



ORIGINAL

Biosíntesis inducida de fengicina y surfactina en una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* con actividad oomicetida sobre zoosporas de *Phytophthora capsica*



Nancy Ley-López^a, José Basilio Heredia^a, Cesar San Martín-Hernández^b,
J. Ramón Ibarra-Rodríguez^a, Miguel Ángel Angulo-Escalante^a
y Raymundo Saúl García-Estrada^{a,*}

^a Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Coordinación Culiacán (CIAD), Culiacán, Sinaloa, México

^b Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México, México

Recibido el 19 de abril de 2021; aceptado el 4 de marzo de 2022

Disponible en Internet el 18 de mayo de 2022

PALABRAS CLAVE

Lipopéptidos;
Extracto crudo;
Oomiceto;
Biocontrol;
Inductores químicos;
Colletotrichum

Resumen La aplicación de metabolitos antimicrobianos biosintetizados por especies de *Bacillus* es una alternativa potencial para controlar *Phytophthora capsici* (*P. capsici*) en hortalizas y podría evitar el uso de productos químicos con acción oomicetida. El objetivo de este estudio fue evaluar el impacto de la adición al medio de cultivo de distintos agentes (ácido glutámico, hierro, celulosa, quitina y células inactivas de *Colletotrichum* spp.) sobre la biosíntesis de lipopéptidos en *Bacillus amyloliquefaciens* KX953161.1 y examinar la capacidad oomicetida de dichos compuestos *in vitro* sobre las zoosporas de *P. capsici*. Los lipopéptidos identificados y cuantificados por cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) en los extractos crudos fueron fengicina y surfactina. El cultivo bacteriano adicionado con células inactivas de *Colletotrichum* spp. demostró la mayor biosíntesis de lipopéptidos: 1.847,02 ± 11,8 µg/mL de fengicina y 2.563,45 ± 18,4 µg/mL de surfactina. Los tratamientos con menor producción de estos lipopéptidos fueron aquellos a los que se añadió hierro (608,05 ± 22,6 µg/mL de fengicina y 903,74 ± 22,1 µg/mL de surfactina) o celulosa (563,31 ± 11,9 y 936,96 ± 41,1 µg/mL, igual orden). El extracto con los lipopéptidos presentó una inhibición del 100% en la germinación de zoosporas de *P. capsici*, se observó enquistamiento, malformaciones en el tubo germinal y degradación celular. Se concluye que los lipopéptidos producidos por *B. amyloliquefaciens* KX953161.1 podrían contribuir al control de *P. capsici*, sin embargo, se requieren más estudios a fin de elucidar el modo de acción biológica de estos compuestos y optimizar el perfil de producción y el rendimiento.

© 2022 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: rsgarcia@ciad.mx (R.S. García-Estrada).

KEYWORDS

Lipopeptides;
Crude extract;
Oomycete;
Biocontrol;
Chemical inducers;
Colletotrichum

Induced biosynthesis of fengycin and surfactin in a strain of *Bacillus amyloliquefaciens* with oomycetocidal activity on zoospores of *Phytophthora capsici*

Abstract A potential alternative to the use of chemical products with oomycetocidal action for the control of *Phytophthora capsici* in vegetables is the use of antimicrobial metabolites, biosynthesized in *Bacillus* species. The objective of this study was to induce the biosynthesis of lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* KX953161.1 by using glutamic acid, iron, cellulose, chitin, or inactive *Colletotrichum* spp. cells. The *in vitro* oomycetocidal effect of the bacterial lipopeptides on zoospores of *Phytophthora capsici* was evaluated. The lipopeptides identified and quantified in the crude extracts by high performance thin layer chromatography (HPTLC) were fengycin and surfactin. The bacterial culture with inactive fungal cells yielded the greatest biosynthesis of lipopeptides, at 1847.02 ± 11.8 and 2563.45 ± 18.4 $\mu\text{g/ml}$ of fengycin and surfactin, respectively and the treatments that obtained lower production of these lipopeptides, were those to which iron and cellulose were added with 608.05 ± 22.6 and 903.74 ± 22.1 ; 563.31 ± 11.9 and 936.96 ± 41.1 $\mu\text{g/ml}$ for fengycin and surfactin, respectively. The lipopeptide extracted showed 100% germination inhibition on zoospores of *P. capsici*, revealing encystment, malformations in the germ tube and cellular degradation. Lipopeptides have the potential to control *P. capsici*; however, the biosynthesis of these lipopeptides requires further study to determine their biological mode of action and optimize lipopeptide performance and profile. © 2022 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

La marchitez del chile causada por *Phytophthora capsici* (*P. capsici*) Leonian es de gran importancia debido a que provoca la muerte y pérdidas significativas a nivel mundial en los cultivos de solanáceas, como pimiento y tomate^{25,28}. En cualquier etapa de crecimiento de las plantas, *P. capsici* puede afectar su desarrollo, a menudo se observa muerte de plántulas aproximadamente a los cinco días después de la infección^{29,52}.

Esta enfermedad es difícil de controlar debido a la rápida reproducción y diseminación de los propágulos infecciosos, lo que incluye la liberación de una gran cantidad de zoosporas (zoosporogénesis) y estructuras latentes del patógeno^{20,49}. Cualquier interrupción en el desarrollo de zoosporas o en la liberación o motilidad de estas disminuye la posibilidad de infección^{19,25}. Por lo tanto, la capacidad de inhibir la formación de esporangios o la liberación de zoosporas de este hongo fitopatógeno, o de afectar su motilidad, puede considerarse un criterio de selección de agentes de control biológico para la supresión de la enfermedad ocasionada por *P. capsici*⁵⁴. Convencionalmente, en el control de esta enfermedad se utilizan productos químicos de acción oomicetocida⁵¹, sin embargo, el uso intensivo de estos productos ha generado efectos no deseados, como toxicidad residual, resistencia de los patógenos y contaminación ambiental²⁴. Consecuentemente, el control biológico es también una alternativa para prevenir el daño colateral causado por los residuos químicos³⁷.

Algunos microorganismos, como las rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR) pertenecientes al orden *Bacillales*, son reconocidos por su actividad antagonista sobre hongos fitopatógenos^{22,42}. *Bacillus*

amyloliquefaciens (*B. amyloliquefaciens*), de la familia *Bacillaceae*, produce resistencia sistémica inducida en la planta huésped y es capaz de generar una variedad de compuestos antimicrobianos^{7,23}. *B. amyloliquefaciens* es eficaz en el control de enfermedades ocasionadas por algunas especies fitopatógenas de oomicetos y hongos, esto se debe a la posible producción de una variedad de compuestos biológicos activos sobre dichos agentes patógenos^{31,39}. Dentro de estos compuestos antimicrobianos se encuentran los lipopéptidos cíclicos, los que incluyen diversos miembros de las familias químicas de la surfactina, la iturina y la fengicina²¹. Sin embargo, no todas las especies pertenecientes al género *Bacillus* producen estos lipopéptidos antimicrobianos como mecanismo de defensa^{39,46}.

La biosíntesis de los lipopéptidos antimicrobianos se lleva a cabo a través la síntesis del péptido no ribosómico (SPNR), la estructura química de estas proteínas cíclicas comprende un ácido graso, que se puede incorporar a la cadena principal del péptido –con 7 a 10 α -aminoácidos– mediante ciclación (a menudo, en el carbono C₂ o C₃) por grupos amino o hidroxilo^{34,46}.

Estas moléculas antimicrobianas pertenecen a un grupo estructuralmente diverso de biosurfactantes y tienen un uso potencial en la agricultura y la industria farmacéutica¹¹. En los últimos años, se ha puesto interés sobre los lipopéptidos por su baja toxicidad, alta biodegradabilidad, elevada compatibilidad ambiental, alta selectividad y actividad específica a temperaturas y pH extremos y en condiciones de salinidad⁴⁵. Estos rasgos hacen que la aparición de resistencia a los lipopéptidos antimicrobianos sea menos probable que la resistencia a los antibióticos convencionales³⁵. Por lo anterior, estas moléculas representan una fuente importante de nuevas estructuras para la biotecnología industrial⁴⁶.

