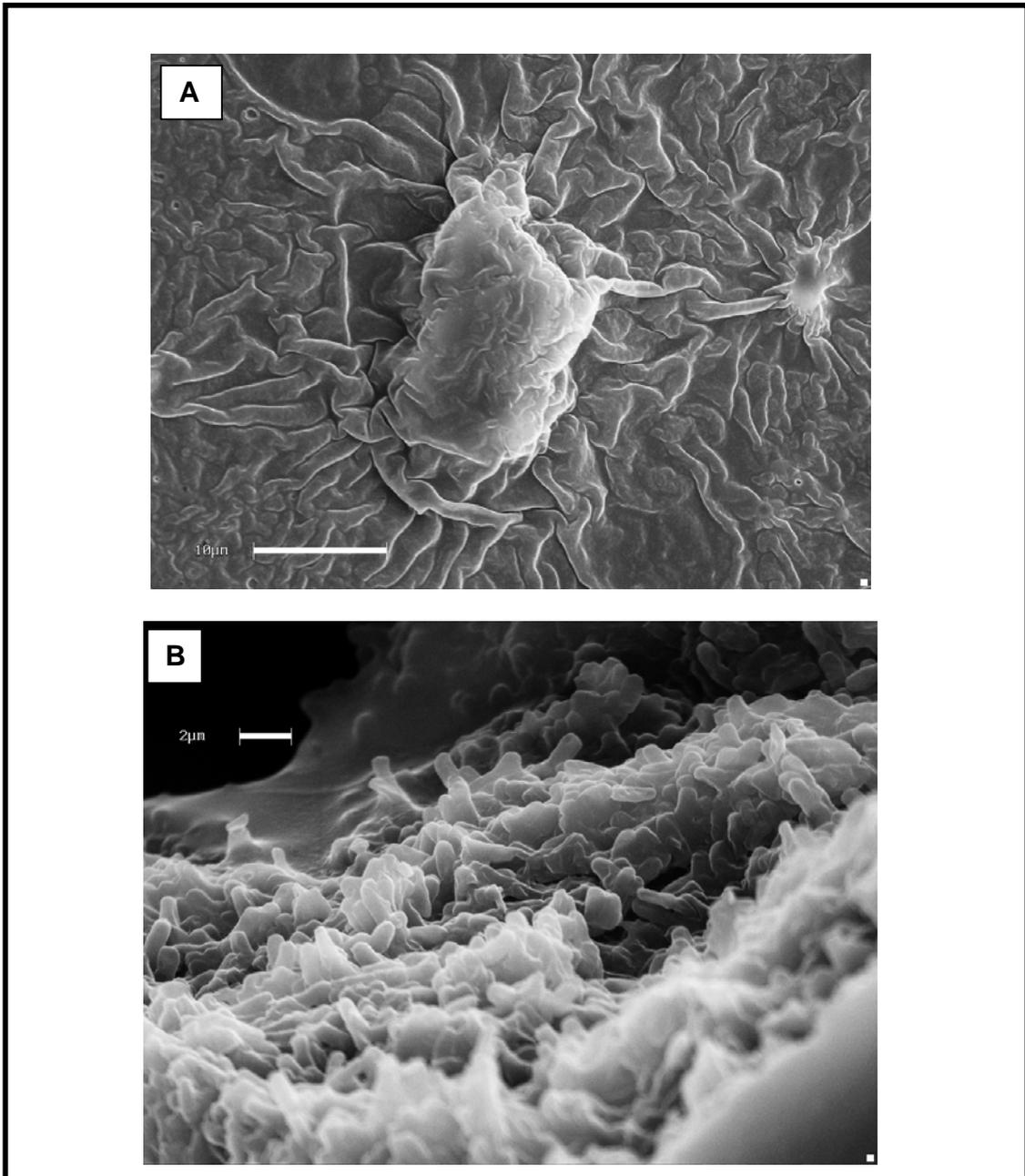


Figura 13. A y B son micrografías electrónicas de barrido de la “nata o velo” formado sobre la superficie del medio de cultivo líquido. En estas se puede observar los bacilos inmersos en esta matriz.

El radio externo de los halos fueron: $1,6 \pm 0,33$. Las mismas alícuotas fueron filtradas, sin embargo, no presentaron antagonismo.

Tabla 9 Parámetros cinéticos obtenidos con la cepa BC10 en los distintos medios de cultivos líquidos

Medios de cultivo	Tiempo de duplicación t_d (h)	Velocidad específica de crecimiento μ (h^{-1})
Medio MBA	1,90	0,3711
Medio MBM: c/ Ca^{+2}	0,75	0,9247
s/ Ca^{+2}	0,70	1,0037
Medio MCP	2,07	0,3356
Medio MCP- Ca^{+2}	No se cuantifica ABS_{600} por exceso de turbidez	
Medio MBS		

4.5 Producción de la cepa BC10

De acuerdo a lo señalado en el punto 3.2.5, se llevó a cabo la producción de grandes cantidades de la cepa antagonista en las modalidades descritas anteriormente: cultivo en matraz agitado, batch de litro, batch de 14 L y cultivo continuo de 1 L.

- Mediante el cultivo en matraz agitado se obtuvo un concentrado celular, con un valor de ABS_{600} de 5,8 al cabo de 11 h.

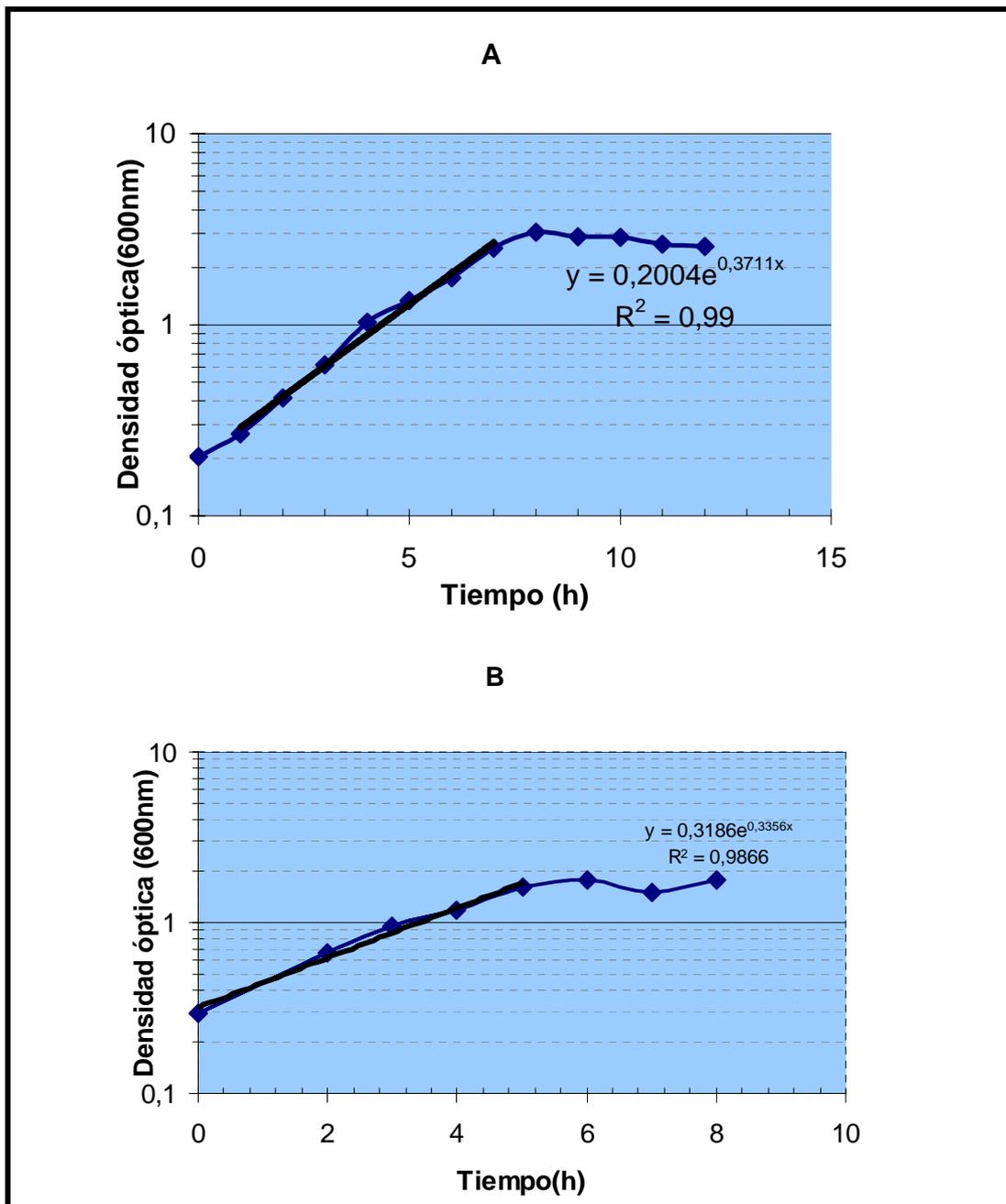


Figura 14. Cinética de crecimiento de la cepa BC10 en el medio A) MBA y B) MCP. La cepa BC10 se cultivo en matraces de litro a 32°C y 220 rpm.

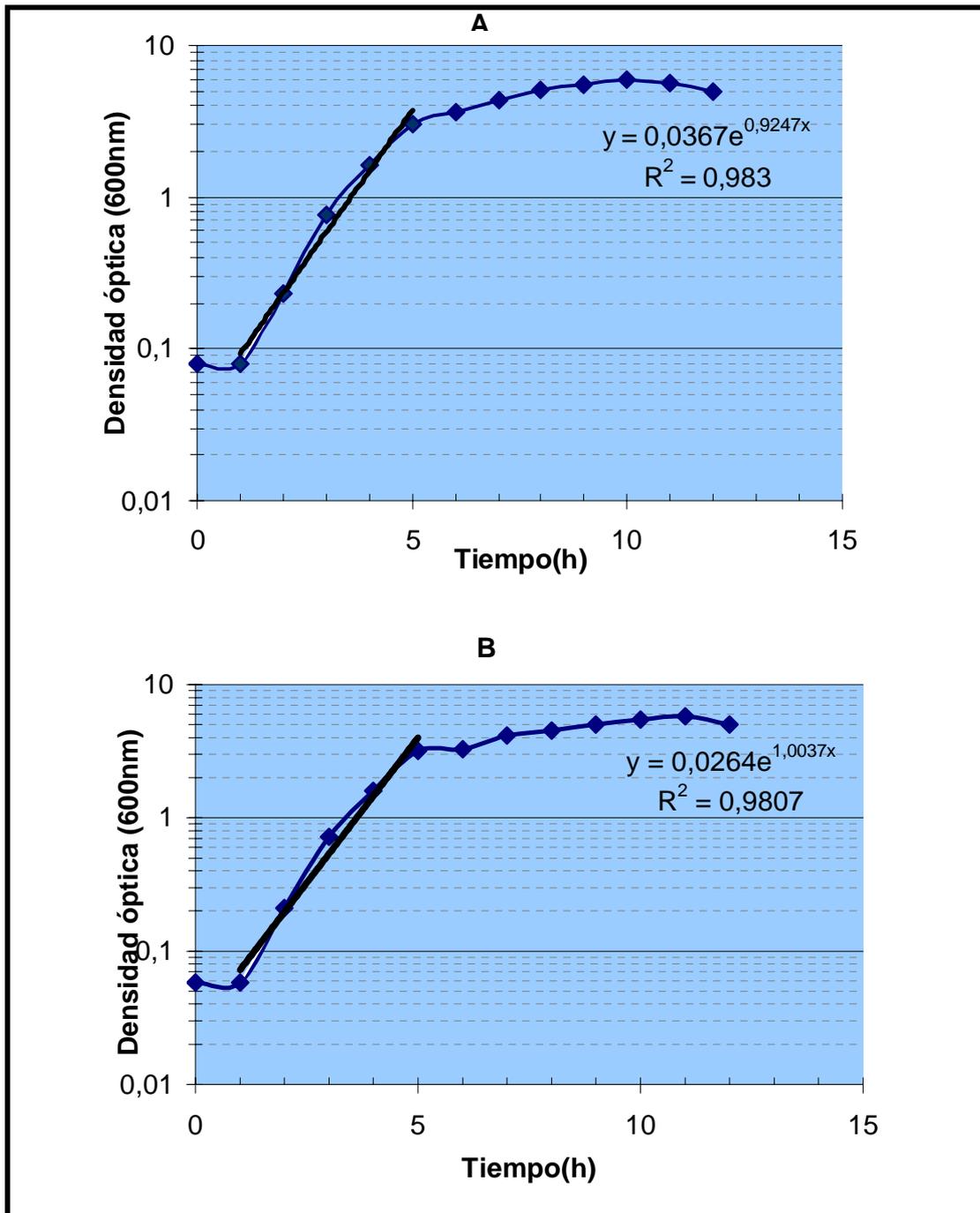
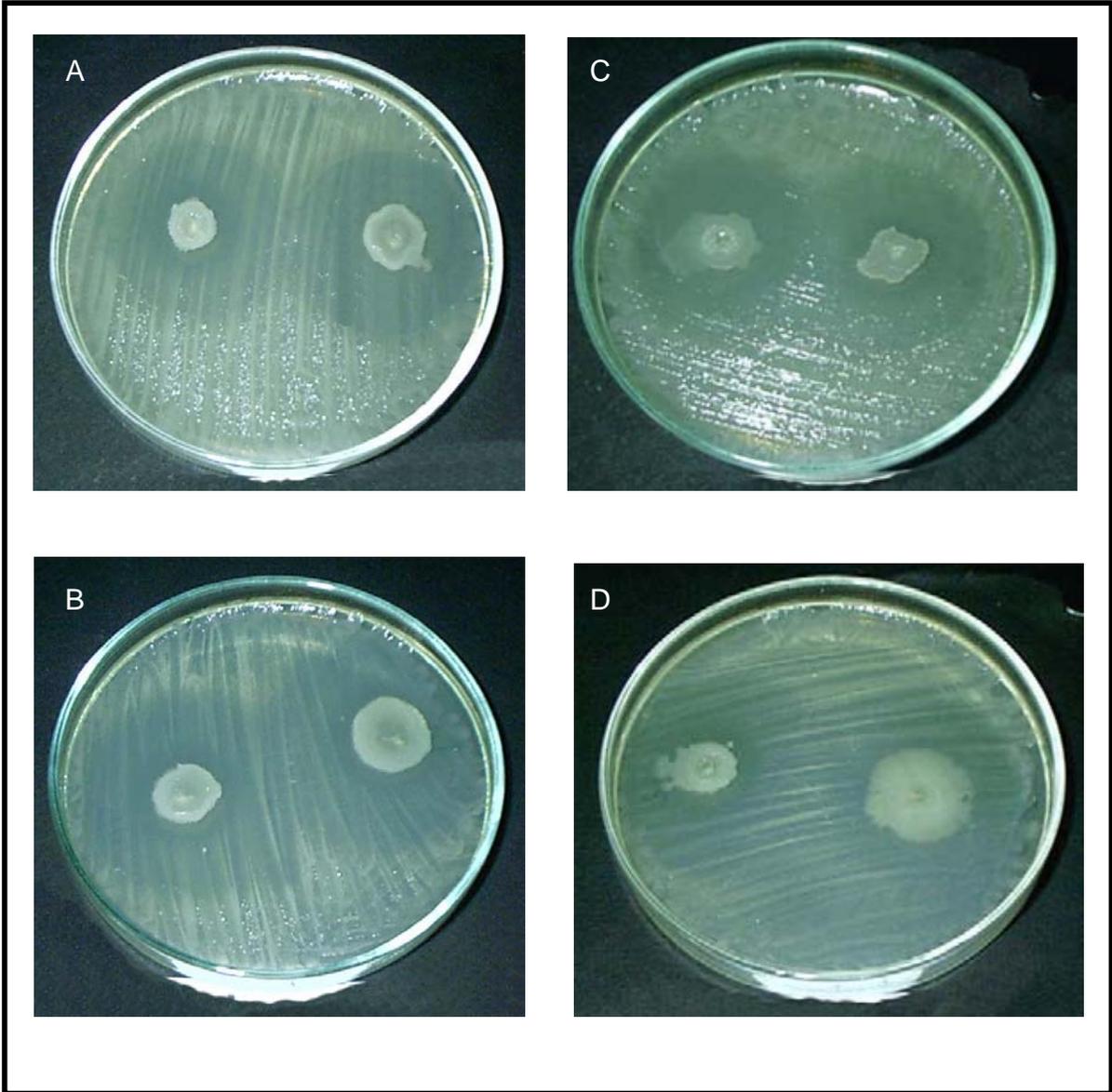


Figura 15. Cinética de crecimiento de la cepa BC10 en el medio A) MBM C/Ca⁺² y B) MBM S/Ca⁺². La cepa BC10 se cultivo en matraces de litro a 32°C y 220 rpm.



Continúa en página 87 →

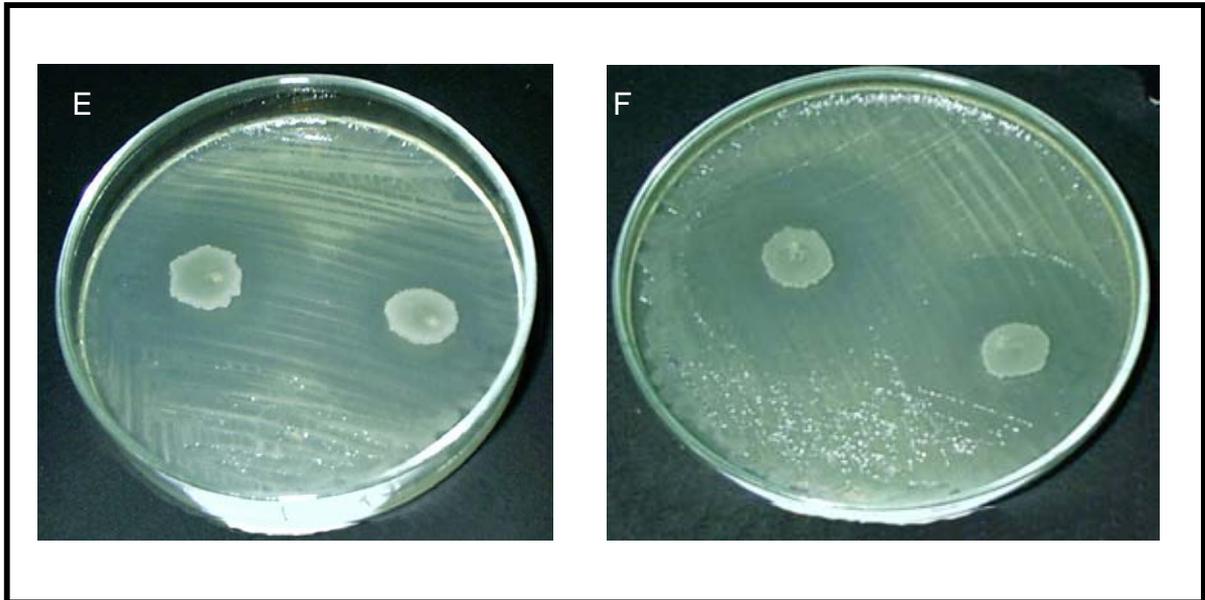


Figura 16. Muestra representativa de los antagonismo *in vitro* en agar papa dextrosa realizadas a los concentrados celulares obtenidos de los distintos medios: A.) MBA; B.) MBM s/Ca; C) MCP-Ca.; D) MBS c/Ca.; E) MBM c/Ca; F.) MBS s/Ca.