A pesar de que los mecanismos de acción de los compuestos pertenecientes a la familia fengicina son menos conocidos que los descritos para las otras dos familias, se sabe que tienden a interactuar con las capas lipídicas y se asocian, por ende, a cambios en la estructura y permeabilidad de la membrana celular, que son dependientes de las concentraciones¹⁰. Asimismo, los miembros de la familia surfactina pueden interactuar con la capa lipídica de la membrana celular para desintegrar la estructura¹⁷, lo que hace que pierdan funciones biológicas y afecten las actividades vitales de las células de diferentes microorganismos fitopatógenos. Los miembros de la familia iturina no destruyen la estructura de la membrana, pero pueden aumentar su permeabilidad y formar agujeros de conducción iónica que interfieren con el transporte transmembrana de sustancias⁵⁰.

Hoy en día, la producción y disponibilidad del lipopéptido fengicina es limitada, sin embargo, su biosíntesis se encuentra en proceso de investigación. Hasta el momento, son escasos los proveedores que disponen de lipopéptidos como fengicina, iturina, liquenicina y micosubtilina como estándares de alta pureza⁵. Entre estos lipopéptidos, el más accesible es la surfactina. La baja disponibilidad de estos lipopéptidos dificulta la evaluación del potencial industrial o farmacéutico de estos compuestos, por lo que es importante encontrar la forma de incrementar su producción.

La biosíntesis de lipopéptidos difiere entre las cepas bacterianas y puede variar en respuesta a ciertas condiciones. Por ejemplo, se ha reportado que la suplementación de hierro en el medio de crecimiento de las bacterias productoras favorece la síntesis de estos compuestos⁴. Chen et al.⁶ reportaron que los filtrados de *Streptomyces* spp. obtenidos de medio de cultivo con quitina tienen un efecto oomicetida sobre *P. capsici*.

Algunos autores mencionan que, añadiendo diferentes aminoácidos o fuentes de carbono y nitrógeno, como Arg, Gln o Val, es posible aumentar la síntesis del lipopéptido surfactina, y que el L-Glu aumenta la producción de bacilomicina^{30,36}. No obstante, no está claro cómo estos aminoácidos afectan la producción de los lipopéptidos, asimismo, no se conoce bien el efecto de la presencia de microorganismos competidores en la producción de algunos metabolitos secundarios por parte de estas bacterias. Rojo-Bezares et al.³⁸ utilizaron células inactivas de *Lactobacillus* spp. para inducir la producción de bacteriocinas en *Lactobacillus plantarum* y mostraron una actividad antimicrobiana sobre microorganismos pertenecientes a un género distinto al de la especie inductora, lo que refleja las dificultades de los métodos de producción y purificación de estos lipopéptidos.

En estudios previos, reportamos la significativa actividad antimicrobiana de la cepa KX953161.1 de *B. amyloliquefaciens* sobre *P. capsici* *in vitro* y en plantas de tomate y chile²⁹, dicha cepa fue aislada de la rizósfera de plantas de hortalizas. Se desconocen las sustancias bacterianas que afectan el desarrollo del oomiceto *P. capsici*. Asimismo, resulta importante conocer qué sustancias o condiciones promueven la síntesis de los compuestos responsables de la actividad oomicetida. El objetivo de este estudio fue inducir la biosíntesis de lipopéptidos mediante la adición de compuestos químicos inductores y de células inactivas

de *Colletotrichum* spp. al medio de crecimiento de la cepa KX953161.1 de *B. amyloliquefaciens*, la cual demostró actividad oomicetida sobre las zoosporas de *P. capsici*.

Materiales y métodos

Material biológico

La cepa *B. amyloliquefaciens* KX953161.1²⁹ utilizada en este estudio fue aislada de la rizósfera de plantas de *Solanum lycopersicum*. Esta cepa se cultivó en agar nutritivo (AN) a 27°C durante cinco días y se preservó en *buffer* fosfato a 4°C hasta su uso. El patógeno *P. capsici*, aislado del tejido de plántulas de *Capsicum annuum*, se reactivó en agar con V8 a 30-35°C durante 72 h. Por otra parte, se aisló una cepa de *Colletotrichum* spp. del fruto de *Carica papaya* y esta se reactivó en papa dextrosa agar (PDA) durante 10 días a 28-30°C, tras lo que se inactivaron sus células mediante calor (55-65°C).

Productos químicos y materiales

Los productos químicos empleados para preparar el medio de cultivo, los inductores (quitina, celulosa, hierro y ácido glutámico), los solventes utilizados para preparar la fase móvil de la HPTLC (metanol y cloroformo) y los productos necesarios para la extracción se adquirieron en Sigma-Aldrich®, en grado analítico. Se utilizaron placas de cromatografía de capa fina (TLC) de gel de sílice 60 F254 de 20 x 10 cm elaboradas por Merck® (Darmstadt, Alemania). Se emplearon estándares de surfactina (≥ 98%), iturina A (≥ 95%) y fengicina (≥ 90%) de Sigma-Aldrich®, Lipofabrick (Villeneuve d'Ascq, Francia).

Producción de lipopéptidos

Se cultivó la bacteria *B. amyloliquefaciens* KX953161.1 en un matraz (500 mL) con 200 mL de caldo Luria-Bertani (LB), compuesto de peptona de caseína 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y cloruro sódico 10 g/L, ajustado a pH = 7. El cultivo bacteriano se incubó a 30-35°C en un agitador orbital a 150 rpm por 18 a 20 h y alcanzó una concentración de 3x10⁸ UFC/mL, de acuerdo a la escala de McFarland.

El efecto del tipo de inductor se evaluó en un diseño completamente al azar, con seis tratamientos y tres repeticiones por tratamiento, a saber: cultivo sin inductor como control (T1), 4 g/L de ácido glutámico (T2), 0,3 mg/L de hierro (T3), 1 mL de suspensión de células fúngicas inactivas (1x10⁶ células/mL) (T4), 20 g/L de celulosa (T5), 4 g/L de quitina (T6).

Excepto las células fúngicas inactivas, que se agregaron luego de la esterilización del medio de cultivo, los otros inductores se agregaron al medio de cultivo antes de su esterilización, que fue a 115°C por 15 min. La producción de lipopéptidos se indujo agregando 30 mL de un inóculo de *B. amyloliquefaciens* KX953161.1 (3x10⁸ UFC/mL) en frascos Erlenmeyer (2 L) con 750 mL de medio Landy²⁷, compuesto por glucosa 20 g/L⁻¹, ácido L-glutámico 5 g/L, extracto de levadura 1 g/L, K₂HPO₄ 1 g/L, MgSO₄ 0,5 g/L, KCl 0,5 g/L, CuSO₄ 1,6 mg/L Fe₂(SO₄)₃ 0,4 mg/L y MnSO₄ 1,2 mg/L, el

pH inicial se ajustó a 7. Se incubó durante seis días en un agitador orbital horizontal a 180 rpm y 30-32°C.

Extracción de los lipopéptidos

Las células bacterianas fueron separadas del medio de cultivo por centrifugación (HERMLE Z 36 HK, Alemania) a 10.000 rpm durante 12 min, a 4°C. El extracto crudo con los lipopéptidos se obtuvo mediante el método de precipitación ácida del sobrenadante⁴⁵. La acidificación (pH = 2) se realizó con la adición de HCl 6 N. Se dejó reposar por 24 h a 4°C y se centrifugó a 12.000 rpm durante 20 min, a 4°C. El sedimento obtenido se liofilizó (FreeZone Triad Benchtop Freeze Dryer, LABCONCO, E.E. U.U.).

Proteína total

El contenido de proteína del extracto crudo se determinó utilizando el kit de ensayo de Bradford, empleando la curva estándar para el microensayo de proteína Bio-Rad con albúmina de suero bovino (ASB), en concentraciones de 1 a 20 µg/mL. Se usó un espectrofotómetro Varian Cary 60 UV (Australia). Un volumen de 160 µL de la muestra estándar diluida se hizo reaccionar con 40 µL de reactivo de Bradford, se midió la densidad óptica a 595 nm a los 5-20 min.

Identificación y cuantificación de los lipopéptidos cromatografía en capa fina de alta resolución

Los lipopéptidos producidos por *B. amyloliquefaciens* KX953161.1 se identificaron y cuantificaron mediante un análisis de cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC, CAMAG, Muttenz, Suiza), utilizando el software CATS Server, versión 2.5.18072.1, de acuerdo con la metodología descrita por Geissler et al.¹⁴, con ligeras modificaciones. Se sembraron muestras de 20 µL de los extractos liofilizados (bandas de 6 mm) en un equipo automático (TLC Linomat 5, S/N: 220730), manteniendo una distancia de 8 mm desde el borde inferior y 15 mm desde el borde izquierdo. Se utilizó metanol como disolvente de enjuague.

La cromatografía se realizó con una cámara de doble paso de 20 x 10 cm con revelado automático (ADC 2). La muestra se eluyó con la fase móvil cloroformo:metanol:agua (65:25:4; v:v:v). La distancia de migración fue de 60 mm y la saturación de la cámara se ajustó con la fase móvil durante 10 min. Finalmente, la placa se secó con una corriente de aire frío durante 5 min. El análisis de las muestras se realizó utilizando 20 µL por muestra a la placa. La exploración y el registro del densitograma se llevó a cabo en un sistema TLC Scanner 4 (S/N: 220265), con modo de absorción a una longitud de onda de 195 nm. La placa se escaneó a una velocidad de exploración de 20 mm/s, con una resolución de datos de 100 µm/paso y una dimensión de hendidura de 5 x 0,20 mm. Después del desarrollo, las imágenes de la placa se registraron en un sistema de documentación Visualizer 2 (CAMAG). Los espectros de absorbancia de los estándares y de las muestras se escanearon con el Scanner 4 a una velocidad de exploración de 20 mm/s, con una resolución de datos de 1 nm, una dimensión de hendidura de 5 x 0,20 mm y un rango de longitud de onda de 190-366 nm. La cuantificación

de los lipopéptidos identificados a partir de 20 ± 1 mg mL⁻¹ de cada extracto crudo liofilizado se realizó considerando la curva de calibración de cada estándar analítico, con 5 puntos de concentración, entre 100 y 1000 µg/mL.

La ecuación de regresión para el estándar de fengicina fue $Abs = 0,00001 * [fengicina \mu g/mL] + 0,0022$ y mostró una fuerte linealidad ($R^2 = 0,9953$). Para el estándar de surfactina, fue $Abs = 0,00001 * [surfactina \mu g mL^{-1}] + 0,00004$ y también demostró elevada linealidad, $R^2 = 0,9939$, por lo que la cuantificación de lipopéptidos con este método se consideró confiable.

Preparación de estándares

Se prepararon soluciones madres de los estándares de surfactina y fengicina a una concentración de 1 mg/mL en metanol. A partir de estas soluciones, se prepararon las curvas de calibración (100, 300, 500, 700 y 1.000 µg/mL). El análisis por HPTLC se realizó con 10 µL de cada concentración en la placa, para proporcionar un intervalo de linealidad de 100 a 1.000 µg.

Pruebas de germinación de zoosporas

Se evaluó la inhibición de la germinación de zoosporas de *P. capsici* (20 zoosporas µL⁻¹) en portaobjetos cóncavos, utilizando el extracto liofilizado con los lipopéptidos producidos por *B. amyloliquefaciens* KX953161.1 (5 mg/mL de agua destilada estéril). En cada cavidad del portaobjeto, se colocó 20 µL de suspensión de zoosporas de *P. capsici* y 10 µL de la suspensión de lipopéptidos. Se cubrió con un cubreobjetos para prevenir la evaporación y se mantuvo bajo observación a 25-27°C durante 12 h. La inhibición en la formación de esporangios se determinó usando discos de 5 mm de agar con micelio de cinco días de crecimiento, estos se colocaron en cajas de Petri (10 x 10 cm) con 10 mL de agua destilada y se incubaron durante 48 h a 28-30°C. Para inducir la liberación de zoosporas del esporangio, se incubó a 4°C por 30 min²⁶. En el testigo, se repitió el procedimiento anterior, pero sin aplicar la suspensión de lipopéptidos. En estos bioensayos, se registró el porcentaje de inhibición germinativa de zoosporas contabilizando 100 zoosporas en cada cavidad con la ayuda de un microscopio óptico (Carl Zeiss AXIO Imager.A2) con cámara integrada (AxioCam ERc5s), con los objetivos 10x y 40x. El experimento se realizó por triplicado.

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completo al azar para determinar el contenido total de proteínas (en mg/mL) y la cantidad de lipopéptidos (en µg/mL) producida por *B. amyloliquefaciens* KX953161.1. Para ambos análisis, se consideró un solo nivel representado por una concentración del inductor por tratamiento. Los resultados se examinaron mediante análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey para la comparación de medias ($p \leq 0,05$) con el software Minitab 18.

Tabla 1 Contenido proteico en el extracto crudo de cultivos de *Bacillus amyloliquefaciens* KX953161.1 en presencia de distintos inductores

Tratamiento	Inductor	Proteína (mg/mL)
T1	Control	1,56 d
T2	Acido glutámico	2,06 c
T3	Hierro	0,33 f
T4	Células inactivas (<i>Colletotrichum</i> sp.)	4,07 a
T5	Celulosa	0,43 e
T6	Quitina	2,92 b

Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

Resultados

Contenido proteico en el extracto crudo

La concentración proteica en los extractos crudos producidos por *B. amyloliquefaciens* KX953161.1 con distintos inductores se determinó mediante la prueba de Bradford y se reportó en mg/mL. El tratamiento con células de *Colletotrichum* spp. inactivadas mostró una concentración proteica de 4,07 mg/mL, valor superior a la del tratamiento control (1,56 mg/mL). La menor concentración proteica se detectó en el tratamiento al que se le agregó hierro, esta fue de 0,33 mg/mL (tabla 1).

Identificación de los lipopéptidos por HPTLC

Los extractos crudos y los estándares analíticos (fengicina, surfactina e iturina) se aplicaron en la misma placa para HPTLC. Los extractos crudos mostraron diferentes fracciones en distintos niveles de migración, correspondientes a distintas moléculas de lipopéptidos (fig. 1A) de acuerdo al R_f obtenido respecto de los valores de los estándares. Los cromatogramas de los extractos crudos mostraron tres zonas separadas y tres picos definidos, el primer pico con un valor de $R_f = 0,09$, el segundo con $R_f = 0,17$ y el tercero con $R_f = 0,52$ (fig. 1A-1). El primer y el tercer pico de la muestra coincidieron con los R_f de los estándares de fengicina y surfactina, respectivamente (fig. 1A-2 y 4), mientras que el segundo pico de la muestra no coincidió con el estándar de iturina, con un $R_f = 0,24$ (fig. 1A-3).

Los espectros de absorbancia de los picos de los estándares se compararon con los de la muestra en un intervalo de longitud de onda de 190 a 366 nm. Para el primer pico de la muestra se obtuvieron tres lecturas, con máximos de absorbancia a 189, 225 y 280 nm (fig. 1B), que coincidieron con los máximos de absorbancia del estándar de fengicina, con un coeficiente de correlación de 0,9933 (tabla 2). En cuanto al tercer pico, su espectro se comparó con el del estándar de surfactina (fig. 1C): en ambos solo se observó una lectura en sus máximos de absorbancia, con un coeficiente de correlación de 0,9969 (tabla 2). El segundo pico varió en el espectro del estándar de iturina; el compuesto de la muestra analizada solo obtuvo dos máximos de absorbancia, mientras que la iturina presentó tres máximos (202, 228 y 281 nm) (fig. 1D) y entre ambos compuestos se halló un coeficiente de correlación bajo, de 0,1785 (tabla 2).