- La modalidad en Batch de litro, permitió obtener una mayor cantidad de concentrado celular con valor de ABS_{600} de 7,00 al cabo de 7 horas, acortando los tiempos de producción.
- El sistema Batch de 14L, (como muestra la Figura 17), permitió obtener una gran cantidad de concentrado celular con alto rendimiento de biomasa, alcanzando un valor de ABS_{600} de 23,20 al cabo de 48 h.
- Los valores ABS_{600} de los concentrados celulares para las distintas etapas del cultivo continuo se muestran en la Tabla 10 (ver Figura 18).

Para la producción mediante cultivo continuo se puso en marcha el cultivo batch de 1 L, el que luego de transcurridas 10 h se comenzó a alimentar con medio fresco a un caudal de 0,3498 L/h por un período de 12 h y luego un F de 0,0996 L/h por 24 h, para lograr estados estacionarios en cada situación Tabla 10 (los cálculos de presentan en el Anexo 4). Por último, la tabla 11 muestra la Abs. 600nm al finalizar cada etapa y la duración de éstas.

Tabla 10 Operación en cultivo continuo

	D1	D2
Flujo de alimentación, L/h	0,3498	0,0996
Tiempo de operación, h	12	24
Tiempo total de operación, h	22	46

Tabla 11 Duración y densidad óptica de cada etapa del cultivo continuo

Etapa de cultivo	Densidad óptica (600nm)	Duración etapa (h)
Batch 1L	6,9	14
C.C ¹⁾	1,10	12
C.C ²⁾	11,94	24

¹⁾Cultivo continuo con flujo 0,3498 L/h y Dilución 0,53 h⁻¹

²⁾Cultivo continuo con flujo 0,0996 L/h y Dilución 0,15 h⁻¹

4.6 Obtención de un superconcentrado celular de la cepa BC10.

Con el sistema Spintrex™, (como lo muestra la Figura 19) se logró un factor de concentración de 5, ello midiendo los volúmenes de permeado y retenido; éste último presentó un aspecto de suspensión, densa y espesa, denominándosele superconcentrado celular.

Recuentos celulares efectuados a este superconcentrado resultaron 10¹⁵-10¹⁶ UFC/mL, no fue posible mayor exactitud debido al particular comportamiento de la cepa.

4.7 Estabilidad del concentrado celular

Los concentrados celulares que fueron dejados a -20°C utilizando dos tipos de crioprotector, glicerol al 10% y 20% y leche en polvo al 20% esporulación a pocas horas de ser almacenados y su reactivación en caldo cerebro corazón llevó 48 h.

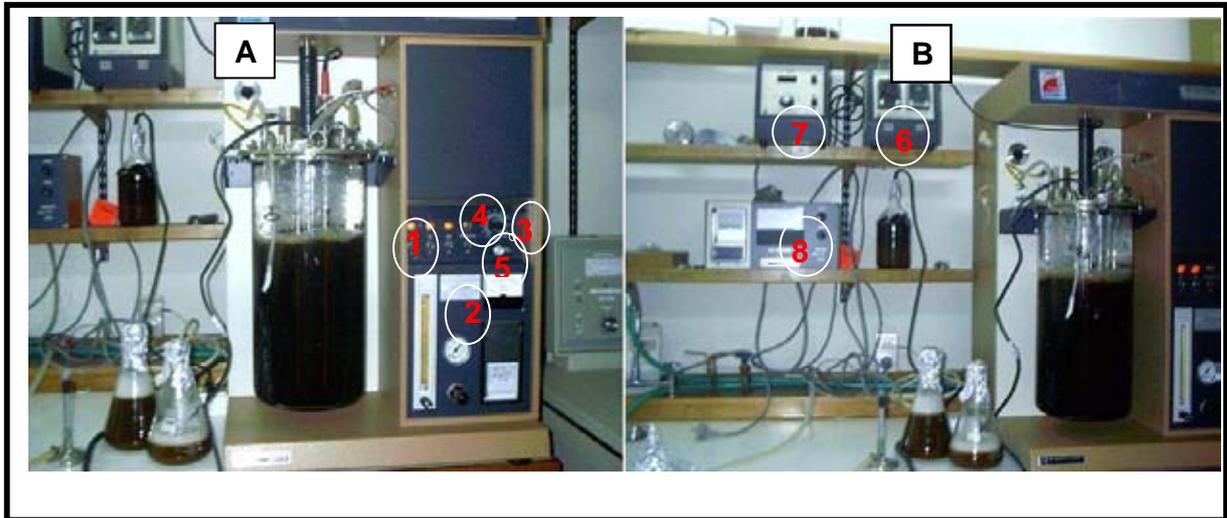


Figura 17. Fotografía de la producción de la cepa BC10 en el microfermentador de 14L A) y de los equipos adicionales del sistema B)

- | | |
|---------------------------------|--|
| 1. Rotámetro (flujo de aire) | 5. Registro de temperatura |
| 2. Presión de aire de entrada | 6. Bombas peristálticas |
| 3. Ajuste agitación rotor (rpm) | 7. pHmetro |
| 4. Ajuste de temperatura | 8. Medidor y registrador de oxígeno disuelto |



Figura 18. Producción de la cepa BC10 mediante cultivo continuo

- | | |
|------------------------------|--------------------------------|
| 1. Acopio de cultivo viejo | 5. Control de temperatura |
| 2. Medio de cultivo fresco | 6. Bomba peristáltica de doble |
| 3. Rotámetro (flujo de aire) | cabezal para alimentación |
| 4. pHmetro | y descarga del medio. |



Figura 19. Obtención del superconcentrado celular a través del sistema Spintrex™

1. Colector de concentrado celular
2. Bomba peristáltica
3. Spintrex
4. Colector del permeado

Lo mismo ocurrió con los concentrados celulares que se dejaron sin crioprotector a 20°C, 4°C.

Los concentrados que fueron almacenados a temperatura ambiente y 25°C fueron los que mostraron mayor estabilidad siendo estos últimos los que no necesitaron ser reactivados antes de realizar los ensayos *in vitro*.

El concentrado celular guardado a 25°C durante 240 días mostró gran estabilidad en los primeros 45 días, luego desciende manteniéndose constante durante el tiempo restante (ver Figura 20).

4.8 Recuento celular

No fue posible efectuar recuentos celulares con resultados coherentes, por tal razón, se usó de manera alternativa el recuento en cámara, el cual arrojó una cifra de 4×10^7 células/mL para una muestra tomada a las 12 horas de cultivo y 3×10^6 células/mL para otra que estuvo guardada durante dos semanas a temperatura ambiente.

4.9 Aislamiento y caracterización parcial de la sustancia antagonista.

Dado que se insistió en lograr producción de la sustancia antagonista antes de la esporulación tardía y en lo posible antes de la fase estacionaria, se planteó como estrategia inducir la liberación de la sustancia en la fase exponencial, teniendo siempre como objetivo de largo plazo la producción industrial, sin tiempos muertos que encarezcan el proceso.

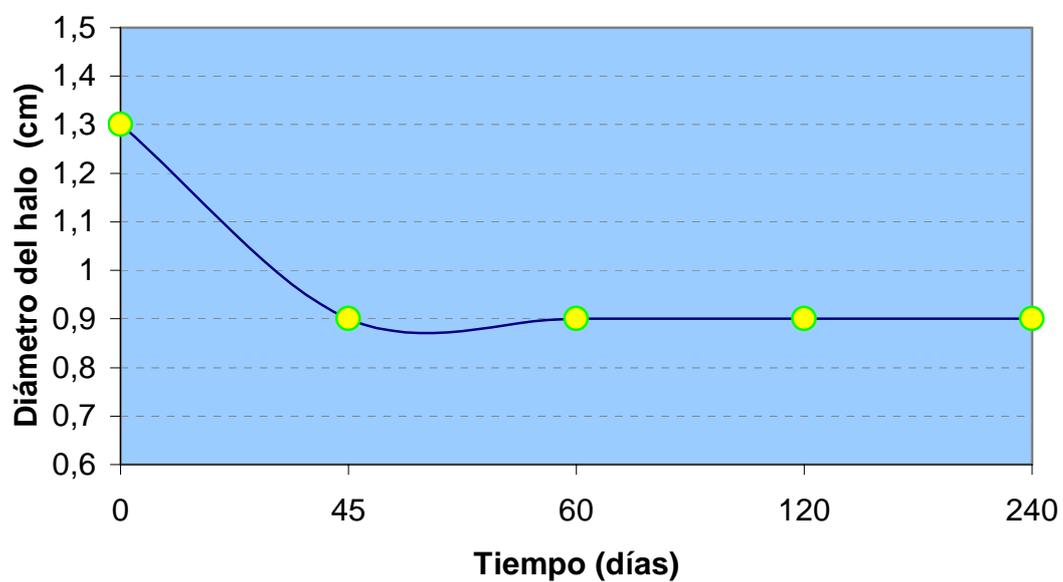


Figura 20. Estabilidad del concentrado celular. Alícuotas fueron almacenadas a 20°C durante 240 días, realizando las pruebas de antagonismo *in vitro* y midiendo el radio externo de inhibición.

4.9.1 Inducción de la producción de sustancia antagonista por BC10 en presencia de *Erwinia carotovora*.

La adición de *Erwinia carotovora* al medio de cultivo, induce la producción de la sustancia antagonista independiente de la cantidad de *Erwinia* adicionada, siempre que esta no interfiera con el desarrollo de la cepa BC10 (ver Figura 21).

Los mejores resultados en las pruebas de antagonismo se obtuvieron con *Erwinia* sonicada durante 1h y aplicando calor, adicionada en una proporción de 10% al medio de cultivo.

La velocidad de crecimiento y el tiempo de duplicación de la cepa BC10 no se ve afectada por la adición de *Erwinia Carotovora* (ver Figura 22).

La actividad antagonista se comenzó a observar en el extracto crudo inducido (E.C.I), obtenido de la muestra filtrada a las 4 h de cultivo. Aunque el halo que se observa no es definido si no hasta las 6 h de cultivo y la mejor actividad antagonista se alcanzó a las 8. Ver Tabla 12 y Figura 23.

4.9.2 Purificación parcial de la sustancia antagonista por medio de Centriplus®

- El sistema de membranas Centriplus permitió purificar la sustancia antagonista a partir del C.B.I.E. Las pruebas de antagonismo *in vitro* mostraron actividad en el filtrado de la membrana YM-10 y filtrado de la membrana YM-3.
- Se observó además que realizando las diafiltraciones pertinentes, el tamaño del halo del perneado de la membrana YM-3 se apreció más grande y nítido.

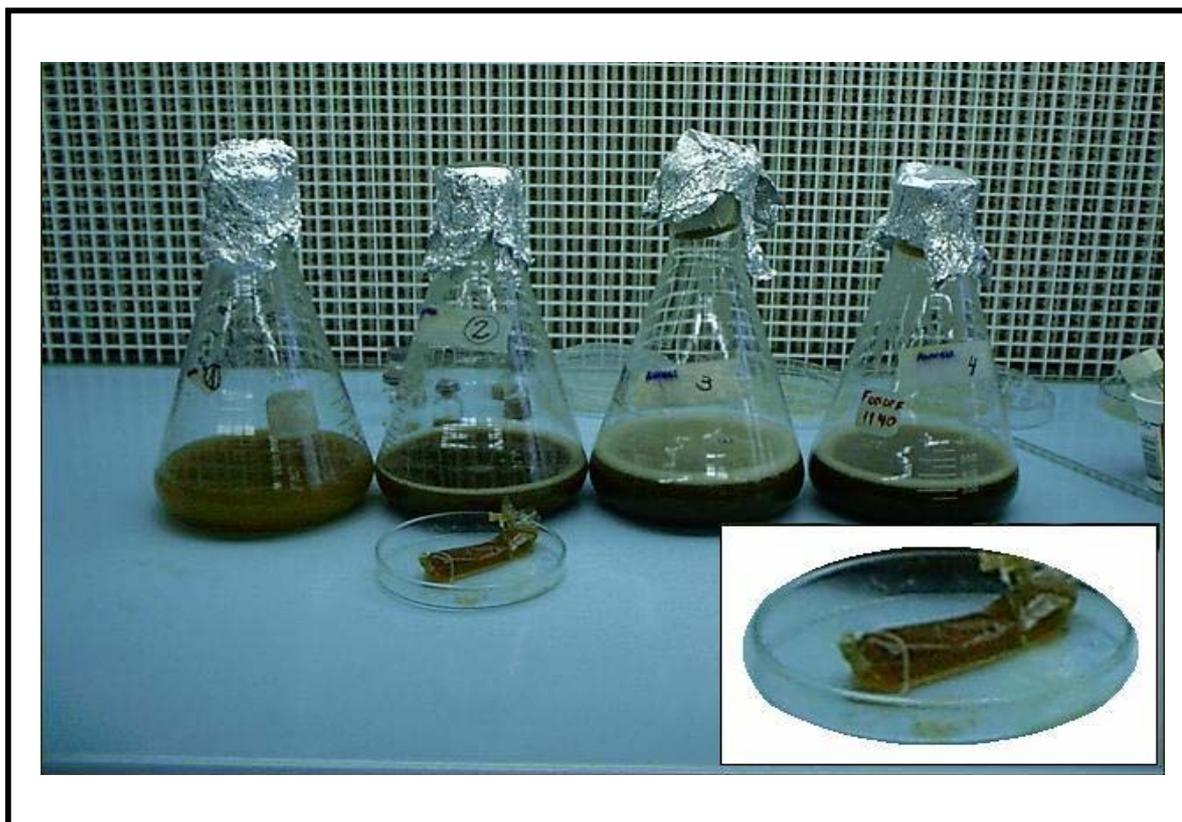


Figura 21. Ensayos de inducción. Cultivo a nivel de matraces de la cepa BC10 a los cuales se les agregó *Erwinia* en distintas concentraciones y modalidades. Como se observa en la imagen ampliada, en algunas oportunidades se utilizaron bolsas de diálisis que contenían *Erwinia*.

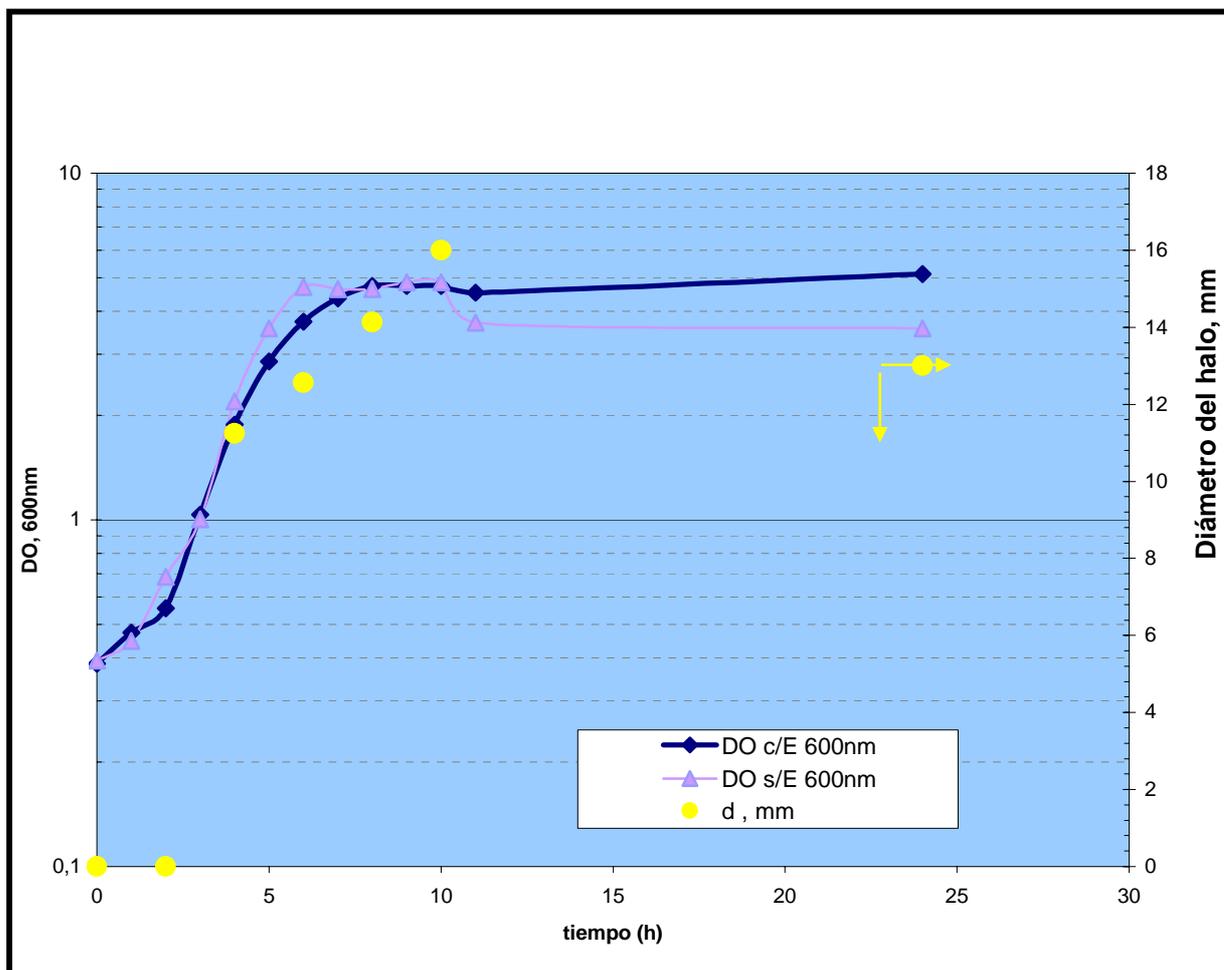


Figura 22. Gráficas comparativa de la cinéticas de crecimiento, entre un medio de BC10 sin *Erwinia* ▲, y otro con *Erwinia* ◆, relacionando a ésta última con el diámetro de los halos de inhibición ● de los extractos crudos inducidos (E.C.I) obtenidos mediante la filtración del medio ◆ en los distintos tiempos de la fermentación.