Concentración de lipopéptidos en los extractos crudos

El tipo de inductor evaluado afectó ($p = 0,05$) la biosíntesis de lipopéptidos en *B. amyloliquefaciens* KX953161.1. La mayor producción, tanto de fengicina como de surfactina, se obtuvo con el tratamiento de células inactivas del hongo *Colletotrichum* spp. ($1847,02 \pm 11,8 \mu\text{g/mL}$ y $2563,45 \pm 18,4 \mu\text{g/mL}$, respectivamente). Muy cerca de este nivel de producción estuvieron los tratamientos con quitina y ácido glutámico como inductores. En el tratamiento control, se observaron concentraciones de $1.588,74 \pm 28,2 \mu\text{g/mL}$ y $1.519,5 \pm 33,0 \mu\text{g/mL}$ de fengicina y surfactina, respectivamente. El tratamiento con celulosa dio como resultado una menor producción de fengicina ($563,31 \pm 11,96 \mu\text{g/mL}$). De modo similar, el tratamiento con hierro redujo la biosíntesis de surfactina ($903,74 \pm 22,1 \mu\text{g/mL}$) (tabla 3).

Efecto del extracto crudo sobre la germinación de zoosporas

En la evaluación del efecto de los extractos crudos liofilizados aplicados directamente sobre la suspensión de zoosporas de *P. capsici*, se observó un impacto sobre la motilidad y la germinación. Con todos los extractos se observó un comportamiento similar: inmediatamente después de ser agregados (0,5-2 min), los extractos provocaron una reducción notable de la motilidad. En solo minutos causaron lisis de las esporas (fig. 2D). El tratamiento con células fúngicas inactivas exhibió una actividad inmediata de degradación estructural de las zoosporas (fig. 2E) y una inhibición germinativa de zoosporas del 100% (fig. 2C).

En los tratamientos que llevaron a concentraciones bajas de lipopéptidos se observó la detención de la motilidad en la mayoría de las zoosporas y las zoosporas que aún presentaban motilidad exhibían un movimiento variable, lento o de manera circular, que por último cesaba y derivaba en el enquistamiento (fig. 3C y D). Bajo este tratamiento, las zoosporas que lograron germinar mostraron una malformación del tubo germinativo (abultamiento anormal o degradación de ápices hifales) (fig. 2B). Por su parte, las zoosporas control, a las que no se les aplicó la suspensión del extracto crudo, mostraron una motilidad normal por horas y tuvieron una germinación completa (fig. 3A y B).

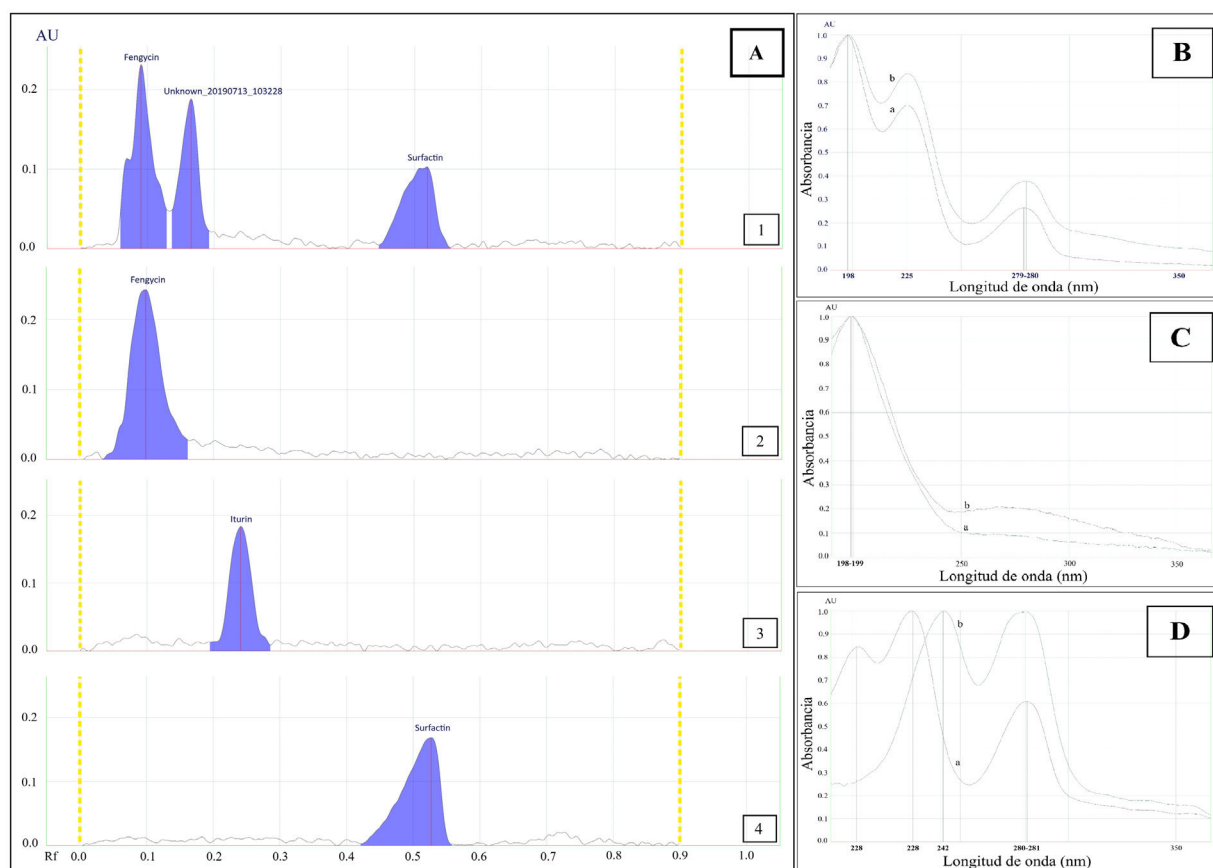


Figura 1 (A) Análisis por HPTLC del extracto crudo de cultivos de *B. amyloliquefaciens* KX953161.1. (A-2) Muestra del estándar de fengicina. (A-3) Muestra del estándar de iturina y (A-4) muestra del estándar de surfactina. Todos los estándares se prepararon a una concentración de 2,5 mg/L; el volumen sembrado fue 5 μ L; para el desarrollo se empleó la fase móvil clorofor:metanol:agua (65:25:4, v:v:v) a una distancia de migración de 60 mm. (B, C y D) Comparación de espectros UV; espectro del estándar de fengicina, surfactina e iturina (a), y del primer, tercer y segundo compuesto detectado por HPTLC en el extracto del cultivo de *B. amyloliquefaciens* KX953161.1 (b).

Tabla 2 Máximos de absorbancia del extracto crudo de cultivos de *Bacillus amyloliquefaciens* KX953161.1 y de los estándares analíticos

Max. Abs. [λ , nm]	Analitos					
	Estándar (fengicina)	Compuesto 1	Estándar (iturina)	Compuesto 2	Estándar (surfactina)	Compuesto 3
Pico 1	189	189	202	242	198	199
Pico 2	225	225	228	280	-	-
Pico 3	279	280	281	-	-	-
Correlación	0,9933	0,1785	0,9969			

Discusión

El control de la enfermedad ocasionada por el oomiceto *P. capsici* ha sido un desafío, principalmente en hortalizas, por los efectos secundarios resultantes del uso desmedido de productos químicos⁴⁸. Una posible alternativa para el control de *P. capsici* en hortalizas es el uso de *Bacillus* spp., por el efecto de sus metabolitos^{32,52}.