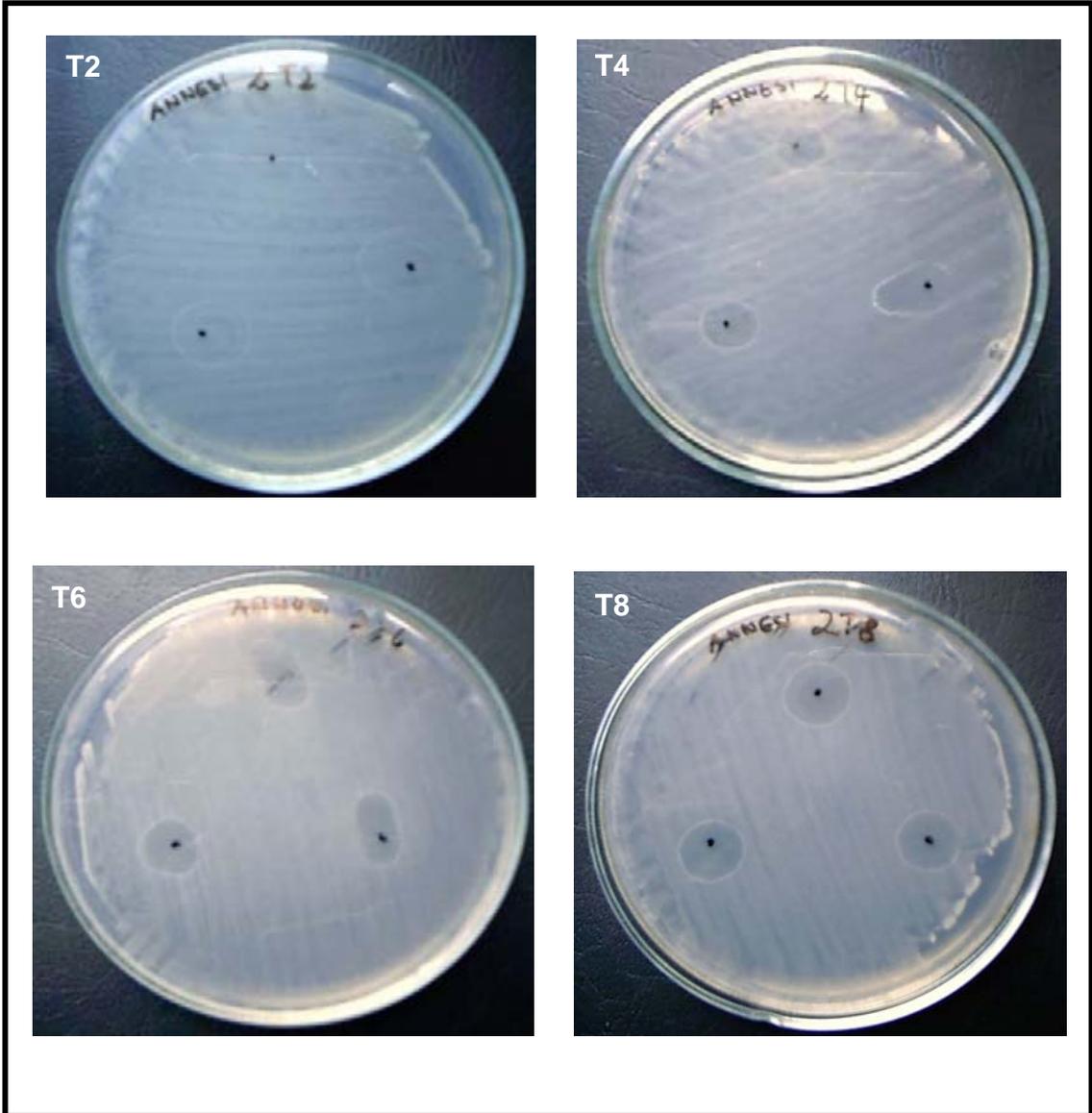
Tabla 12 Diámetro de los halos de inhibición de los E.C.I obtenidos mediante la filtración del medio con *Erwinia* en los distintos tiempos de la fermentación.

Tiempo (h)	Promedios diámetro promedio halo (mm)	Observaciones
0	Halo definido
2	Halo definido
4	11,25	Halo difuso
6	12,56	Halo definido
8	14,13	Halo definido
10	16,00	Halo definido
24	13,00	Halo difuso

- Fue necesario realizar diafiltraciones a los retenidos de YM-30, YM-10 e YM-3, por cuanto mostraban algún nivel de antagonismo residual

4.9.3 Determinación de la concentración de proteínas a través del método de sedmak

El método de Sedmak permitió calcular mediante una curva de calibración, la concentración de proteínas presentes en los extractos crudos obtenidos en las distintas etapas de la purificación parcial. La relación entre la actividad antagonista (realizadas en triplicado) y la concentración de proteínas se muestra en la siguiente Figura 24.



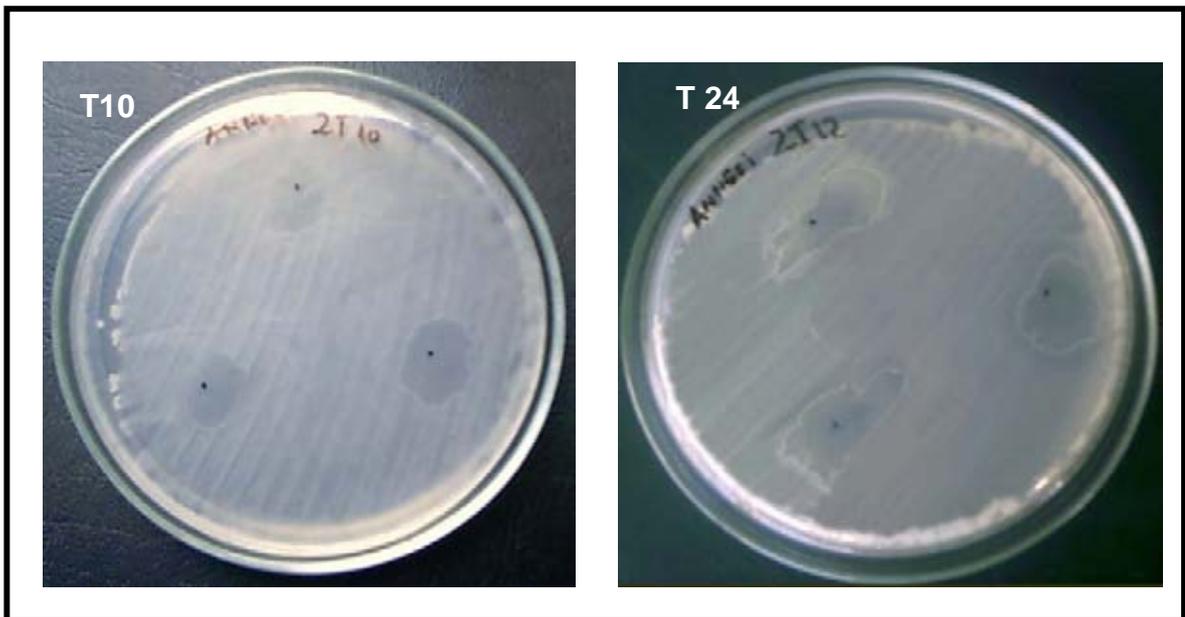


Figura 23. Antagonismo *in vitro* de los extractos crudos inducidos (E.C.I); Visualización de los halos de inhibición a los distintos tiempos (medido en horas, T2:2 horas de cultivo, T4:4 horas de cultivo....) de la fermentación del medio con *Erwinia*. Estas muestras fueron filtradas obteniéndose el extracto crudo inducido.

4.9.4 Estimación del peso molecular

Los experimentos de ultrafiltración para estimar el Peso molecular de la fracción activa del E.C.U.I mostraron que ésta, fue filtrada en la membrana de 30, 10 y 3 KDa. Indicando que la masa molecular aparentemente esta bajo los 3000 Da (Ver Figura 25).

4.9.5 Espectro de absorción de la sustancia antagonista

El espectro del E.C.U. I, mostró un pick de absorbancia en la región UV, manteniendo ciertos niveles de absorbancia en el visible, como se muestra en la Figura 26.

4.9.6 Hemólisis de eritrocitos humanos.

No se observaron cambios morfológicos de los eritrocitos humanos cuando se realizaron ensayos *in vitro* con las fracciones de extracto crudo inducido, extracto crudo concentrado inducido y concentrado celular.

4.9.7 Estabilidad del extracto crudo inducido

Las alícuotas obtenidas de las distintas fracciones de la etapa de purificación por ultrafiltración las cuales fueron almacenadas a -20°C, temperatura ambiente y a 4°C, pierden la actividad inhibitoria al cabo de 24 h.

Otras fracciones obtenidas a partir de la filtración con filtros Millex GP-0,22µm previamente centrifugadas a 8.000xg por 10 min a 4°C, que fueron dejadas a -20°C no perdieron su actividad inhibitoria durante el tiempo que se analizó estabilidad.

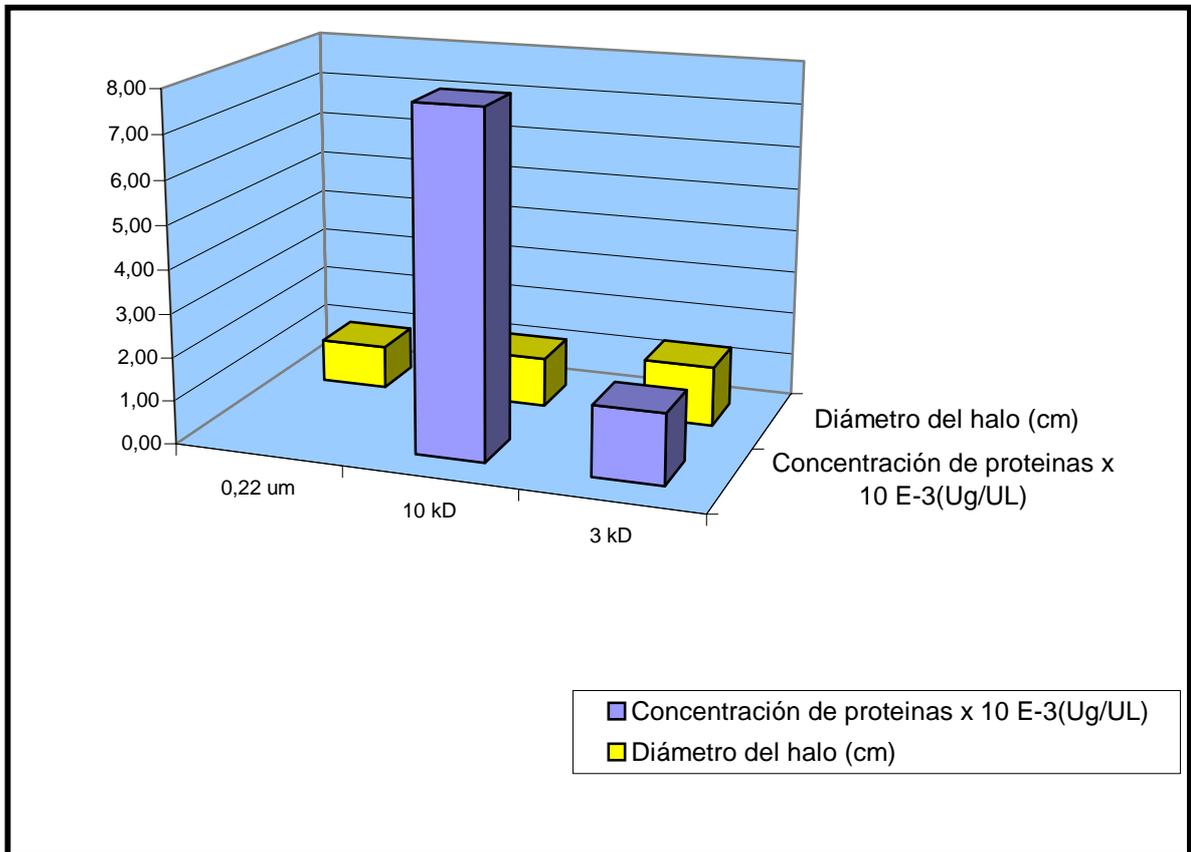


Figura 24. Purificación parcial de metabolito(s) antagonista(s). Relación entre el diámetro del halo y la concentración de proteínas de las fracciones purificadas parcialmente mediante ultrafiltración.



Figura 25. Prueba de antagonismo *in vitro* de la fracción del permeado de la membrana de 3 KDa.

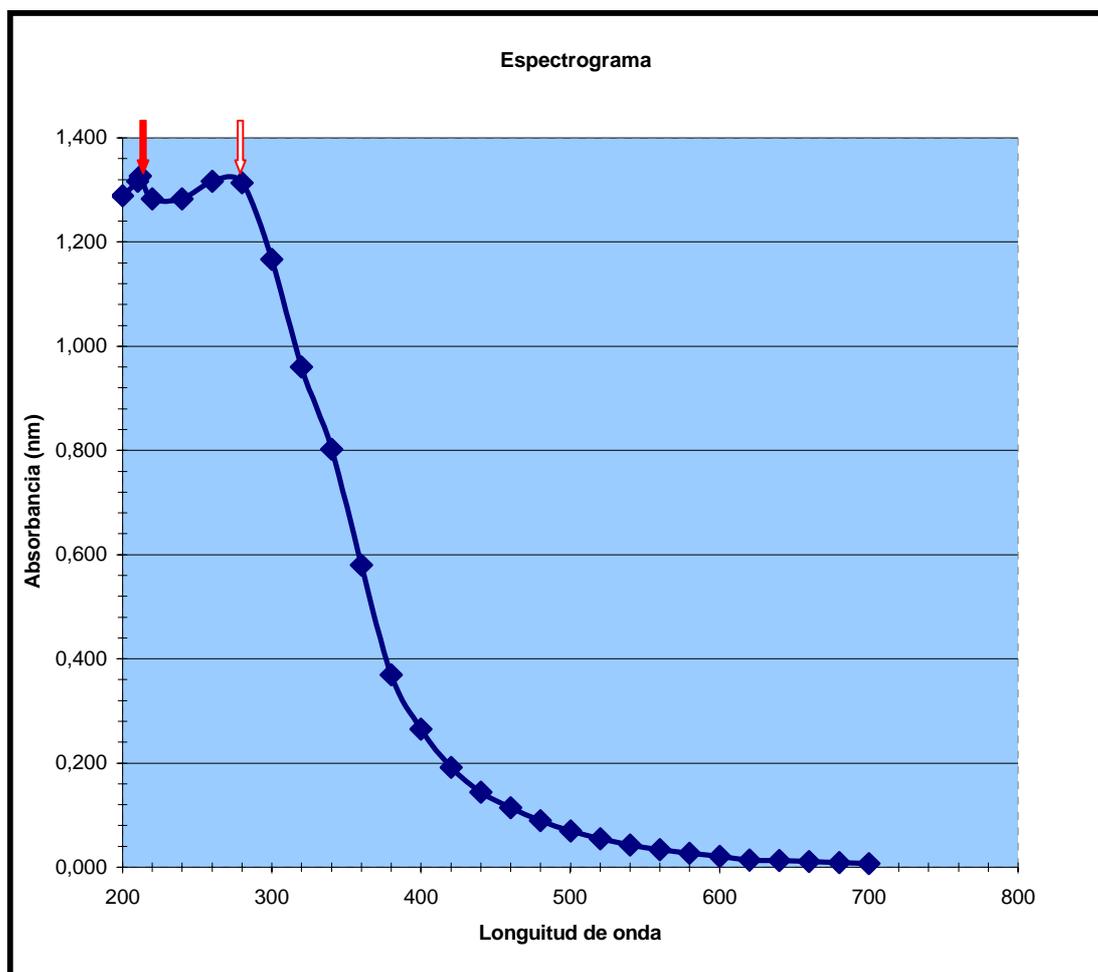


Figura 26. Espectro UV-visible de E.C.U.I. Última fracción obtenida mediante ultrafiltración en la membrana YM-3

5. Discusión

La cala (*Zantedeschia* spp.) flor ornamental cuyo cultivo intensivo resulta de gran interés comercial en países como Nueva Zelanda, Holanda, y Estados Unidos, (Seemann y Andrade, 1999), ha adquirido gran importancia en los últimos dos años en Chile, (ODEPA, 2005).

El cultivo de cala se ve afectado por *E. carotovora*, patógeno que causa pudrición húmeda (Wright, 1998; Snijder y Tuyl, 2002), generando pérdidas hasta del 100% de los cultivos, lo que afecta considerablemente al sector productivo del país (Etcheverría, 2002).

Las presiones económicas y ecológicas, han llevado a las instituciones ejecutoras y financieras a generar alternativas al control químico exclusivo, en la protección de plantas. Dentro de estas alternativas el control biológico es un método relativamente moderno cuyo objetivo principal es el mantener, a través de ciertas prácticas y de la introducción de una biomasa de antagonista, todos los componentes del agrosistema en perfecto equilibrio (Bettiol, 1991)

En la búsqueda y selección de microorganismos como agente de biocontrol, el género *Bacillus* spp. ha resultado de gran eficacia en el control de fitopatógenos (Katz y Demain, 1977). Las bacterias pertenecientes a este género tienen formas de bastón, son Gram positivas, (Sneath, 1989), capaces de producir endosporas que resultan altamente resistentes a condiciones medio ambientales desfavorables (USA, 1997), sintetizan una variedad de metabolitos que ejercen

antagonismo contra hongos y bacterias fitopatógenas (Mc keen *et al.*, 1986; Silosuch *et al.*, 1994; Leifert *et al.*, 1995). En la mayoría de los casos estudiados el mecanismo de acción, mediante el cual se genera el control de estos patógenos, es la producción de antibióticos y otras sustancias de efecto similar.

Bacillus subtilis, es la especie tipo del género *Bacillus* que con mayor frecuencia ha sido informada por su capacidad de producir sustancias antibióticas contra patógenos vegetales. (USA, 1997).

5.1 Características fenotípicas de la cepa BC10

La cepa BC10, utilizada en el presente trabajo fue identificada mediante pruebas bioquímicas convencionales como perteneciente al género *Bacillus*, relacionada taxonómicamente al grupo *subtilis*, no obstante, los resultados obtenidos mediante las pruebas API 20 E y API CH 50 de Bio Merieux determinó que sólo un 59,8% corresponde a *subtilis*. Dentro de las características de la cepa BC10, cabe mencionar, la producción de lecitinasa, enzima capaz de hidrolizar la lecitina de la membrana celular, causando la lisis de estas (Wilson, 2000).

5.2 Afinamiento de las pruebas de antagonismo *in vitro*

Para determinar la capacidad antagonista de él o los metabolitos producidos por la cepa BC10, se utilizó la técnica de la gota sobre césped descrita por Barefood y Klaenhammer (1983), visualizando el efecto inhibitorio a través de "halos de inhibición". En este tipo de ensayos se deben considerar variables como, la facilidad del metabolito de difundir a través del agar, estabilidad del compuesto,

velocidad de crecimiento y la cantidad del microorganismo que se quiere controlar, dado que la interpretación de estos puede conducir a conclusiones erróneas, si no se consideran.