Algunas especies de *Bacillus* presentan adaptación a entornos ambientales adversos, además, secretan metabolitos secundarios antagonistas, como proteínas, lípidos,

polisacáridos y péptidos¹³. En el presente estudio se comprobó la producción de lipopéptidos de *B. amyloliquefaciens* KX953161.1 en presencia de distintos inductores, y se demostró su capacidad para inhibir la germinación de zoosporas de *P. capsici*.

La síntesis de compuestos antimicrobianos por cepas de *Bacillus* ha sido descrita en distintos estudios; los antibióticos de naturaleza lipopeptídica más estudiados en biocontrol son iturina y surfactina^{21,40}. La búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos de origen biológico es lenta en comparación con el ritmo de crecimiento de los casos

Tabla 3 Cuantificación de la producción de surfactina y fengicina por *Bacillus amyloliquefiens* KX953161.1 en presencia de distintos inductores

Tratamientos	Concentración (µg/mL)	
	Fengicina	Surfactina
Ácido glutámico	1.690,07 ± 15,3 b	1.646,22 ± 24,9 c
Quitina	1.709,04 ± 13,6 b	2035,2 ± 34,0 b
Hierro	608,05 ± 22,6 d	903,74 ± 22,1 e
Células inactivas (<i>Colletotrichum</i> sp.)	1.847,02 ± 11,8 a	2563,45 ± 18,4 a
Celulosa	563,31 ± 11,9 d	936,96 ± 41,1 e
Control	1.588,74 ± 28,2 c	1.519,5 ± 33,0 d

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

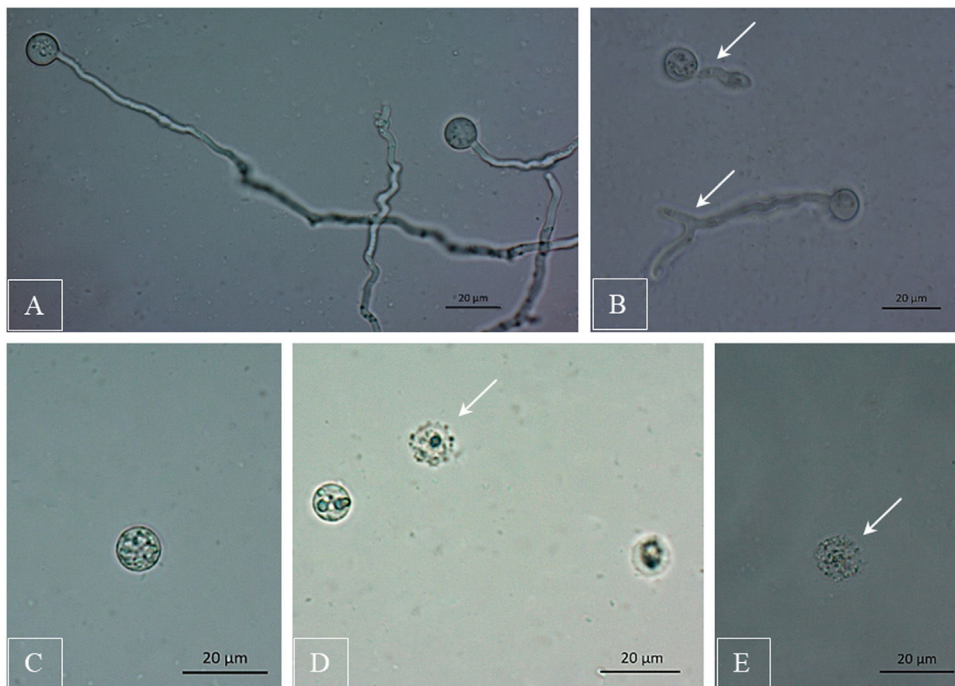


Figura 2 Efecto del extracto crudo producido por *B. amyloliquefaciens* KX953161.1 en la germinación de zoosporas de *P. capsici*. (A y B) Se advierte la germinación de zoosporas con tubo germinal largo, sin ramificar, en ausencia de extracto. (C y D) Se observa la inhibición germinativa de zoosporas en presencia del extracto crudo. Las imágenes fueron tomadas bajo microscopio, con objetivo de 10× en campo claro.

de infección ocasionados por fitopatógenos, por lo tanto, es relevante la evaluación de nuevos compuestos antifúngicos eficientes, seguros, no tóxicos y con menor tendencia a generar resistencia.

En nuestro estudio, detectamos tres compuestos por cromatografía HPTLC, dos de los cuales se identificaron como fengicina y surfactina (fig. 1). Los resultados del cromatograma se compararon con los valores de R_f de los estándares analíticos de los tres compuestos; sin embargo, el compuesto correspondiente al pico 2 no coincidió con el valor de R_f del estándar de iturina (fig. 1A-1 y 3), al seguir la metodología de Geissler et al.¹⁴, quienes reportaron cromatogramas similares de HPTLC para la identificación y cuantificación simultánea, con valores de R_f para fengicina y surfactina de 0,07 y 0,44, respectivamente.

Se obtuvo una correlación mayor de 0,99 para los compuestos de los picos 1 y 3 con los estándares de fengicina y surfactina, mientras que la correlación del compuesto 2 con el estándar de iturina fue de 0,1785. Para que un compuesto se considere similar al del estándar, la correlación debe ser igual o mayor de 0,90^{2,3,33}. Por tal razón, el compuesto del pico 2 detectado en la muestra no corresponde al lipopéptido iturina. Será necesario identificarlo por un método distinto al utilizado en este estudio.

En investigaciones previas en las que se utilizó espectrometría de masas de tiempo de vuelo de ionización/desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF), se reporta que *B. amyloliquefaciens* produce diversos lipopéptidos, como bacilomicina, flagelina, mersacidina, pliplastina e iturina^{18,31}, y se menciona la dificultad que existe en la