Respecto a la temperatura de incubación para realizar las pruebas de antagonismo *in vitro*, se estableció que 24°C era una temperatura adecuada, ya que a ésta temperatura se prioriza la producción de la sustancia antagonista por sobre el crecimiento, situación que resulta inversa a 32°C, donde el crecimiento del *Bacillus* tiende a invadir la superficie de los medios sólidos (Wilson, 2000; Sneath, 1989)

Al momento de visualizar y verificar el antagonismo *in vitro*, es importante la selección del medio sólido, esto debido a que se pudieron observar claras diferencias de gran significancia en el tamaño del radio externo de inhibición, el cual vario desde 1 mm en agar peptona a ~10 mm en agar con melaza y papa dextrosa, por esta razón los medios sólidos se agruparon en tres categorías según el tamaño y revelado de los halos (nitidez del halo); la primera categoría está constituida por el agar peptona, nutritivo, "plate count" y tripticasa, la segunda, por el agar saboraud y la tercera, agrupa al agar papa dextrosa y otros medios a base de melaza como, MBM_a, MBM-Ca⁺², MBG. Las diferencias observadas en el tamaño del halo, se deberían a que los primeros (agar peptona, nutritivo, "plate count" y tripticasa) son ricos en fuentes de nitrógeno orgánico, aportado en gran parte por las peptonas, extractos de carne y levadura. Sin embargo, presentan muy poca o ninguna fuente de carbono, lo que podría explicar las pequeñas

diferencias observadas entre el agar plate count y tripticasa que poseen una pobre fuente de carbono y un halo levemente mayor en comparación al agar peptona y nutritivo que no tienen fuentes de carbono y presentan halos más pequeños.

Respecto al agar Saboroud, éste presenta buenas fuente de nitrógeno y carbono pero ésta última no se encuentra tan disponible como en el agar papa dextrosa y el resto de su grupo.

Los medios MBM_a, MBM-Ca⁺², MBG y APD fueron los que permitieron visualizar de mejor forma los halos de inhibición, los tres primeros fueron preparados en los laboratorios de microbiología del ICYTAL, en cambio el APD es un medio comercial, certificado por Merk. Por lo mencionado anteriormente, se eligió este último para realizar las pruebas de antagonismo *in vitro*, ya que al realizar innumerables pruebas, la formulación del medio sólido puede variar y agregar un % de error, el cual disminuye al utilizar un agar comercial.

Las claras diferencias observadas en la medición del radio externo de inhibición, puede deberse a las distintas facilidades de los sustratos para ser utilizados por el microorganismo y a la disponibilidad de fuentes de carbono en estos medios sólidos.

Por último, la confrontación de *Bacillus* con *Erwinia* sobre agar manitol y agar papa dextrosa revela la presencia de un doble halo de inhibición, una zona pequeña en donde el daño provocado a *Erwinia* es bactericida y una zona mayor donde el efecto es bacteriostático. Esto podría deberse a que la concentración de la

sustancia antagonista es mayor alrededor de las colonias de BC10 y que al difundir la concentración de esta va disminuyendo en forma proporcional a la capacidad antagonista.

5.3 Estudios preliminares para el crecimiento de la cepa BC10

Los componentes empleados en la industria de la fermentación industrial son generalmente complejos, siendo importante considerar diferentes aspectos como el costo de los mismos, la disponibilidad y la estabilidad en su composición química. Respecto al costo de los nutrientes, estos pueden llegar a representar entre el 10 y el 60 % del total de muchos productos obtenidos mediante procesos de fermentación, por lo que se hace prioritaria la incorporación de constituyentes baratos. (Dale y Linden, 1984 citado por Rehm *et al.*, 1993).

Las materias primas que se utilizan con mayor frecuencia en la formulación de medios a nivel industria son, los granos, melaza, celulosa y suero de queso, entre otras (Ortega, 1998; Shuler, y Kargi, 2002).

De acuerdo a estos antecedentes y a trabajos previos realizados con cepas de *Bacillus* spp, el presente estudio se oriento a la construcción y formulación de medios de cultivos líquidos, que permitieran obtener un alto rendimiento en biomasa empleando materias primas que se utilizan en el sector industrial. Efectivamente, los resultados de los estudios preliminares para el crecimiento de la cepa BC10, mostraron que los medios M5 y M6, a base de melaza y los medios M7 y M8 a base de suero de queso, permitieron obtener fases de latencia muy

cortas, observándose un rápido crecimiento y una alta cantidad de células. Sin embargo, estos últimos para efecto de los estudios a nivel de laboratorio resultan engorrosos. Por el contrario, los medios M1, M2, M3 y M4 presentaron algunos problemas al exhibir tiempos de latencia prolongados, no alcanzando una alta concentración de células, debido a que no poseen todos los macronutrientes y micronutrientes necesarios para el crecimiento de la cepa BC10.

Cabe destacar, que la utilización de estos medios resulta conveniente al proyectarse en un futuro escalamiento industrial, no solo por las características cinéticas si no también por ser de bajo costo.

Respecto a la adición de calcio a los medio de cultivo para modificar la permeabilidad de la membrana (Bernal, 1999) se determinó que su uso es prescindible porque no facilitó la liberación del metabolito o sustancia antagonista. Es más, la adición de calcio a los medios de cultivos líquidos hace difícil la manipulación de las muestras al medir densidad óptica debido a la floculación generada.

Respecto a las condiciones favorables de crecimiento de la cepa BC10, el pH 5,5 no tuvo consecuencias sobre el crecimiento y la producción de la sustancia antagonista. La temperatura tuvo gran relevancia sobre la estrategia de producción debido a la tendencia a esporular de la cepa a temperaturas cercanas a los 4°C.

- **Diferencias morfológicas**

Al observar la morfología al frotis de la cepa BC10 en los distintos medios de cultivo se pudo constatar diferencias significativas en cuanto al tamaño de estas. Según los antecedentes proporcionados por Shuler y Kargi (2002), sería usual comprobar, en los cultivos bacterianos, que cuanto más rico es un medio, y por lo tanto menor es el tiempo de duplicación (t_d), mayor es el tamaño medio de las células.

- **Formación de la “nata o velo”**

Otro aspecto observado desde el principio de esta investigación, fue la formación de una “nata” o “velo” sobre la superficie líquida de los medios de cultivo en reposo luego de transcurridas doce horas sin agitar. Posteriores análisis llevados a cabo mediante microscopía electrónica, permitieron visualizar a los bacilos unidos dentro de un estructurado ecosistema denominado biofilm.

Según lo señalado por Ophir *et al.*, (1994) y O’Toole *et al.*, (1998), los biofilms son comunidades bacterianas incluidas en una matriz de exopolisacáridos producida por las bacterias y adheridas a una superficie viva o inerte. Este modo de estructuración constituyen un modo de crecimiento protegido que permite la supervivencia de las bacterias en un medio hostil como disminución o aumento de la disponibilidad de nutrientes, pH, tensión de oxígeno y temperatura.

El componente del *biofilm* mejor estudiado corresponde a exopolisacáridos, los cuales jugarían un rol importante en la estructura y función de este (Sutherland, 1985).

Otro aspecto a considerar son los mecanismos a través de los cuales las bacterias son transportadas hacia una superficie. Estos incluyen, contacto al azar con el sustrato y entre ellas debido al movimientos de tipo Browniano, sedimentación por diferencias en gravedad específica entre las bacterias y el medio en el que se encuentran, transporte hacia la superficie por el movimiento del medio y transporte activo mediado por actividad flagelar que puede incluir o no quimiotaxis (Van Loosdrecht *et al.*, 1990).

De acuerdo a estos antecedentes, la formación de esta “nata” por la cepa BC10, se explicaría por los movimientos Brownianos que junto a las diferencias específicas de gravedad de las partículas permitirían que algunas de estas flocularan y sedimentaran, a la vez que debido a los movimiento producidos en el medio otras comenzarían a ascender hasta la superficie. Esto ocurriría con la ayuda de aire remanente, de gases y otros volátiles liberados durante la fermentación, los cuales tienden a ascender arrastrando a todos aquellos componentes adheridos a la superficie de sus burbujas. Una vez en la superficie del medio de cultivo, estas células se unirían quedando inmersas en una matriz de exopolisacáridos formando la “nata”, que le permitiría satisfacer las necesidades de oxígeno. Esto sería un modo de crecimiento protegido que permitiría que estas bacterias se mantuviesen en forma activa de crecimiento.

5.4 Cinética de crecimiento

La excesiva latencia, que no volvió a ser observada, puede deberse a que su uso frecuente le permitió mantenerse activa; además de haber tenido siempre la precaución de trabajar con un inóculo fresco.

Los estudios de cinética de crecimiento de la cepa BC10 en medio MBM mostraron una corta fase exponencial con un rápido crecimiento de cuatro a seis horas, alcanzando la fase estacionaria al cabo de las seis a siete horas aproximadamente.

El medio MBM fue elegido para la producción de grandes cantidades de la cepa BC10 al presentar mejores parámetros cinéticos (velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación), esto se debería a que este medio formulado a base de melaza tiene un alto valor nutritivo, aportando un 50,46% de azúcares fermentables y un 53,83% de azúcares reductores, dentro de los cuales encontramos la glucosa, rafinosa y sacarosa, siendo esta última la que se encuentra en mayor concentración (~45%). La melaza, además de ser una buena fuente de carbono de fácil asimilación para el microorganismo, es un alimento rico en vitaminas del grupo B, contiene aminoácidos esenciales y minerales como calcio, sodio, cloro, magnesio, potasio, hierro y cobre. (Bronn, 1985 citado por Rehm *et al.*, 1993).

Otro punto a analizar, es que al medio MBM resulta conveniente agregar una pequeña cantidad de sacarosa en forma de cristales puros, a pesar de que la

melaza se compone en un 45% de sacarosa. Esto se debería a que el microorganismo necesitaría un impulso inicial utilizando un azúcar puro y no con impurezas como los de melaza. Si bien, los objetivos de esta tesis no fue determinar los rendimientos de los sustratos, sería interesante realizar estos estudios en etapas futuras.

Por otro lado al analizar y comparar los resultados obtenidos en los distintos medios de cultivos seleccionados, se observó que la cantidad de biomasa obtenida en el medio MBM era mayor. Esto se debería a que el medio cumple cabalmente las exigencias nutricionales, lo cual se pone de manifiesto con la cantidad de biomasa microbiana obtenida en este medio.

- **Formación de espuma**

La formación de espuma fue un fenómeno claramente observado durante los cultivos de la cepa BC10 en la modalidad Batch de 1L y de 14L, no así en los cultivos en matraces. Si bien este efecto, no se presenta desde el comienzo del cultivo implicó tomar la precaución de proveer suficiente antiespumante al medio de cultivo al inicio de la fermentación.

Por otra parte, las diferencias observadas en la formación de la espuma en las distintas modalidades de cultivo, se debería a que en las fermentaciones llevadas a cabo en los microfermentadores, se introduce aire comprimido por la parte inferior del(los) agitador(es) obligando a los gases a ascender y espumar con las proteínas, enzimas, células y restos celulares adheridos a las burbujas.

5.5 Recuentos celulares

Según los antecedentes obtenidos anteriormente por Ortega (1998) y en la Universidad Católica de Valparaíso, los recuentos celulares de cepas de *Bacillus*, no se pudieron llevar a cabo debido a sucesivos incrementos y reducciones, dando resultados poco lógicos y no repetitivos. Del mismo modo, en este estudio se intentó obtener una relación de UFC/mL en cada etapa de producción de la cepa BC10, sin embargo, fue siempre observable la activación y desarrollo diferencial de las colonias, es decir, bajo las mismas condiciones medio ambientales algunas bacterias pueden reactivarse rápidamente, formando grandes colonias mientras que otras retardan su activación observándose colonias muy pequeñas. Esto estaría relacionado con la capacidad que presenta la cepa antagonista BC10 (*Bacillus* spp.) de formar esporas, característico de la familia *Bacillaceae* a la cual pertenece la cepa referida.

Esta inconveniencia llevó a optar por la realización de los recuentos celulares aproximados utilizando una cámara de conteo (Neubauer), sin embargo, ésta técnica presenta varias limitaciones, entre ellas el hecho que no es método práctico para un gran número de muestras, no es sensible y no distinguen entre las células viables de las no viables.

5.6 Producción de cantidades de antagonista

La densidad óptica obtenida del cultivo en batch de 14 L fue tres veces mayor a la del cultivo batch de litro y 4 veces mayor a la obtenida en matraces agitados, esto

estaría relacionado al hecho de que en los fermentadores de laboratorio se está regulando el pH, la temperatura, el flujo de oxígeno y la agitación en forma automática, en cambio el cultivo en matraces carece de tal control. Por otro lado, el equipo en que se realizaron los cultivos en batch de 14 L permite una mejor aireación y agitación que un sistema batch de L.

5.7 Pruebas de inducción

Mediante las pruebas de antagonismo *in vitro* en las que se enfrentaron alícuotas de los concentrados celulares de la cepa BC10 sobre un césped de *Erwinia*, se evidenció la formación de los “halos de inhibición”, la difusión de uno o más compuestos con actividad biológica contra este fitopatógeno, no obstante los filtrados de los concentrados celulares obtenidos de la fermentación de la cepa BC10 en los distintos medios de cultivo líquidos no mostraron actividad antagonista. Estos resultados coinciden con los de Sadfi *et al.*, 2002, que sugieren, que la producción de la sustancias antagonista es inducida por la presencia del fitopatógeno, dependiendo de las características y condiciones del medio. Más específicamente, un cultivo individual de la cepa antagonista, podría estar produciendo ciertas sustancias que estarían siendo inactivadas o adsorbidas por las células de *B. subtilis*, perdiendo su actividad inhibitoria. De la misma manera, otros autores agregan que la producción de una gran cantidad de lipopéptidos, es dependiente de la composición de los medios de cultivos, donde la regulación catabólica e inducción aparecen generalmente como los mecanismos

que controlan la biosíntesis de lipopéptidos (Yakimov *et al.*, 1995 ; Kluger *et al.*, 1989; Besson y Michel, 1992; Ullrich *et al.*, 1991) .

Por otro parte, según lo señalado por Katz y Demain (1977), la biosíntesis de antibióticos son procesos regulados por mecanismos de exacerbación inducida, como la esporulación. A su vez, Stein (2005), aclara que si bien la esporulación de las bacterias no es un fenómeno obligado para la biosíntesis de antibióticos, se han reportado algunos casos en que la síntesis de éstos está regulada por factores compartidos con los procesos de esporulación. En este aspecto otros autores (Katz y Demain, 1977; Errington, 2003), agregan que tanto la síntesis de antibióticos como la esporulación de las células son procesos controlados por represión catabólica.

Ciertamente, muchos de los autores estudiados concuerdan en que para la biosíntesis de estos lipopéptidos, juega un rol crucial la esporulación, de hecho el rango de tiempo que toman los investigadores para los cultivos de las cepas de *B. subtilis* varían entre las 12 horas a los 6 días. Sin embargo, esto traería ciertas complicaciones al pensar en un futuro escalamiento a nivel industrial, debido a que **procesos productivos tan largos encarecerían los productos finales.**

Si bien, el objetivo de esta investigación no fue comprobar la biosíntesis y liberación de la sustancia antagonista en una fase tardía de crecimiento, por las razones mencionadas en el párrafo anterior, resultaría igualmente en una posibilidad de producción de estos. En tanto que la estrategia propuesta en esta investigación, después de haber comprobado que él o los metabolitos con

actividad antagonista no se producía(n) hasta las 52 horas de cultivo, fue la de insistir en la posibilidad de inducir la producción de estos, dejando completamente de lado la producción en la fase estacionaria tardía.

Es así como, los ensayos de inducción realizados en medio líquido, enfrentando la cepa productora de antagonista con el patógeno *E. carotovora* sonicada mostraron gran efectividad antagónica. Es por ello que junto a los antecedentes bibliográficos obtenidos, se podría sugerir que la producción de este metabolito con actividad biológica está inducida por la presencia de *Erwinia*.

Otro aspecto a determinar, fue la cinética de producción de este metabolito, el cual comienza a ser producido extracelularmente a partir de las cuatro horas de cultivo, es decir, en la segunda mitad de la fase exponencial de crecimiento, obteniéndose una máxima actividad a las ocho horas y comenzando a decaer a las doce horas. Resulta pertinente citar a Gaden (2000), quién hace la diferencia entre tres tipos de metabolitos, los de tipo I, que corresponde a productos asociados al crecimiento y que aumenta en forma proporcional al metabolismo de energía de los hidratos de carbono, los metabolitos tipo II, que son los productos indirectos del metabolismo de hidratos de carbono y los de tipo III que corresponden a los productos que no están relacionados a la oxidación de los hidratos de carbono. Entonces, conforme a Gaden (2000), los resultados obtenidos estarían indicando que la sustancia antagonista producida por la cepa BC10 sería un metabolito tipo II de Gaden, no obstante, los antecedentes que señalan que estas sustancias son metabolitos secundarios que normalmente se producen en una fase tardía de su

ciclo de crecimiento. (Menkhaus *et al.*, 1993; Stein *et al.*, 1996; Duitman *et al.*, 1999).

Por otro lado, en la estrategia de inducción se prefirió utilizar *Erwinia* sonicada y no *Erwinia* viva, debido a que la producción del metabolito por la cepa BC10 se apreció disminuída, lo se debería a que *Erwinia*, al estar activa, competiría con *Bacillus* por los sustratos, retardando el crecimiento y producción de metabolitos.

5.8 Purificación y caracterización parcial del metabolito antagonista

5.8.1 Estrategia de purificación parcial

La recuperación y purificación parcial de los lipopéptidos del caldo de cultivo, es el mayor problema al que se enfrenta la comercialización de estos. Los métodos comúnmente utilizados, involucran la precipitación a pH extremos y extracción con solventes orgánicos (Arima *et al.*, 1968), lo que normalmente conlleva la liberación de otros subcomponentes considerados impurezas o a la formación de intermediarios inactivos (Peypoux *et al.*, 1978 citado por Bonmatin, 2003).

En la búsqueda por desarrollar un método más económico y menos dañino, se encontró que los lipopéptidos pueden ser purificados parcialmente mediante el sistema de ultrafiltración y diafiltración escalonada. Estos sistemas tienen un rendimiento aceptable y, comparados con otros procesos de purificación convencionales, presentan la ventaja de poder separar eficazmente los lipopéptidos de otras macromoléculas, a la vez que minimizan la pérdida de éstos por adherencia a las membranas (Lin Sung-Chyr y Jlang Horng-Jyh, 1997).