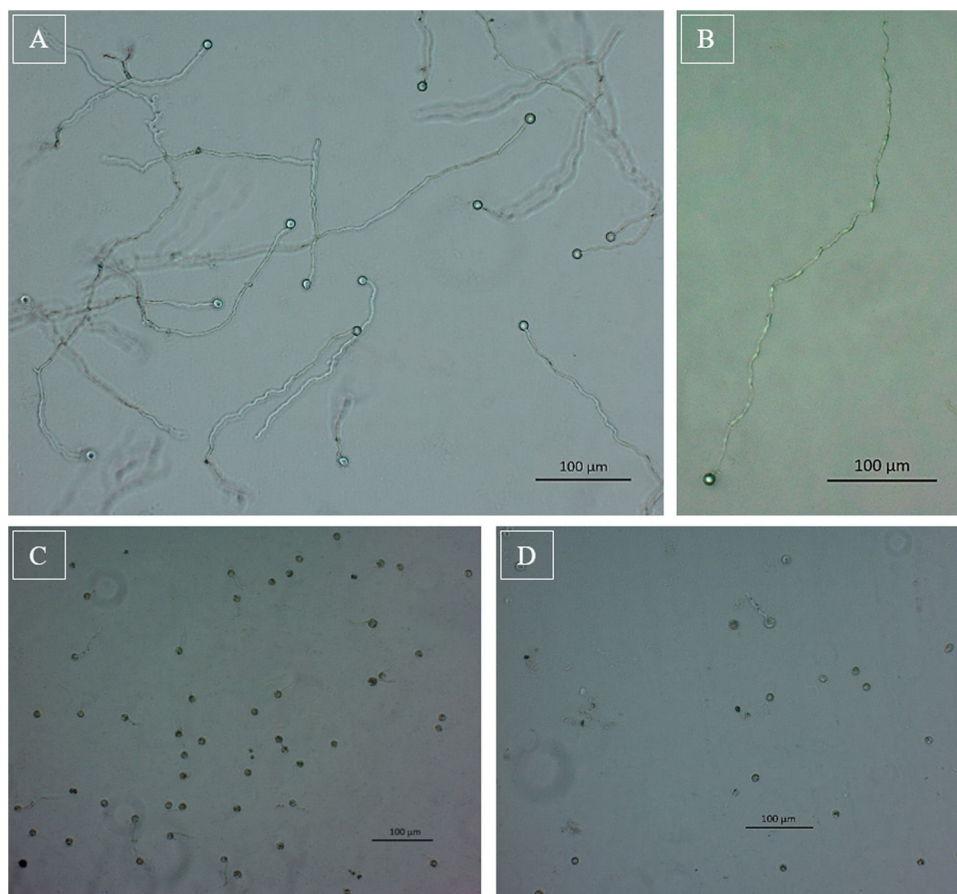


Figura 3 Efectos del extracto crudo producido por *B. amyloliquefaciens* KX953161.1 sobre la morfología y la germinación de zoosporas de *P. capsici*. (A) Zoosporas germinadas en ausencia del extracto. (B) Tubo germinativo anormal. (C) Zoosporas sin geminación (enquistadas). (D y E) Las paredes de la zoospora de *P. capsici* se lisaron al momento del contacto con el extracto crudo que contenía los lipopéptidos producidos por *B. amyloliquefaciens* KX953161.1. Las imágenes fueron tomadas bajo microscopio, con objetivo de 40× en campo claro.

caracterización de estas moléculas, por su baja producción y dificultad para la purificación.

La modificación del medio de cultivo es una de las posibles estrategias para mejorar la biosíntesis de lipopéptidos antimicrobianos. Esto consiste en agregar en la mezcla fuentes de carbono a base de azúcar y nitrógeno^{1,12,21}. Además, algunos carbohidratos mejoran la formación de metabolitos bioactivos y la actividad enzimática⁵³ dado que las proteínas de señalización afectan directa o indirectamente la síntesis de los lipopéptidos^{44,47}. En este sentido, el uso de un nutriente o un inductor adecuado en el medio de cultivo estimula a la bacteria a aumentar la biosíntesis de metabolitos secundarios.

En este estudio, la mayor síntesis de lipopéptidos se obtuvo en el tratamiento con células inactivas del hongo *Colletotrichum*, seguido de los tratamientos con quitina y ácido glutámico, que resultaron superiores con respecto al control. Sin embargo, en los tratamientos con hierro y celulosa se obtuvo baja producción de lipopéptidos. Aunque se ha reportado que la presencia de hierro en el medio de cultivo favorece la síntesis de lipopéptidos⁴, en nuestro estudio se observó lo opuesto: la producción de fengicina y surfactina en presencia de hierro agregado fue inferior a la que

se detectó en el tratamiento control y en el tratamiento con células inactivas de hongo (tabla 3). Lo mismo sucedió en el tratamiento con celulosa. Aun cuando algunos autores han obtenido resultados favorables en la síntesis de lipopéptidos con el uso de inductores como fuentes de carbono y nitrógeno, una relación carbono/nitrógeno no óptima es un parámetro crítico que disminuye la síntesis de los lipopéptidos^{15,16}.

La presencia de microorganismos competidores es un factor ambiental que afecta la biosíntesis de antimicrobianos^{38,41}. En algunos estudios se menciona que las células inductoras deben estar inactivas o parcialmente desnaturalizadas por calor (55-65°C), y que una proteína asociada a la pared celular, de aproximadamente 58 kDa, es, probablemente, la que induce la biosíntesis^{15,41}.

Es importante considerar que estos estudios están orientados a la producción de bacteriocinas y que no existen reportes sobre producción de lipopéptidos. Tomando en cuenta estos antecedentes y nuestros resultados, la sustancia inductora podría ser una sola proteína o una estructura de envoltura celular que incluye componentes proteicos. Se deben realizar más estudios para mejorar la biosíntesis de

lipopéptidos con actividad biológica con células inactivas como factor inductor.

En un estudio previo, se evaluó el desempeño de *B. amyloliquefaciens* como biocontrolador de *P. capsici* en plantas de tomate y chile; en ese estudio se observó un biocontrol efectivo y el efecto pudo deberse a los lipopéptidos sintetizados por la bacteria antagonista²⁹. Estos lipopéptidos juegan un papel importante en el control biológico de hongos y oomicetos fitopatógenos.

En este estudio, el extracto con lipopéptidos producidos por *B. amyloliquefaciens* KX953161.1 inhibió la germinación de zoosporas de *P. capsici*. En tal sentido, se ha reportado que los lipopéptidos antimicrobianos producidos por *B. amyloliquefaciens* inhiben el crecimiento micelial de *P. capsici* *in vitro*³⁹. Sin embargo, la inhibición de la germinación de las zoosporas producidas por este fitopatógeno no ha sido evaluada antes. Diversos estudios sugieren que las zoosporas, gracias a su motilidad, localizan a los huéspedes y se agregan a los sitios de infección al detectar un gradiente de señales químicas específicas liberadas por el huésped^{19,20,25}. En esta investigación se constató que el extracto con los lipopéptidos obstaculizó la motilidad de zoosporas, su germinación (fig. 2) y enquistamiento (fig. 3C), y llevó a malformaciones en el tubo germinal (fig. 3) y a degradación celular (fig. 2E).

Hasta el momento, no se conoce bien el modo de acción del lipopéptido fengicina, aunque se cree que este tiende a interactuar con las capas lipídicas y que puede generar cambios dependientes de la dosis en la estructura y permeabilidad de la membrana celular⁹. De igual forma, el lipopéptido surfactina actúa sobre la membrana lipídica solubilizando los fosfolípidos⁸. Deleu et al.⁹ sugieren que la actividad biológica de la fengicina está relacionada con sus efectos sobre las propiedades estructurales de la membrana y proponen dos mecanismos de acción en función de la concentración: a baja concentración, la fengicina se agregaría para formar poros que conducen a cambios de permeabilidad de la membrana; a concentraciones elevadas, actuaría como detergente, solubilizando la membrana, como se ha informado en relación con la surfactina.

De acuerdo con lo anterior, y teniendo en cuenta que la composición de la pared celular del oomiceto está formada por celulosa y por β -1,3 y β -1,6 glucanos⁴³, es probable que estos lipopéptidos estén interactuando con la pared celular del oomiceto, volviéndola más permeable; sin embargo, este mecanismo aún no se comprende del todo.

En función de nuestros hallazgos, podemos afirmar que el extracto obtenido de la bacteria *B. amyloliquefaciens* KX953161.1 es eficaz contra zoosporas de *P. capsici* siempre y cuando exista contacto directo con los metabolitos producidos por la bacteria y presentes en el extracto.

Es necesario realizar más estudios que involucren la separación de cada uno de los lipopéptidos presentes en el extracto y evaluar por separado la interacción con la pared celular de las células de los oomicetos, con el fin de encontrar la concentración óptima de cada lipopéptido para que ejerza su acción inhibitoria sobre *P. capsici*. Aún falta información para entender mejor los mecanismos implicados en estos fenómenos.

Conclusiones

En el presente estudio se demostró un aumento en la producción de proteínas totales por la bacteria antagonista *Bacillus amyloliquefaciens* KX953161.1 tras añadir en el medio de cultivo células del hongo *Colletotrichum* spp. inactivadas por calor. Los lipopéptidos identificados en el extracto obtenido fueron fengicina y surfactina. Estos lipopéptidos influyeron negativamente en la germinación, la motilidad y el enquistamiento de *P. capsici* y aceleraron la degradación de sus zoosporas, también produjeron deformaciones en el tubo germinal y en las hifas de este hongo fitopatógeno.