Además, el efecto de denaturación es menor comparado con los métodos de precipitación (Deutscher, 1990). Es así como, considerando las razones mencionadas anteriormente, en el presente estudio la estrategia utilizada para la purificación parcial de él o las sustancias antagonistas producidas por la cepa BC10, fueron la ultrafiltración y diafiltración escalonada.

Respecto a la concentración inhibitoria, es posible apreciar que mientras la concentración de proteínas disminuyen drásticamente en cada etapa de la ultrafiltración, los diámetros de los halos se mantienen similares dentro de un mismo rango, lo que estaría indicando que se **ha logrado purificar parcialmente el compuesto**, ya que aún con una baja concentración de proteínas el extracto final (filtradoYM3) ejerce un efectivo antagonismo sobre *E. carotovora*.

5.8.2 Caracterización parcial

Estudios anteriores señalan que los antibióticos peptídicos son pequeñas moléculas de peso molecular que oscilan entre los 300 a 4500 (Bodansky y Perlman, 1969). Además se ha demostrado que específicamente Iturina A es capaz de provocar daños morfológicos severos en eritrocitos humanos, provocando su hemólisis (Aranda *et al.*, 2005). En esta investigación sobre la naturaleza del compuesto producido por la cepa BC10, después de la purificación parcial, se observó que la sustancia activa tenía un peso molecular estimado bajo los 3 kDa y absorbe luz en el espectro UV, lo cual concuerda con las características de los lipopéptidos. Si bien la actividad hemolítica dio negativa,

ésta es una característica importante para algunos tipos de lipopéptidos, como iturina A.

- **Espectro de Absorción**

Por largo tiempo se ha reconocido el potencial de *B. subtilis* para producir antibióticos, siendo predominantes los antibióticos de naturaleza peptídica (Stein, 2005). Respecto al espectro de absorción de estas sustancias, Bernal *et al.*, 2002, informaron de un lipopéptido provenientes de *Bacillus* que absorbe luz a 212 nm. Antecedentes adicionales, señalan que las proteínas en solución, presentan absorbancia máximas en el espectro UV a 280 y 210 nm, donde los aminoácidos que presentan anillos aromáticos como, el triptófano, tirosina, fenilalanina e histidina son la principal razón para la absorbancia a 280 nm, mientras que la absorbancia a 210 nm se debería a los enlaces peptídicos. (Murray, 1990).

Por consiguiente, con el propósito de estudiar el espectro del permeado de la membrana YM-3 (último rango probado que presentó actividad antagonista) se realizó un barrido UV-visible. El espectro obtenido, mostró un pick de absorbancia en la región UV, manteniendo ciertos niveles de absorbancia en el visible. Si se parte del supuesto, que lo más probable sea que el compuesto producido por *Bacillus* fuese de naturaleza peptídica se esperaría, que el espectro no tuviese absorbancia mayores a 310 nm (región donde absorbe el triptófano), por otra parte, analizando la composición aminoacídica de los distintos lipopéptidos aislados de *B. subtilis*, se observa un residuo de tirosina invariable en la posición

2 para el género de iturinas, pero ningún otro residuo aromático (Bonmatin *et al.*, 2003), es por eso que se podría decir que, si el compuesto aislado fuese de naturaleza peptídica la absorción en el espectro UV se debería al residuo de tirosina. Por otra parte, la débil absorción en el espectro visible, indicaría que la fracción obtenida no ha sido totalmente purificada, lo cual se comprueba con un análisis visual donde se sigue notando una leve coloración café (proveniente de la melaza).

5.9 Estudios de estabilidad del formulado líquido

El formulado líquido diseñados a partir de los concentrados celulares, fueron almacenados a 20°C siendo estables al menos por 8 meses, sin embargo, a temperaturas bajas y de congelación con y sin crioprotector éstos esporularon, ya que no se observó actividad antagonista sino hasta recobrar la forma vegetativa. Es importante señalar que si estas muestras son incubadas en sacarosa durante dos horas con agitación tienen idéntica actividad antagonista a la obtenida en los primeros días de almacenamiento.

Por otra parte, la estabilidad del ECI, almacenado a -20°C, persiste durante dos semanas. La poca estabilidad del extracto crudo inducido se podría deber a los cambios bruscos en las condiciones físicas, ya que estas muestras fueron congeladas a -20°C y descongeladas a 45°C.

La poca estabilidad del extracto crudo inducido se podría deber a diversas causas dentro de las se pueden mencionar una variedad de condiciones y procesos que

pudiesen haber conducido a cambios de actividad y de estructura de estos lipopéptidos, como exceso de dilución, exposición a enzimas y/o péptidos degenerativos, oxígeno, cambios físicos o pérdidas de componentes en las sucesivas etapas de purificación y otras condiciones inusualmente rigurosas.

En futuras investigaciones sería crucial definir y estandarizar las condiciones que permitieran mantener la estabilidad del compuesto por más tiempo, ya que este aspecto es de vital importancia cuando se requieren efectuar ensayos de actividad posteriormente (Deutscher, 1990).

5.10 Conclusión

En el contexto de la formulación de un biopesticida efectivo para el control de *Erwinia carotovora*, patógeno causante de la pudrición blanda en cala, es que en ésta investigación se trabajó con la cepa BC10, antagonista natural de *Erwinia* identificada como perteneciente al género *Bacillus*, relacionada taxonómicamente al grupo *subtilis*. Del trabajo con éstas se llegaron a las siguientes conclusiones:

- Al momento de visualizar y verificar el antagonismo *in vitro*, es importante la selección del medio sólido. En ésta investigación se observaron claras diferencias de gran significancia, en el radio externo de inhibición, las que puede deberse a las distintas facilidades de los sustratos para ser degradados y catabolizados por el microorganismo y a la disponibilidad de fuentes de carbono en estos medios sólidos. Es por esto, que se hace imprescindible la utilización de medios como: papa dextrosa o algún otro de su categoría. Respecto a la temperatura de incubación para la realización de estas pruebas, se estableció que 24°C, era una buena temperatura para observar los halos de inhibición.
- Respecto a la cinética de crecimiento de la cepa BC10 en medio MBM, ésta mostró una corta fase exponencial con un rápido crecimiento de cuatro a seis horas, alcanzando la fase estacionaria al cabo de las seis a siete horas aproximadamente. Cabe destacar, que la utilización de un medio a base de

melaza, resulta conveniente al proyectarse en un futuro escalamiento industrial, no solo por las características cinéticas si no también por ser de bajo costo.

- La producción de espuma es un fenómeno claramente observado durante los cultivos de la cepa BC10, por lo que, se debe considerar la incorporación de antiespumante desde el comienzo de la fermentación.
- El cultivo en la modalidad Batch de 14 L permite la producción de mayores cantidades de antagonista, aspecto favorable al pensar en las aplicaciones de campo que se deberán llevar a cabo.
- Los resultados obtenidos a partir de los ensayos *in vitro* permitieron visualizar halos de inhibición, los que estarían indicando que la cepa BC10 es productora de uno o más metabolitos con fuerte actividad antagonista sobre *Erwinia carotovora*. En tanto que, la estrategia de producción en medio líquido de estos compuestos, fue la de inducir la generación y liberación extracelular de estos, dejando completamente de lado la estrategia de producción en la fase estacionaria tardía, ya que estos son **procesos demasiado largo, que encarecería los productos finales.**
- Por otra parte, junto a los antecedentes bibliográficos y los resultados obtenidos a partir de los estudios de inducción de la cepa BC10 en medio líquido, se puede inferir, que la cepa BC10 adecuadamente inducida por la presencia de *Erwinia* (de preferencia sonicada), comienza la liberación de él o los metabolitos antagonistas al medio en la fase exponencial de crecimiento y no en una etapa tardía. En otras palabras, se estaría induciendo a que un

metabolito que “naturalmente” es secundario pasara a ser un metabolito extracelular tipo II según Gaden.

- Dado los antecedentes que existen, es factible pensar que BC10 actúa a través de la producción de una sustancia de naturaleza peptídica o relacionada a ésta, sin excluir la posibilidad de la participación de otros mecanismos de acción como la producción de enzimas como las lecitinasas.
- La ultrafiltración y diafiltración escalona resulta ser un método amigable y económico que permitió la **purificación parcial del compuesto**.
- sobre la naturaleza del compuesto producido por la cepa BC10, se observó que la sustancia activa tenía un peso molecular estimado bajo los 3 kD y absorbe luz en el espectro UV, lo cual concuerda con las características de los lipopéptidos. Si bien la actividad hemolítica dio negativa, ésta es una característica importante para algunos tipos de lipopéptidos, como iturina A.
- Respecto a la estabilidad del concentrado y extractos crudos. los concentrados celulares almacenados a 20°C fueron estables durante 8 meses, sin embargo, a temperaturas bajas y de congelación con y sin crioprotector estos esporularon. Es importante señalar que si éstas muestras son incubadas en sacarosa durante dos horas con agitación tienen idéntica actividad antagonista a la obtenida en los primeros días de almacenamiento.
- Por otra parte, la estabilidad del ECI, almacenado a -20°C, persiste durante dos semanas. La poca estabilidad del extracto crudo inducido se podría deber a los cambios bruscos en las condiciones físicas.

En resumen, el efecto antagónico observado *in vitro* y la estabilidad del concentrado celular permiten que éste formulado líquido sea efectivo contra la infección de *Erwinia* y la proyección de su uso en la agricultura.

➤ **Recomendaciones:**

- Si bien, en la presente tesis no se efectuaron estudios respecto a la biosíntesis de metabolitos con actividad antagonista en fases de crecimiento tardío, sería interesante considerar ésta estrategia en futuras investigaciones para el diseño de biopesticidas con la cepa BC10.
- Realizar análisis de ultraestructuras de las pruebas de antagonismo *in vitro* mediante microscopia electrónica, para indagar el mecanismo mediante el cual la cepa BC10 actúa sobre *Erwinia*.
- Para la producción industrial sería interesante determinar los rendimientos de sustratos, curvas de calibración volumen empaquetado vs. UFC/mL.
- Obtener cantidades del metabolito aislado para concentrarlo y profundizar sobre su naturaleza, realizando análisis de la secuencia aminoacídica, a fin de determinar la estructura de este.
- Por último, respecto al formulado líquido, éste debería ser agitado antes de ser aplicado y diluido convenientemente hasta obtener una concentración de 10^8 , respecto a la forma de almacenamiento y transporte, éste debería mantenerse almacenado en forma séptica en envases plásticos estériles previamente esterilizados y a T° ambiente.

6. Bibliografía

- Ahimou, F., Jacques, P., Deleu, M.(2000). Surfactin and iturin. A effects on *Bacillus subtilis* surface Hydrophobicity. *Enzyme microb. Technol.*, 27, 749–754.
- Aranda. F., Teruel, J., Ortiz, A. (2005). Further aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin A. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1713,51 – 56.
- Arima, K., Kakinuma, A. and Tamura, G. (1968). Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by bacillus subtilis: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 31,488-494.
- Bais, H.P., Fall, R. and Vivanco, J.M. (2004). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *J. Plant Physiol.*, 134, 307–319.
- Baker, K.f., Cook, R.J. (1974). Biological control of plant pathogens. W.H. Freeman, San Francisco: 433p.
- Baker, C.j., Stavely, J.R., Thomas, C.A., Sasser,M., Macfall, J.S.(1983). Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on development of rust pustules on bean leaves. *Phytopathology, St. Paul.*, 73, 1148-1152.
- Barefoot, S. and Klaenhammer, T. (1983). Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*,45, 1808–1811.

- Barras F., F van Gijsegem, and , A K Chatterjee.(1994) Extracellular Enzymes and Pathogenesis of Soft-Rot Erwinia. *Annu.Rev. Phytopathol.* 32, 201-234.
- Baumgart, E., Kluge, B., Ullrich, C., Vater, J. And ziessow, D. (1991). Identification of amino acid substitutions in the lipopeptide surfactin using 2D NMR spectroscopy. *Biochem Biophys Res Commun.*, 177, 998-1005.
- Bernal, G., Illanes, A., Ciampi, L. (2002). Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of Bacillus sp. With antibiotic activity against plant pathogenis agents. *Electron. J. Biotechnol.*, 5, 1-19.
- Besson, F., Peypoux, F., Michel, G., Delcambe, L. (1979). Antifungal activity upon Saccharomyces cerevisiae of iturin A, mycosubtilin, bacillomycin L and of their derivatives; inhibition of this antifungal activity by lipid antagonists. *J. Antibiotics (Tokyo).*, 32(8):828-33.
- Besson, F. and Michel, G. (1992). Biosynthesis of iturin and surfactin by *Bacillus subtilis*: evidence for amino acid activating enzymes. *Biotechnol. Lett.*,14,1013-1018.
- Bettiol,W. (1991). Controle biológico de doença de plantas. Embrapa, Brasília, DF,:388p.
- Blakeman, J., Brodie, I. (1976). Competition for exogenous substrates in vitro by leaf surface micro-organisms and germination of conidia of Botrytis cinerea. *Physiol Plant Pathol.*, 9, 227-239.

- Blakeman, J., Fokkeman, N. (1982). Potencial for biological control of plant diseases on the phylloplane. *Annu.Rev. Phytopathol.*, 20, 167-192.
- Blom, T.J. and Brown, W. (1999). Preplant Copper - based Compounds Reduce Erwinia Soft Rot on Calla Lilys. *Hort technology.*, 9, 51 - 59.
- Bonmatin, J.M., Genest, M., Labbé, H., Ptak, M. (1994). Solution three-dimensional structure of surfactin: a cyclic lipopeptide studied by ¹H-NMR, distance geometry, and molecular dynamics. *Biopolymers.*, 34, 975-986.
- Bonmatin, J., Laprévote, O., Peypoux, F. (2003). Diversity Among microbial cyclic lipopeptides:Iturins and Surfactins. Activity-Sturcture Relationships to desing new bioactive agents. *Comb. Chem. High Throughput Screening.*, 6, 541-556.
- Bortolato, M., Besson, F. and Roux, B.(1997). Inhibition of alkaline phosphataseby surfactin, a natural chelatinglipopeptide from *Bacillus subtilis*. *Biotechnol.Lett.*, 19, 433–435.
- Campell, R. (1989).Biological control of microial plant pathogens. Cambrige Universitty Press, Melbourne Sydney:218p.
- Collmer, A. and keen, N. T. (1986). The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.*,24,383-409.
- Daniels, J.I., Olsha, A.R., Savitz, D.A. (1997). Pesticides and childhood cancers.*Environ.Health. Perspect.*, 105,1068–1077.

- Deacon, J.W.(1983). Microbial control of plant pest and diseases. Aspects of microbiology 7.University of Edinburgh, Van Nostrand Reinhold (UK) Co. Ltd., USA: 88p.
- Deleu, M., Razafindralambo, H., Popineau, Y., Jacques, P., Thonart, P., Paquot, M. (1999). Interfacial and emulsifying properties of lipopeptides from *Bacillus subtilis*. *Colloids Surf. A Physicochem., Eng. Aspects*. 152,3-10.
- Deutscher, M.P.(1990). Guide to Protein Purification : 50-68.
- Duitman, E., Leender, W., Rembold, M., Venema, G.,Seitz, H., Saenger, W., Bernhard, F., Reinhardt, R., Schmidt, M., Ullrich, C.,Stein, T., Leenders, F. and Vater, J. (1999). The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: A multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 96,13294-13299.
- Davies, D., Chakrabarty, M. and Geesey, G. (1993). Exopolysaccharide production in biofilm: substratum ctivation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginos*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59,1181-1186.
- Dye,W. (1969). A taxonomic study of the genus erwinia IV "A typical" erwinias. *NZJ Sci.*, 833-839.
- Emmert, E. and Handelsman, J. (1999), Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiol. Lett.*, 171:1-9.

- Errington, J. (2003). Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat. Rev. Microbiol.*, 1,117-126.
- Etcheverría, P. (2002). Efecto de la densidad de sombra y del mulch en la producción y calidad de flores y túberos de *Zantedeschia hybrida* cv. Mango. Tesis Ingeniero agrónomo, Universidad de la Frontera. 67p
- Feigner, C., Besson, F., Michel, G. (1995). Studies on lipopeptide biosynthesis by *Bacillus subtilis*: Isolation and characterization of iturin-, surfactin+ mutants. *FEMS Microbiol Lett* .,127, 11-15.
- Fuqua, C., Matthew, R., Parsek, E., Greenberg, P. (2001).Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet.*,35, 439-468.
- Gaden, E. (2000). Fermentation process kinetics. *Biotechnol Bioeng.*,67,629-635.
- Genest, M., Marion, D.,Caille, A., Ptak, M. (1987). Modelling and refinement of the conformation of mycosubtilin in solution from two-dimensional NMR data. *Eur. J. Biochem.*,169,389-398.
- Grangemard, I., Peypoux, F., Wallach, J., Das, B., Labbe, H., Caille, A., Genest, M., Maget-Dana., Ptak, M. and Bonmatin, J. (1997). Lipopeptides with Improved Properties: Structure by NMR,Purification by HPLC and Structure–Activity Relationships of New Isoleucyl-rich Surfactins. *J Pept Sci.*, 3, 145-154.

- Grangemard, I.; Wallach, J.; Maget-Dana, R.; Peypoux, F. (2001). Lichenysin: a more efficient cation chelator than surfactin *Appl. Biochem. Biotechnol.* 90,199-210.
- Grau, A., Gomez, J., Peypoux, F., Ortiz, A. (1999). A study on the interactions of surfactin with phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1418,307-19.
- Gu, Xiao-Bo., Zheng, Zong-Ming., Yu, Hai-Qing., Wang, Jun., Liang, Feng-Lai., Liu, Ru-Lin. (2005). Optimization of medium constituents for a novel lipopeptide production by *Bacillus subtilis* MO-01 by a response surface method. *Process Biochem.*, 40, 3196–3201.
- Guder, A., Wiedemann, I. and Sahl, H. (2000), Posttranslationally modified bacteriocins—the lantibiotics. *Biopolymers.*, 55, 62-73.
- Harnois, I., Genest, D., Brochon, J., Ptak, M. (1988). Micellization and interactions with phospholipid vesicles of the lipopeptide iturin A, as monitored by time-resolved fluorescence of a D-tyrosyl residue. *Biopolymers.*, 27,1403-1413.
- Harnois, I., Maget-Dana, R., Ptak, M. (1989). Methylation of the antifungal lipopeptide iturin A modifies its interaction with lipids *Biochimie.*, 71,111-116.
- Hiraoka, H., Asaka, O., Ano, T., Shoda, M. (1992). Characterization of *Bacillus subtilis* RB14, coproducer of peptide antibiotics iturin A and surfactin. *J Gen Appl Microbiol.*, 38, 635–640.

- Hofemeister, J., Conrad, B., Adler, B., Hofemeister, B., Feesche, J., Kucheryava, N. (2004). Genetic analysis of the biosynthesis of non-ribosomal peptide- and polyketide-like antibiotics, iron uptake and biofilm formation by *Bacillus subtilis* A 1/3. *Mol Genet Genomic.*, 272, 363-378.
- Hosono, K. and H. Suzuki. (1983). Acylpeptides, the inhibitors of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase. *J. Antibiot.*, 36, 194–196.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G., Nasser, W. and Reverchon, S. (1996). Regulation of pectinolysis in *erwinia chrysanthemi*. *Annu Rev Microbiol.*, 50, 213-257.
- Isogai, A., Takayama, S., Murakoshi, S., Suzuki, A. (1982). Structures of beta amino acids in antibiotics iturin A. *Tetrahedron. Lett.*, 23, 3065-3068.
- Itokawa, H., Miyashita, T., Morita, H., Takeya, K., Hirano, T., Homma, M., Oka, K. (1994). Structural and conformational studies of [Ile7] and [Leu7]surfactins from *Bacillus subtilis* natto. *Chem. Pharm. Bull.*, 42, 604-607.
- Ji, B.T., Silverman, D.T., Steward, P.A., Blair, A., Swanson, G.M., Baris, D., Greenberg, R.D., Hayes, R., Brown, L.M., Lillemoe, K.D., Schoenberg, J.B., Pottern, L.M., Schwartz, A.G., Hoover, R.N. (2001). Occupational exposure to pesticides and pancreatic cancer. *Am J Ind Med.*, 40, 225–226.

- Kameda, Y., Ouhira, S., Matsui, K., Kanatomo, S., Hase, T. and Atsusaka, T. (1974). Antitumor activity of *Bacillus natto*. V. Isolation and characterization of surfactin in the culture medium of *Bacillus natto* KMD 2311. *Chem. Pharm. Bull.*,22,938–944.
- Katz, E. and Demain, A.L. (1977) The peptide antibiotics of *Bacillus*: Chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriol. Rev.*,41, 449-474.
- Kakinuma, A., H. Sugino, M., Isono, G., Tamura, and Arima, K. (1969). Determination of fatty acid in surfactin and elucidation of the total structure of surfactin. *Agric. Biol. Chem.* 33,973-976.
- Kim,Hee-Sik, Byung-Dae Yoon, Chang-Ho Lee, Hyun-Hyo Suh, Hee-Mock oh, Tohoru Katsuragi, and Yoshiki Tani (1997).Production and Properties of a Lipopeptide Biosurfactant from*Bacillus subtilis* C9. *J. Ferment. Bioeng.*, 4,41-46.
- Kim, K.; Jung, S.Y.; Lee, D.K.; Jung, J.; Park, J.K.; Kim, D.K.; Lee, C.(1998).Suppression of inflammatory responses by surfactin, a selective inhibitor of platelet cytosolic phospholipase A2. *Biochem. Pharmacol.*, 55,975-985.
- Kim, S.B., Shin, B.S., Choi, S.K., Kim, C.K., Park, S.H. (2001). Involvement of acetyl phosphate in the in vivo activation of the response regulator ComA in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett.*, 195,179–183.
- Kluger, B., Vater, J., Salnikow, J. and Eckart, K. (1989). Studies on the biosynthesis of surfactin, a lipopéptide antibiotic from *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *FEBS Letts.*,231,107-110.

- Kuehny, J. S., Holcomb, G. E., Chang, W., Branch, P. C. (1998). Chemical treatments to control *Erwinia* soft rot of calla rhizomes. *HortTechnology*, 8,353-356.
- Kuehny, J.S. (2000). Calla history and culture. *HortTechnology*,.10, 267–274.
- Lang, Siegmund.(2002) Biological amphiphiles (microbial biosurfactants).*Curr Opin Colloid Interface Sci.*, 7, 12-20.
- Latoud, C., Peypoux, F., Michel, G. (1988).Action of iturin A on membrane vesicles from *Saccharomyces cerevisiae*: activation of phospholipases A and B activities by picomolar amounts of iturin A. *J. Antibiotics (Tokyo)*, 41, 1699-1700.
- Latoud, C., Peypoux, F., Michel, G.(1990). Interaction of iturin A, a lipopeptide antibiotic, with *Saccharomyces cerevisiae* cells: influence of the sterol membrane composition. *Can. J. Microbiol.*, 36,384-389.
- Liao, C.H.(1989). Analysis of pectate lyases produced by soft rot bacteria associated with spoilage of vegetables. *Appl. Environ.Microbiol.*, 55,1677-1683.
- Lin, Sung-Chyr. and Jiang Horng-Jyh. (1997). Recovery and purification of the lipopeptide biosurfactant of *Bacillus subtilis* by ultrafiltration. *Biotechnol. Tech.*,11, 413–416.
- Maget-Dana,R., Ptak, M. and Michel,G.(1985).Pore-forming of oturin A, a lipopetide antibiotic. *Biochim Biophys Acta.*, 815, 405-409.

- Maget-Dana, R., Harnois, I., Ptak, M. (1989). Interactions of the lipopeptide antifungal iturin A with lipids in mixed monolayers. *Biochim. Biophys. Acta.*, 981, 309-314
- Maget-Dana, R., Ptak, M. (1990). Iturin lipopeptides: interactions of mycosubtilin with lipids in planar membranes and mixed monolayers. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1023, 34-40.
- Maget-Dana, R., Thimon, L., Peypoux, F. and Ptak, M. (1994). Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the properties of iturin S. *Biochimie.*, 74, 1047-1051.
- Maher, E. and Kelman, A. (1983). Oxygen status of potato tuber tissue in relation to maceration by pectic enzymes of *Erwinia Carotovora*. *Physiol biochem.*, 73, 536-539.
- Márquez, C., Villalobos, C., Pobrete, S., Villalobos, E., García, M. and Duk, S. (2005). Cytogenetic Damage in Female Chilean Agricultural Workers Exposed to Mixtures of Pesticides. *Environ Mol Mutagen.*, 45, 1-7.
- Marty, P., Jouan, B., Bertheau, Y., Vian, b. And Goldberg, R. (1997). Charge density in stem cell walls of *Solanum tuberosum* genotypes and susceptibility to blackleg. *Phytochemistry.*, 44, 1435-1441.
- McAuliffe, O., Ross, R.P., Hillfems, C. (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *Microbiol Rev.*, 25, 285-308.

- McKeen, C., Reilly, C. and Pusey, P. (1986). Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*, 76, 136-138.
- Menkhaus, M., Ullrich, C., Kluge, B., Vater, J., Vollenbroich, D., Kämp, R. (1993). Structural and functional organization of the surfactin synthetase multienzyme system. *J. Biol. Chem.*, 268, 7678-7684.
- Mera, A. (2004). Estudio de prefactibilidad técnico-económico para la comercialización de calas de colores, producidas en la IX Región. Tesis Ingeniero agrónomo, Universidad de la Frontera. 114p
- Mohsen, K., Ebrahim. (2004). Comparison, determination and optimizing the conditions required for rhizome and shoot formation, and flowering of in vitro cultured calla explants. *Sci. Hort.*, 101, 305–313.
- Moyne, A., Cleveland, T., Tuzun, S. (2004). Molecular characterization and analysis of the operon encoding the antifungal lipopeptide bacillomycin D. *FEMS Microbiol Lett.*, 234, 43–49.
- Mulligan, C.N. and Gibbs, B.F. (1990). Recovery of biosurfactants by ultrafiltration. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 47, 23–29.
- Mulligan, C.N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environ. Pollut.*, 133, 183–198

- Nakano, M.M., Zuber, P. (1989). Cloning and characterization of *srfB*, a regulatory gene involved in surfactin production and competence in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.*, 171,5347–5353.
- Neu, T.R. (1996).Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interface. *Microbiol Rev.*,60,151-166.
- Ohno, A., Anot. 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. *J ferment. bioeng.*, 80, 517-519.
- Ophir, T. and Gutnick, D. L. (1994). A papele for exopolysaccharide in the protection of microorganisms from desiccation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60,740-745.
- Ortega, S. (1998). Parámetros microbiológicos para la formulación de medios de cultivo para la producción semindustrial de cepas antagonistas de patógenos vegetales. Tesis Lic. Ing en alimentos. Universidad Austral de Chile, facultad de ciencias agrarias.102p
- Osman, M., Høilandh, Holmsen, H. and Ishigami, Y.(1998).Tuning Micelles of a Bioactive Heptapeptide Biosurfactant via Extrinsically Induced Conformational Transition of Surfactin Assembly Journal of Peptide Science.*J. Peptide Sci.*, 4,449–458.

- O'Toole, G. A. and Kolter, R. (1998). The initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.*, 28,449-461.
- Phae, C.G., Shoda, M. and Kubota, H. (1990). Suppressive effect of *Bacillus subtilis* and its products on phytopathogenic microorganisms. *J. ferment. bioeng.*,69, 1-7.
- Peypoux, F., Guinand, M., Michel, G., Delcambe, L., Das, B. and Lederer, E.(1978). Structure of Iturine A, a Peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*. 17, 3992-3996.
- Peypoux, F., Marion, D., Maget-Dana, R., Ptak, M., Das, B., Michel, G. (1985). Structure of bacillomycin F, A new peptidolipid antibiotic of iturin group. *Eur. J. Biochem.*, 153,335-340.
- Peypoux, F., Bonmantin, J.M., Labbé, H., Das, B., Ptak, M. And Michel, G.(1991). Isolation and characterization of a new variant of surfactin, the [Val7]surfactin. *Eur. J. Biochem.*, 202,101-106.
- Peypoux, F., Bonmantin, J.M., Wallach, J. (1999). Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl Microbiol Biothechnol.*,51,553-563.
- Pérombelon, M.C.M., Kelman, A. (1980). Ecology of the soft rot erwinias. *Annu. rev. phytopathol.*,18, 361–87.

- Pérombelon, M.C.M., Kelman, A. (1987). Blackleg and other potato diseases caused by soft rot erwinias: Proposal for revision of terminology. *Plant Dis.*, 71, 283-285.
- Pérombelon, M.C.M. (2002). potato disease caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. *Plant pathol.*,51: 1-12.
- Petit-Glatron, M.F., Grajcar, L., Munz, A. And Chambert, R.(1993). The contribution of the cell wall to a transmembrane calcium gradient could play a role in *Bacillus subtilis* protein secretion. *Mol Microbiol.*,9, 1097-1106.
- Plummer,J., Welsh, T., Armitage, A. (1990). Stages of flower development and postproduction longevity of potted *Zantedeschia aethiopica* "Childsiana". *HortScience.*, 25, 675–676.
- Quentin, M.J., Besson, F., Peypoux, F., Michel, G. (1982). Action of peptidolipidic antibiotics of the iturin group on erythrocytes. Effect of some lipids on hemolysis. *Biochim.Biophys., Acta* 684,207-11.
- Rehm H. And Reed.(1993).Biotechnology. Products of secondary metabolim.2^o edition, vol 7. VCH a wiley company.728p.
- Roberts D; Boothroyd C. (1975). Fundamentals of plant pathology. San Francisco [Calif.] : W.H. Freeman and Co. Capitulo 2 y 7.

- Ron, E.Z. and Rosenberg, E. (2001). Natural roles of biosurfactants. *Environ. Microbiol.*, 3, 229–236.
- Roongsawang, N., Thaniyara, J., Thaniyara, S., Kameyama, T., Haruki M., Imanaka, T., Morikawa, M., Kanaya, S. (2002). Isolation and characterization of halotolerant *Bacillus subtilis* BBK-1 which produces three kinds of lipopeptides: bacillomycin L, plipastatin, and surfactin. *Extremophiles*. 6, 499-506.
- Sadfi, N., Chérif, M., Hajlaoui, M., Boudabbous, A., Bélanger. (2002). Isolation and purification of antifungal metabolites produced by *Bacillus cereus*. *Ann. Microbiol.*, 52, 323-337.
- Sandrin, C., Peypoux, F., Michel, G. (1990). Coproduction of surfactin and iturin A, lipopeptides with surfactant and antifungal properties of *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Appl Biochem.*, 12: 370–375
- Starr, M., Chatlerjee, A. (1972). The genus *Erwinia*: Enterobacteria pathogenic to plants and animals. *Annu Rev Microbiol.*, 26, 389-426.
- Sedmak and Grossberg. (1977). A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Anal Biochem.*, 1, 544-52.
- Seemann, P., Andrade, N. (1999). Cultivo y manejo de plantas bulbosas ornamentales. En: Cultivo de Cala Valdivia, Universidad Austral de Chile, Facultad de ciencias agrarias (uach). 95-111.

- Shuler, M., Kargi, F. (2002). *Bioprocess Engineering. Basic Concepts*. 2^a Ed. Printice Hall PTR:552p.
- Sneath, Peter H.A.(1989). *Bergy's Manual of Systematic Bacteriology; Endospore-forming Gram-Positive Rods and Cocci*, vol. 2, Section 13; pp. 1104-1139.
- Sip, A., Grajek, W., Boyaval, P. (1998).Enhancement of bacteriocin production by *Carnobacterium divergens* AS7 in the presence of bacteriocin-sensitive strain *Carnobacterium piscicola*. *Int J Food Microbiol.*, 42, 63-69.
- Snijder,.R.and. Tuyl, J. (2002). Evaluation of tests to determine resistance of *Zantedeschia* spp.(Araceae) to soft rot caused by *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora*. *Eur J Plant Pathol.*,108, 565–571.
- Snijder, R. (2004). Genetic of erwinia resistance in *zantedeschia*: impact of plastome-genome incompatibility. Tesis Dr.Universidad de Wageningen.112p
- Smadja, B., Latour, X., Trigui, S., Burini, J.F.,Chevalier, S.,Orange, N. (2004). Thermodependence of growth and enzymatic activities implicated in pathogenicity of two erwini carotovora subspecies (*pectobacterium* spp.). *J. Microbiol.*, 50, 19-27.
- Stein, T., Vater, J., Kruff, V., Otto, A., Wittmann, B., Franke, P., Panico, M., McDonnell, R. and Morris, R. (1996).The multiple carrier model of nonribosomal peptide biosynthesis at modular multienzyme templates. *J.Biol. Chem.*, 271, 15428-15435.

- Stein, T. (2005). MicroReview *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol.*, 56, 845–857.
- Sutherland, J. W. (1985). Biosynthesis and composition of gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides. *Annu. Rev. Microbiol.*, 39, 243-270.
- Thimon, L., Peypoux, F., Wallach, J. and Michel, G. (1993). Ionophorous and sequestering properties of surfactin a biosurfactant from *Bacillus subtilis*. *Colloids Surfaces B*., 1, 57-62.
- Thimon, L., Peypoux, F., Wallach, J., Michel, G. (1995). Effect of the lipopeptide antibiotic, iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells. *FEMS Microbiol Lett.*, 128, 101-106
- Tosato, V., Albertini, A., Zotti, M. (1997). Sequence completion, identification and definition of the fengycin operon in *Bacillus subtilis* 168. *Microbiology.*, 143, 3443-3450.
- Toth, I., Avrova, A. and Hyman L. (2001). Rapid Identification and Differentiation of the Soft Rot *Erwinias* by 16S-23S Intergenic Transcribed Spacer-PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism Analyses. *Appl Environ Microbiol.*, 67, 4070–4076.
- Toth, I., Bell, K., Holeva, M. and Birch, P. (2003). Soft rot *erwiniae*: from genes to genomes. *Molecular plant pathology*, 4, 17-30.

- Touré, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guiro, A. and Thonart P. (2004). Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *J Appl Microbiol.*, 96,1151-1160.
- Tsuge, K., AnoT, Shoda, M.(1996) Isolation of a gene essential for biosynthesis of the lipopeptide antibiotics plipastatin B1 and surfactin in *Bacillus subtilis*YB8. *Arch Microbiol.*,165, 243–251.
- Ullrich, C., Kluge, B., Palacz, Z. and Vater, J.(1991).Cell-free biosynthesis of surfactin, a cyclic lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*, 30,6503-6508.
- Van Loosdrecht, M. C. M., Lyklema, J., Norde, W. and Zehnder, J. B. (1990). Influences of interfaces on microbial activity. *Microbiol. Rev.*, 54,75-87.
- Vass, E., Basson, F., Majer, Z., Volpon, L., Hollosi, M. (2001). Ca⁺²- induced change of Surfactin conformation: A FTIR and circular dichroism study.*Biochem Biophys Res Commun.*, 282,361-367.
- Vater, J., Kablitz, B., Wilde, C., Franke, P., Mehta, N. and Cameotra, S. (2002). Matrix-Assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactans in wole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 islated from petroleum sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68,6210-6219.
- Viel ,J.F., Chalier, B. (1995). Bladder cancer among French farmers: does exposure to pesticide vineyards play a part?. *Occup Environ Med.*,52:587–592.

- Visser, R., Holzapel, W., Bezvidenhout, J. and Katze, J.(1986). Antagonism of lactic acid bacteria against phytopathogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52,552-555.
- Vollenbroich, D., Pauli, G., Ozel, M., Vater, J. (1997). Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63,44-49.
- Volpon, L.,Besson, F., Lancelin. (1999). NMR structure of active and inactive forms of the sterol-dependent antifungal antibiotic bacillomycin L. *Eur. J. Biochem.*, 264,200-210.
- Wei Yu-Hong. And I-Ming Chu. (2002). Mn²⁺ improves surfactin production by *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Lett.*, 24, 479–482.
- Wilson, M. (2000). Microorganismos anaerobios obligados de importancia médica, en Manual de laboratorio microbiología sistémica y clínica. Facultad de Medicina, Instituto de Microbiología Clínica. Universidad Austral de Chile, pp. 98-114.
- Wright, P. (1998). A soft rot of calla (*Zantedeschia* spp.) caused by *Erwinia carotovora* subspecies *carotovora*. *New Zeal J Crop Hort.*, 26, 331-334.
- Wright, P., Burge, G. (2000). Short communication Irrigation, sawdust mulch, and Enhance® biocide affects soft rot incidence, and flower and tuber production of calla. *New Zeal J Crop Hort.*,28, 225-231.

- Wright, P., Burge, G., Triggs, C. (2002). Bacterial soft rot of calla tubers. Effects of cessation of irrigation and time of lifting of tubers on bacterial soft rot of calla (*Zantedeschia* spp.) tubers. *New Zeal J Crop Hort.*,30, 265-272.
- Xu, G.W. and Gross, D.C. (1986). Selection of fluorescent *Pseudomonads* antagonistic to *Erwinia carotovora* and suppressive of potato seed piece decay. *Phytopathology*, 76,414-422.
- Yakimov, M., Timmis, K., Waray, V. and Fredrickson H. (1995).Characterization of a new Lipopeptide Surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface bacillus licheniformis BAS50. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61,1706-1713.
- Yakimov, M. M., Abraham, W.,Meyer, H.,Guilano,L.,Golyshin. (1999).Structural characterization of lichenysin A components by fast atom bombardment tandem mass spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1438,273-80.
- Yan, L., Boyd, K.G., Adams, D.R. and Burgess, J.G. (2003). Biofilm-specific cross-species induction of antimicrobialcompounds in bacilli. *Appl Environ Microbiol.*,69,3719–3727.
- Zuskin, E., Schachter, E.N., Mustajbegovic, J. (1993). Respiratory function in greenhouse workers. *Int Arch Environ Healt.*, 64,521–552.