Financiamiento

Esta investigación no recibió ninguna subvención específica de agencias de financiamiento en los sectores público, comercial o sin fines de lucro.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

Bibliografía

1. Abouseoud M, Maachi R, Amrane A, Boudergua S, Nabi A. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*. 2008;223:143–51, <http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2007.01.198>.
2. Ahmed S, Al-Rehaily AJ, Alam P, Alqahtani AS, Hidayatullah S, Rehman MT, Mothana RA, Abbas SS, Khan MU, Khalid JM, Siddiqui NA. Antidiabetic, antioxidant, molecular docking and HPTLC analysis of miquelianin isolated from *Euphorbia schimperi* C. Presl. *Saudi Pharm J*. 2019;27:655–63, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2019.03.008>.
3. Alam P, Kamal YT, Alqasoumi SI, Foudah AI, Alqarni MH, Yusufoglu HS. HPTLC method for simultaneous determination of ascorbic acid and gallic acid biomarker from freeze dry pomegranate juice and herbal formulation. *Saudi Pharm J*. 2019;27:975–80, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2019.07.006>.
4. Beltrán E, Macedo G, Villafaña J, Beltrán M. Análisis de la producción de lipopéptidos de *B. subtilis* y *B. tequilensis* en medio líquido con y sin hierro. XVI Congreso Nacional Biotecnología y Bioingeniería. 2015. Disponible en <https://smmb.mx/congresos%20smmb/guadalajara15/PDF/XVI/trabajos/V/VC-37.pdf>.
5. Biniarz P, Coutte F, Gancel F, Łukaszewicz M. High-throughput optimization of medium components and culture conditions for the efficient production of a lipopeptide pseudofactin by *Pseudomonas fluorescens* BD5. *Microb Cel Fact*. 2018;17:121, <http://dx.doi.org/10.1186/s12934-018-0968-x>.
6. Chen YY, Chen PC, Tsay TT. The biocontrol efficacy and antibiotic activity of *Streptomyces plicatus* on the oomycete *Phytophthora capsici*. *Biol Control*. 2016;98:34–42, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.02.011>.
7. Dang Y, Zhao F, Liu X, Fan X, Huang R, Gao W, Wang S, Yang C. Enhanced production of antifungal lipopeptide iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* LL3

- through metabolic engineering and culture conditions optimization. *Microb Cell Fact.* 2019;18:181–214, <http://dx.doi.org/10.1186/s12934-019-1121-1>.
8. Deleu M, Lorent J, Lins L, Brasseur R, Braun N, El Kirat K, Nylander T, Dufrière YF, Mingeot-Leclercq MP. Effects of surfactin on membrane models displaying lipid phase separation. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1828:801–15, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmem.2012.11.007>.
 9. Deleu M, Paquot M, Nylander T. Fengycin interaction with lipid monolayers at the air–aqueous interface—implications for the effect of fengycin on biological membranes. *J Colloid Interface Sci.* 2005;283:358–65, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2004.09.036>.
 10. Deleu M, Paquot M, Nylander T. Effect of fengycin, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, on model biomembranes. *Biophys J.* 2008;94:2667–6672679, <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.107.114090>.
 11. Ebe S, Ohike T, Matsukawa T, Okanami M, Kajiyama S, Ano T. Promotion of lipopeptide antibiotic production by *Bacillus* sp. IA in the presence of rice husk biochar. *J Pestic Sci.* 2019;44:33–40, <http://dx.doi.org/10.1584/jpestics.D18-042>.
 12. Fooladi T, Moazami N, Abdesahian P, Kadier A, Ghojavand H, Wan Yusoff WM, Hamid AA. Characterization, production and optimization of lipopeptide biosurfactant by new strain *Bacillus pumilus* 2IR isolated from an Iranian oil field. *J Pet Sci Eng.* 2016;145:510–9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.petro.2016.06.015>.
 13. Gao XY, Liu Y, Miao LL, Li EW, Hou TT, Liu ZP. Mechanism of anti-Vibrio activity of marine probiotic strain *Bacillus pumilus* H2, and characterization of the active substance. *AMB Express.* 2017;7:23, <http://dx.doi.org/10.1186/s13568-017-0323-3>.
 14. Geissler M, Oellig C, Moss K, Schwack W, Henkel M, Hausmann R. High-performance thin-layer chromatography (HPTLC) for the simultaneous quantification of the cyclic lipopeptides Surfactin, Iturin A and Fengycin in culture samples of *Bacillus* species. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2017;1044-1045:214–24, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.11.013>, 1044-1045:.
 15. Ghazala I, Bouassida M, Krichen F, Manuel Benito J, Ellouze-Chaabouni S, Haddar A. Anionic lipopeptides from *Bacillus mojavensis* I4 as effective antihypertensive agents: Production, characterization, and identification. *Eng Life Sci.* 2017;17:1244–53, <http://dx.doi.org/10.1002/elsc.201700020>.
 16. Ghribi D, Ellouze-Chaabouni S. Enhancement of *Bacillus subtilis* Lipopeptide Biosurfactants Production through Optimization of Medium Composition and Adequate Control of Aeration. *Biotechnol Res Int.* 2011;2011:1–6, <http://dx.doi.org/10.4061/2011/653654>.
 17. Guo S, Zhang JW, Dong LH, Li X, Asif M, Guo QG, Jiang WJ, Ma P, Zhang LQ. Fengycin produced by *Bacillus subtilis* NCD-2 is involved in suppression of clubroot on Chinese cabbage. *Biol Control.* 2019;136:104001, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104001>.
 18. Han Y, Li X, Guo Y, Sun W, Zhang Q. Co-production of multiple antimicrobial compounds by *Bacillus amyloliquefaciens* WY047, a strain with broad-spectrum activity. *Trans Tianjin Univ.* 2018;24:160–71, <http://dx.doi.org/10.1007/s12209-017-0097-3>.
 19. Islam MT, Von Tiedemann A, Laatsch H. Protein kinase C is likely to be involved in zoosporogenesis and maintenance of flagellar motility in the *Peronosporomycete* zoospores. *Mol Plant Microbe Interact.* 2011;24:938–47, <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-12-10-0280>.
 20. Islam MT, von Tiedemann A. 2,4-Diacetylphloroglucinol suppresses zoosporogenesis and impairs motility of *Peronosporomycete* zoospores. *World J Microbiol Biotechnol.* 2011;27:2071–9, <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-011-0669-7>.
 21. Jamshidi-Aidji M, Dimkić I, Ristivojević P, Stanković S, Morlock GE. Effect-directed screening of *Bacillus* lipopeptide extracts via hyphenated high-performance thin-layer chromatography. *J Chromatogr A.* 2019;1605:460366, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460366>.
 22. Johnson ET, Dunlap CA. Phylogenomic analysis of the *Brevibacillus brevis* clade: a proposal for three new *Brevibacillus* species, *Brevibacillus fortis* sp. nov., *Brevibacillus porteri* sp. nov. and *Brevibacillus schisleri* sp. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2019;112:991–9, <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-019-01232-4>.
 23. Kamle M, Borah R, Bora H, Jaiswal AK, Singh RK, Kumar P. Systemic acquired resistance (SAR) and induced systemic resistance (ISR): Role and mechanism of action against phytopathogens. En: In: *Fungal Biotechnology and Bioengineering.* Fungal Biology. Springer; 2020. p. 457–70, http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-41870-0_20.
 24. Karthika S, Varghese S, Jisha MS. Exploring the efficacy of antagonistic rhizobacteria as native biocontrol agents against tomato plant diseases. *3 Biotech.* 2020;10:101–17, <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-020-02306-1>.
 25. Kim HS, Sang MK, Jung HW, Jeun YC, Myung IS, Kim KD. Identification and characterization of *Chryseobacterium wanjuense* strain KJ9C8 as a biocontrol agent of *Phytophthora* blight of pepper. *J Crop Prot.* 2012;32:129–37, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2011.10.018>.
 26. Ko WH, Tsou YJ, Lin MJ, Chern LL. Activity and characterization of secondary metabolites produced by a new microorganism for control of plant diseases. *N Biotechnol.* 2010;27:397–402, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2010.05.014>.
 27. Landy M, Warren GH, Rosenmann SB, Colio LG. Bacillomycin: An antibiotic from *Bacillus subtilis* active against pathogenic fungi. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1948;67:539–41, <http://dx.doi.org/10.3181/00379727-67-16367>.
 28. Lee SC, Kim SH, Hoffmeister RA, Yoon MY, Kim SK. Novel peptide-based inhibitors for microtubule polymerization in *Phytophthora capsici*. *Int J Mol Sci.* 2019;20:2641, <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20112641>.
 29. Ley-López N, Márquez-Zequera I, Carrillo-Fasio JA, León-Félix J, Cruz-Lachica I, García-Estrada RS, Allende-Molar R. Efecto de biocontrol e inhibición germinativa de *Bacillus* spp. sobre zoosporas de *Phytophthora capsici*. *Rev Mex Fitopatol.* 2018;36:215–32, <http://dx.doi.org/10.18781/r.mex.fit.1711-2>.
 30. Liu JF, Yang J, Yang SZ, Ye RQ, Mu BZ. Effects of different amino acids in culture media on surfactin variants produced by *Bacillus subtilis* TD7. *Appl Biochem Biotechnol.* 2012;166:2091–100, <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-012-9636-5>.
 31. Ma Z, Hu J. Plipastatin A1 produced by a marine sediment-derived *Bacillus amyloliquefaciens* SH-B74 contributes to the control of gray mold disease in tomato. *3 Biotech.* 2018;8:1–10, <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-018-1144-z>.
 32. Meena KR, Kanwar SS. Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: Applications in food safety and therapeutics. *Biomed Res Int.* 2015;2015:473050, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/473050>.
 33. Mikropoulou EV, Petrakis EA, Argyropoulou A, Mitakou S, Halabalaki M, Skaltsounis LA. Quantification of bioactive lignans in sesame seeds using HPTLC densitometry: Comparative evaluation by HPLC-PDA. *Food Chem.* 2019;288:1–7, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.109>.
 34. Nasompag S, Dechsiri P, Hongsing N, Phonimdaeng P, Daduang S, Klaynongsruang S, Camesano TA, Patramanon R. Effect of acyl chain length on therapeutic activity and mode of action of the CX-KYR-NH2 antimicrobial lipopeptide. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1848:2351–64, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmem.2015.07.004>.