Páginas web:

- Ivan Walter. 27 octubre 2002. The calla industry. <<http://www.callas.net.nz> > (3 septiembre 2006).
- ODEPA. 2005. Flores de corte. < <http://www.odepa.cl>>. (3 Septiembre 2006).
- Gobierno de Chile Dirección General de Relaciones Económicas Internacionales Prochile. 2002. Análisis del sector bulbos para flores y estudio de mercado de las flores de corte .informe final <http://www.sitec.cl/DOC/flores_corte>. (3 septiembre 2006).
- Dr. Joel Vanneste. HortResearch Science Publications. Biological control of soft rot on calla lily and potatoes. <<http://www.hortnet.co.nz/publications/science/jvann2.htm>> (3 septiembre 2006)
- Snijder R, Tuyl J. ishs acta horticulturae 570: viii international symposium on flowerbulbs. breeding for resistance in *Zantedeschia* spp. (araceae) against soft rot caused by *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* <<http://www.actahort.org>> (3 septiembre 2006)
- Técnicas de estudio de líneas celulares, técnicas de contaje celular <<http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/contajecelular.htm>> (27 de diciembre del 2005).
- USA, EPA. Attachment I—Final risk assessment of *Bacillus subtilis* <http://www.epa.gov/oppt/biotech/puls/pdf/fre009.pdf> (26 Octubre 2006).

ANEXOS

Anexo 1. Identificación cepa BC10 sistema API



Fecha: Lunes, Marzo 28 2005 11:41 am

De: servicioalcliente <servicioalcliente@biomerieux.cl> 

Para: luiscollado@uach.cl

Responder a esta dirección: servicioalcliente <servicioalcliente@biomerieux.cl>

Asunto: RE: Solicitud de Identificacion

Todos los encabezados: [Mostrar Encabezados](#)

Luis:

Junto con saludarle, le adjunto lo solicitado anteriormente:

BUENA IDENTIFICACION CON EL GENERO

Bacillus subtiles 59.8 %
Bacilus Megaterium 20.6 %
B.Licheniformis 11.1 %
B.amyloliquefaciens 6.0 %

Sin otro particular, le saluda muy atentamente,

Elizabeth Diaz M.
Servicio al Cliente
Biomerieux Chile.
6342775 6342093

Anexo 2. Determinación del pH de la tierra

Con el objetivo de determinar el pH del sustrato donde se cultiva cala, se peso 1 g de tierra proveniente de los invernaderos de BOPAR y se mezcló con 2,5 mL de agua destilada estéril, se homogenizó durante 1 h en el vortex y luego se dejó decantar, una vez que la tierra sedimentó se midió el pH de la suspensión.

Anexo3. Preparación de Buffer Fosfato

$$\text{pH} = \text{P}k_a + \text{Log} \frac{[\text{H}]}{[\text{H}_2]}$$

$$5,5 = 7,2 + \text{Log} \frac{[\text{H}]}{[\text{H}_2]} \quad / \text{antilog}$$

$$0,02 = \frac{[\text{H}]}{[\text{H}_2]}$$

$$\frac{[\text{H}_2]}{[\text{H}]} = 50$$

$$\text{PM} \frac{\text{PO}_4}{\text{HPO}_4} = \frac{95}{96}$$

$$\text{PM} \frac{\text{PO}_4}{\text{H}_2\text{PO}_4} = \frac{95}{97}$$

La condición es que $X \leq 8\text{g/L}$ en un cultivo microbiano

$$X = \frac{95}{96}[\text{H}] + \frac{95}{97}[\text{H}_2]$$

$$X = 0,99[\text{H}] + 0,98 \times 50[\text{H}]$$

$$X = 0,99[\text{H}] + 49[\text{H}]$$

$$8 = 50[\text{H}]$$

$$[\text{H}] = 0,16$$

$$[\text{H}_2] = 8$$



$$\frac{228,2}{96} \times 0,16 = 0,38\text{g/L}$$



$$\frac{136,1}{97} \times 8 = 11,23\text{g/L}$$

Anexo 4.Cálculos cultivo continuo

$$t_d = \frac{1,838}{0,787}$$

$$t_d = 1,051 \text{ h}$$

Cálculo de μ :

$$\mu = \frac{\ln 2}{t_d}$$

$$\mu = 0,693 \text{ h}^{-1}$$

Si la dilución crítica $D_c = \mu_{\max} = 0,693 \text{ h}^{-1}$

Para trabajar se eligió dos diluciones críticas $D_c = 0,4$ y $D_c = 0,8$

$$\text{Si } D = \frac{F}{V} \text{ y } V = 600 \text{ mL}$$

Entonces :

$$D_1 = D_c \times \mu_{\max}$$

$$D_1 = 0,8 \times 0,693$$

$$D_1 = 0,554$$

$$D_2 = 0,4 \times 0,693$$

$$D_2 = 0,277$$

Entonces si $F = D \times V$

$$F_1 = 0,554 \times 0,6$$

$$F_1 = 0,332 \text{ L/h}$$

$$F_2 = 0,277 \times 0,6$$

$$F_2 = 0,166 \text{ L/h}$$

Para lograr el estado estacionario es recomendable asegurar que haya transcurrido 3 tiempos de residencia τ

$$\text{Si } \tau = \frac{1}{D}$$

Entonces :

$$\tau_1 = \frac{1}{0,554}$$

$$\tau_1 = 1,806 \text{ h}$$

$$3\tau = 5,4 \text{ h}$$

$$\tau_2 = \frac{1}{0,277}$$

$$\tau_2 = 3,610 \text{ h}$$

$$3\tau = 10,836 \text{ h}$$

Si el flujo medido fue 5,83 mL/min para F1 y 1,66 mL/min durante 60 min para F2.

Entonces las condiciones reales de trabajo fueron:

$$F1_{\text{real}} = 5,83 \frac{\text{mL}}{\text{min}} \times 60 \frac{\text{min}}{\text{h}} \times \frac{1}{1000} \frac{\text{L}}{\text{mL}}$$

$$F1_{\text{real}} = 0,3498 \frac{\text{L}}{\text{h}}$$

$$D1_{\text{real}} = \frac{0,3498 \text{ L/h}}{0,66 \text{ L}}$$

$$D1_{\text{real}} = 0,53 \text{ h}^{-1}$$

$$T_{\text{real}} = 1,886 \text{ h}$$

$$3T = 6 \text{ h}$$

$$F2_{\text{real}} = 1,66 \frac{\text{mL}}{\text{min}} \times 60 \frac{\text{min}}{\text{h}} \times \frac{1}{1000} \frac{\text{L}}{\text{mL}}$$

$$F2_{\text{real}} = 0,0996 \frac{\text{L}}{\text{h}}$$

$$D2_{\text{real}} = \frac{0,0996 \text{ L/h}}{0,66 \text{ L}}$$

$$D2_{\text{real}} = 0,1509 \text{ h}^{-1}$$

$$T_{\text{real}} = 6,63 \text{ h}$$

$$3T = 20 \text{ h}$$

Anexo 5. Preparación de medios sólidos para los ensayos de antagonismo *in vitro*

Con la finalidad de seleccionar un medio sólido para la realización de las pruebas de antagonismo *in vitro* se prepararon tres medios sólidos (descritos en la Tabla) a partir

Composición del medio base

Componentes	Cantidad en g ó mL
melaza	5,00
Sulfato de amonio	1,00
Extracto de levadura	0,40
Agar- agar	7,50
Agua destilada	500

de un medio base, cuya composición se muestra en la siguiente tabla.

Composición de medios sólidos

Medio sólido	Composición	Cantidad g ó mL
MBCa ⁺²	Medio base	100
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,5
MBM _a	Medio base	100
	Manitol	1,0
MBG	Medio base	100
	Glucosa	1.0

Anexo 6. Protocolos de purificación que fueron probados antes de los ensayos de inducción

➤ Protocolo I

Con la finalidad de encontrar la actividad antibiótica en el sobrenadante, se trabajó en la obtención de un extracto crudo, según lo descrito por Bernal (2002).

El concentrado celular se centrifugó por 30 min a 10.000xg, para remover las células. El *pellet* fue descartado y el sobrenadante acidificado con un ácido concentrado (HCl 6M) a un pH 2,5. Luego esta solución se autoclavó a 0,75 atm por 10 min, se centrifugó por 10 min a 8.000xg y se separó el sobrenadante ajustandolo a pH 7. La única variación efectuada al protocolo fue que se ajustó a pH 5,5 ya que ese es el pH del sustrato, donde se cultivan las calas.

Se tomaron alícuotas de los distintos concentrados celulares y del permeado del Spintrex, realizando pruebas de antagonismo en cada etapa del estudio.

Los resultados obtenidos mostraron que el sobrenadante y el *pellet* pierden actividad antagonista al ser ajustados a pH 5,5. Se probó entonces ajustar el sobrenadante a distintos pH en un rango de (1- 9), para determinar si este factor pudiera estar afectando la estabilidad del compuesto. Los ensayos mostraron actividad antagonista sólo en los sobrenadantes bajo pH 3, donde se utilizó como control, medio estéril acidificado con HCl 6M a pH 2,5 del cual también se observó una clara actividad antagonista.

Protocolo 2

Basándose en McKeen (1986) se procedió a centrifugar el concentrado celular por 20 min a 16.500xg, se descartó el *pellet* y el sobrenadante se acidificó a pH 2,5 con HCl concentrado, luego se centrifugó por 10 min a 16.500xg, se extrajo el sobrenadante, y el *pellet* se evaporó con nitrógeno gaseoso, siendo esta última etapa una modificación efectuada en la presente tesis. Finalmente el *pellet* se resuspende en buffer fosfato a pH 7.

Efectuado el protocolo anterior, no se observó actividad antagonista ni en el *pellet* ni en el sobrenadante obtenido de las distintas etapas de este estudio.

El pH fue ajustado inicialmente con una solución de NaOH al 20%, luego se probó ajustar pH con un buffer fosfato de potasio.

➤ Protocolo 3

Extracción de metabolitos utilizando solventes orgánicos basado en Li Jia (2004). Se tomaron 5mL de muestra y se agregaron 2 mL de metanol enfriado en hielo, fue incubado por 10 min a T° ambiente y después colocado a -20°C por 30 min. Luego se agregó 1,6 mL de cloroformo y 640 µl de agua desionizada, se mezcló vigorosamente y se dejó reposar por 10 min antes de ser centrifugada por 25 minutos a 3000 rpm a 4°C. Después de centrifugar se observaron 3 fases; una fase soluble en metanol que se le llamo fase 1, una interfase, que corresponde a los restos celulares y una fase insoluble, fase 3, correspondiente a los fosfolípidos removidos de la membrana.

Se realizaron las pruebas antagonista para todas las fases y claramente en la fase 1 se observó actividad antagonista, la fase 3 mostró inhibición observándose “colonias fantasmas”. Se utilizó como control, el metanol al 100% y el cloroformo, dando actividad inhibitoria.

Se probó entonces evaporando las distintas fases con nitrógeno gaseoso resuspendiendo en agua desionizada estéril, pero al realizar las pruebas antagonista se desarrolló el *Bacillus* dando un halo de inhibición en las tres fases.

➤ **Protocolo 4**

Se tomaron 4 ml de muestra y se centrifugaron por 10 min a 10.000x g a 4°C. El *pellet* se resuspendió en 2 ml de solución A y 2 ml de solución B. La muestra se dividió en 3, la primera se incubó por 1 hora a 37°C y luego 1 hora en hielo, la segunda se incubó a 37°C y la tercera se incubó por 1 hora a 37°C y luego se sonicó durante 1 hora. Todas estas muestras se centrifugaron a 18.000x g por 30 min a 4°C, se extrajo el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en agua peptonada.

Solución A: 50mL de una solución que contiene 5 mL de Tris-HCl pH7.6 y 10 g de sacaros

Solución B: 50mL de una solución que contiene 30mg de lizosima, 0.8372 g de EDTA y 100uL de Triton X-100

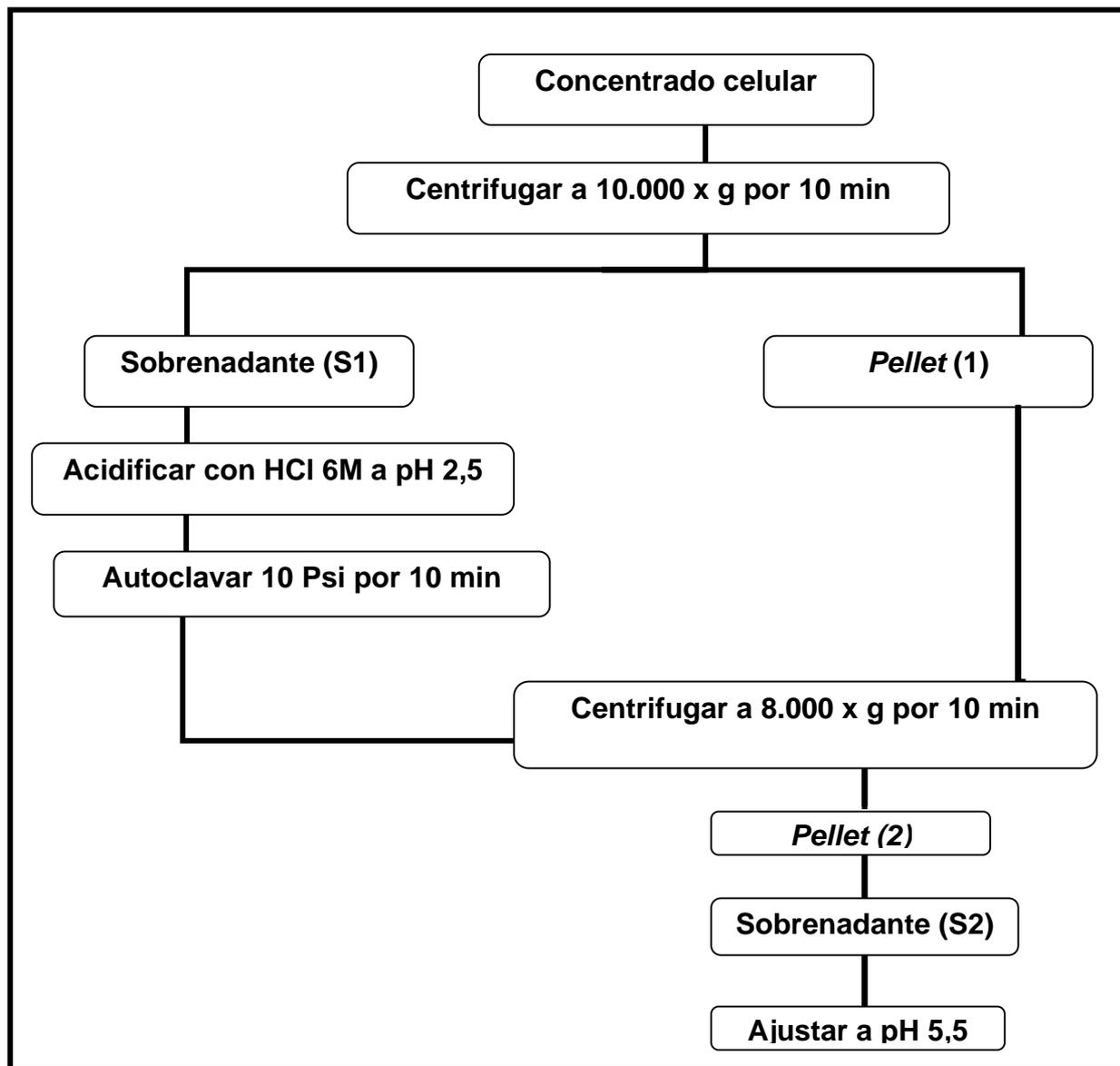


Diagrama de purificación del metabolito con actividad antagonista. Protocolo 1

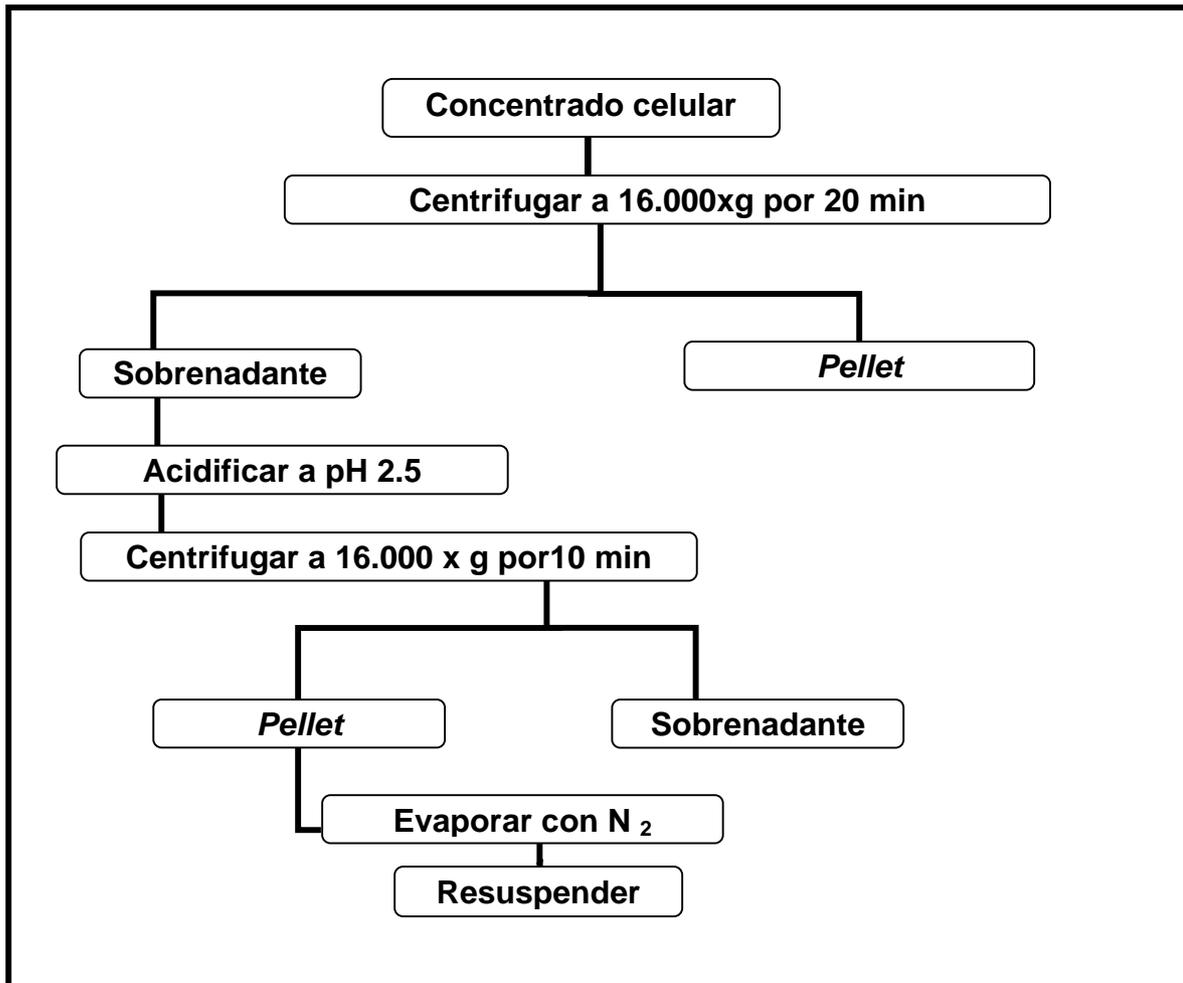


Diagrama de purificación del metabolito antagonista. Protocolo 2.