35. Oard S, Rush MC, Oard JH. Characterization of antimicrobial peptides against a US strain of the rice pathogen *Rhizoctonia solani*. J Appl Microbiol. 2004;97:169–80, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02291.x>.
36. Qian S, Sun J, Lu H, Lu F, Bie X, Lu Z. L-glutamine efficiently stimulates biosynthesis of bacillomycin D in *Bacillus subtilis* fmbJ. Process Biochem. 2017;58:224–9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2017.04.026>.
37. Ramírez-Cariño HF, Guadarrama-Mendoza PC, Sánchez-López V, Cuervo-Parra JA, Ramírez-Reyes T, Dunlap CA, Valadez-Blanco R. Biocontrol of *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum* by *Trichoderma asperelloides* and *Bacillus paralicheniformis* in tomato plants. Antonie Van Leeuwenhoek. 2020;113:1247–61, <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-020-01433-2>.
38. Rojo-Bezares B, Sáenz Y, Navarro L, Zarazaga M, Ruiz-Larrea F, Torres C. Coculture-inducible bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* strain J23 isolated from grape must. Food Microbiol. 2007;24:482–91, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2006.09.003>.
39. Roslan HA, Husaini A, Lihan S, Kota MF. Partial purification and characterization of antifungal peptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* PEP3 against *Phytophthora capsici*. Appl Sci Eng Progress. 2020;13:56–66, <http://dx.doi.org/10.14416/j.asep.2020.01.004>.
40. Shastri B, Kumar R, Lal RJ. Isolation and identification of antifungal metabolite producing endophytic *Bacillus subtilis* (S17) and its in vitro effect on *Colletotrichum falcatum* causing red rot in sugarcane. Vegetos. 2020;33:493–503, <http://dx.doi.org/10.1007/s42535-020-00133-6>.
41. Sip A, Grajek W, Boyaval P. Enhancement of bacteriocin production by *Carnobacterium divergens* AS7 in the presence of a bacteriocin-sensitive strain *Carnobacterium piscicola*. Int J Food Microbiol. 1998;42:63–9, [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00062-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00062-2).
42. Solanki MK, Yandigeri MS, Kumar S, Singh RK, Srivastava AK. Co-inoculation of different antagonists can enhance the biocontrol activity against *Rhizoctonia solani* in tomato. Antonie Van Leeuwenhoek. 2019;112:1633–44, <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-019-01290-8>.
43. Thines M. Phylogeny and evolution of plant pathogenic oomycetes — a global overview. Eur J Plant Pathol. 2014;138:431–47, <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-013-0366-5>.
44. Tsuge K, Ano T, Hirai M, Nakamura Y, Shoda M. The genes degQ, pps, and lpa-8 (sfp) are responsible for conversion of *Bacillus subtilis* 168 to plipastatin production. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43:2183–92, <http://dx.doi.org/10.1128/aac.43.9.2183>.
45. Unás JH, de Alexandria Santos D, Azevedo EB, Nitschke M. *Brevibacterium luteolum* biosurfactant: Production and structural characterization. Biocatal Agric Biotechnol. 2018;13:160–7, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2017.12.005>.
46. Urajová P, Hájek J, Wahlsten M, Jokela J, Galica T, Fewer DP, Kust A, Zapomělová-Kozlíková E, Delawská K, Sivonen K, Kopecký J, Hrouzek P. A liquid chromatography-mass spectrometric method for the detection of cyclic β -amino fatty acid lipopeptides. J Chromatogr A. 2016;1438:76–83, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.02.013>.
47. Wang P, Guo Q, Ma Y, Li S, Lu X, Zhang X, Ma P. DegQ regulates the production of fengycins and biofilm formation of the biocontrol agent *Bacillus subtilis* NCD-2. Microbiol Res. 2015;178:42–50, <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2015.06.006>.
48. Wang Y, Liang J, Zhang C, Wang L, Gao W, Jiang J. *Bacillus megaterium* WL-3 lipopeptides collaborate against *Phytophthora infestans* to control potato late blight and promote potato plant growth. Front Microbiol. 2020;11:1–13, <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.01602>.
49. Wang Y, Zhang C, Wu L, Wang L, Gao W, Jiang J, Wu Y. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* WL-2 and its iturinA lipopeptides against *Phytophthora infestans*. bioRxiv. 2019:1–62, <http://dx.doi.org/10.1101/751131>.
50. Yan F, Li C, Ye X, Lian Y, Wu Y, Wang X. Antifungal activity of lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* MG3 against *Colletotrichum gloeosporioides* in loquat fruits. Biol Control. 2020;146:104281, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104281>.
51. Yang H, Li X, Li X, Yu H, Shen Z. Identification of lipopeptide isoforms by MALDI-TOF-MS/MS based on the simultaneous purification of iturin, fengycin, and surfactin by RP-HPLC. Anal Bioanal Chem. 2015;407:2529–42, <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-015-8486-8>.
52. Yang R, Fan X, Cai X, Hu F. The inhibitory mechanisms by mixtures of two endophytic bacterial strains isolated from *Ginkgo biloba* against pepper phytophthora blight. Biol Control. 2015;85:59–67, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.09.013>.
53. Zhang TC, Nakajima M. Advances in Applied Biotechnology: Proceedings of the 2012 International Conference on Applied Biotechnology (ICAB 2014)-Volume I. Berlin: Springer; 2015, <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-45657-6>.
54. Zohara F, Akanda MAM, Paul NC, Rahman M, Islam MT. Inhibitory effects of *Pseudomonas* spp. on plant pathogen *Phytophthora capsici* in vitro and in planta. Biocatal Agric Biotechnol. 2016;5:69–77, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2015.12.009>.