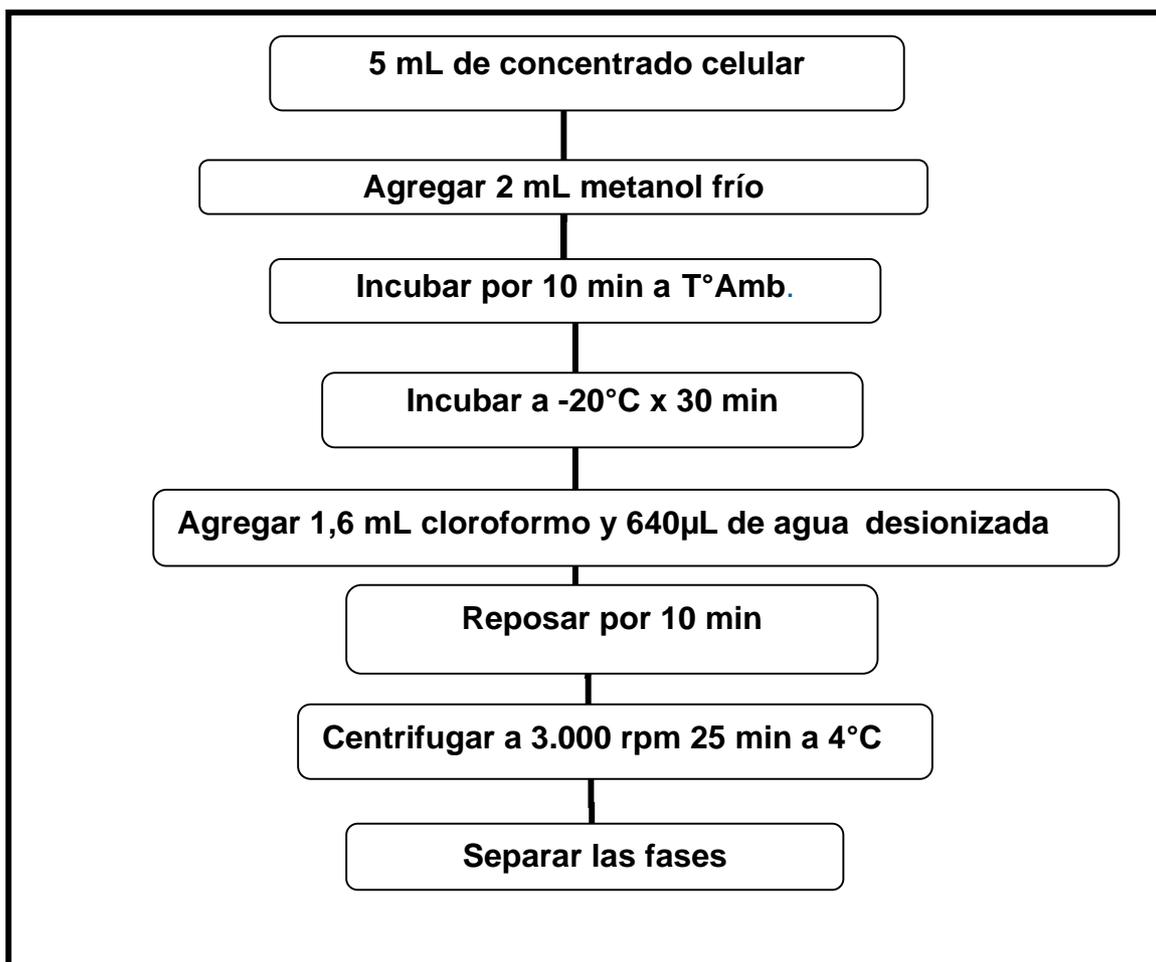


Diagrama de purificación del metabolito antagonista. Protocolo 3.

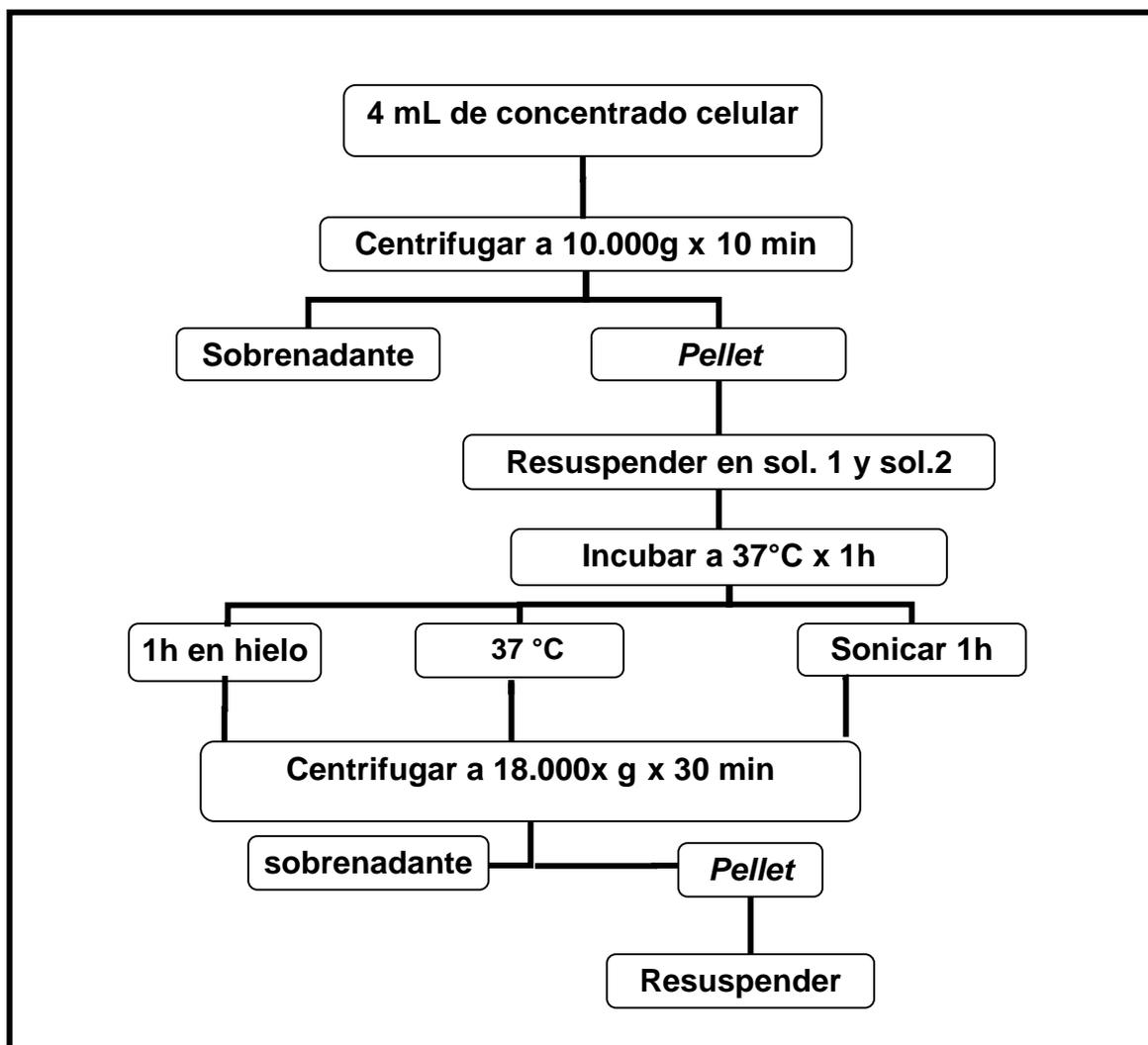


Diagrama de purificación del metabolito antagonista. Protocolo 4.

Anexo 7. Método de Sedmak

7.1 Preparación Ácido clorhídrico (2,2% p/v)

Para la preparación de esta solución se utilizaron 59,27 mL del ácido clorhídrico concentrado (32% p/p y densidad 1,16 kg/L) y se llevó a un volumen final de 1 L. El cálculo se detalla a continuación:

$$\begin{aligned} \% \frac{P}{V} &= 32\% \times 1,16 \text{ Kg/L} \\ \% \frac{P}{V} &= 37,12 \\ C_1 \times v_1 &= C_2 \times V_2 \\ 37,12\% \frac{P}{V} \times X &= 2,2\% \times 1000\text{mL} \\ X &= 59,27 \text{ mL} \end{aligned}$$

7.2 Azul de Coomasiee G250 diluido en HCl

Para preparar la solución colorante ($C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$ PM 854,04 g/mol) 0,06%p/v, se pesaron 0,6 gramos y se disolvieron en el ácido preparado anteriormente, llevándolo a un volumen final de 1 L. Una vez preparada la solución, ésta fue filtrada para remover las partículas en suspensión utilizando el papel filtro Watman N° 1. Para constatar que el reactivo había sido correctamente preparado se midió la absorbancia máxima de la forma *leuko* del colorante, la cual debía encontrarse en el rango de absorbancia 1,3-1,5 a 465 nm. De ser esto efectivo, el colorante sería apropiado para utilizarlo en las determinaciones posteriores. El valor obtenido fue de 1,521 por lo que fue posible emplearla.

7.3 Preparación Suero fisiológico

El suero fisiológico fue preparado a partir de NaCl sólido (PM: 58,5 g/mol), disolviendo 13,1625 gramos en 1500 mL de agua destilada. Como se detalla a continuación.

$$0,15 \frac{\text{g}}{\text{L}} = \frac{x}{1,5 \text{ L}}$$

$$X = 0,225 \text{ moles} \times 58,5 \text{ g/mol}$$

$$X = 13,1625 \text{ g}$$

7.4 Estándar de albúmina

A partir de albúmina de bovino en solución al 5% (Sigma), se preparó una solución diluida. A continuación se determinó la concentración real del estándar preparado por absorciometría a 280 nm utilizando su coeficiente de extinción molar ($44200 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) y su peso molecular que corresponde a 67000 g/mol, resultando finalmente una concentración de 0,7638 g/L.

$$\text{Absorbancia} = \varepsilon \times l \times C$$

$$0,508 = 44200 (\text{cm M})^{-1} \times 1 \text{ cm} \times C$$

$$C = 1,149 \times 10^{-5} \text{ M}$$

$$C = 1,149 \times 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \times 67.000 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

$$C = 0,7698 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

A partir del estándar de concentración 0,7698 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, para preparar el tubo de concentración $10 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$, se tiene lo siguiente:

$$0,7698 \mu\text{g}/\mu\text{L} \times X = 10 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L} \times 500 \mu\text{L}$$

$$X = 6,5 \mu\text{L}.$$

La curva se construyó midiendo la razón de las absorbancias a 595 nm y 465 nm. Se utilizó para ello un espectrofotómetro Genesys 5 que se ajustó a cero con suero fisiológico. El blanco reactivo fue leído como una muestra más y su razón de absorbancia se restó a los valores obtenidos para las muestras.

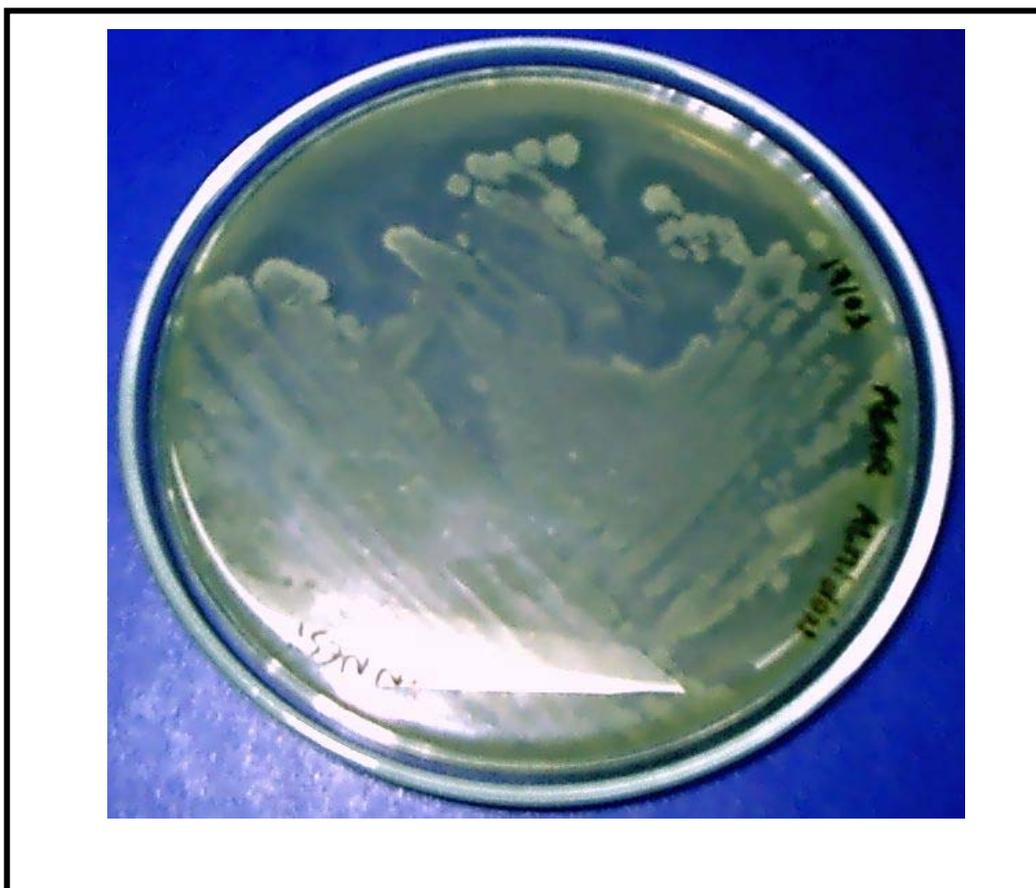
Anexo 8. Composición de la melaza lansa utilizada para la producción de levadura

Collico:

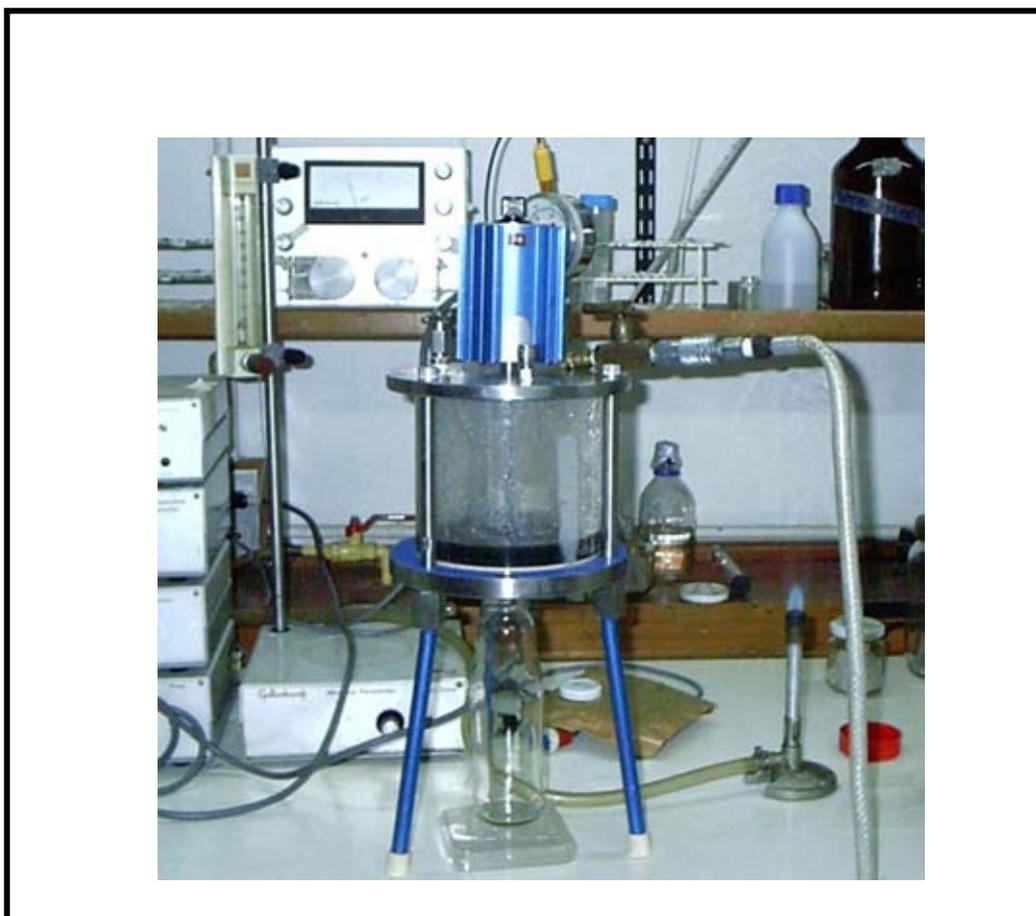
Componentes	Cantidad (%)
Materia seca	82,67
P ₂ O ₅	0,05 (base materia seca)
Nitrógeno	2,20 (Base materia seca)
AAFF(Azúcares fermentables)	50,46
AARR	53,80
SO ₂	0,08
Rafinosa	3.8 P/pt
Sacarosa	43,2-45,4 P/p
Glucosa	0,4 P/p
Cenizas	7,97 (Base materia seca)

Fuente: Levaduras Collico S.A., Valdivia

Anexo 9. Hidrólisis de almidón



Fotografía hidrólisis de almidón. Se observa el crecimiento de la cepa BC10 y alrededor la hidrólisis de almidón.



Anexo 10. Sistema de filtración estacionaria con vibrador Millipore. Se utilizó una membrana 30 kD Amicon, lo cual permitió obtener una gran cantidad de extracto crudo.